

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**  
*Кафедра прикладной экологии*

**МЕТОД ИНДУКЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО  
ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС  
ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ ПРИ  
ИЗУЧЕНИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ  
ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ**

**Учебно-методическое пособие**

**Казань 2019**

**УДК 577**

*Утверждена на заседании кафедры прикладной экологии «\_\_» \_\_\_\_ 2019 г.*

*Печатается по рекомендации Учебно-методической комиссии*

*Института экологии и природопользования КФУ*

*Составители*

д.б.н., профессор **Зобов В.В.**

ассистент **Назаров Н.Г.**

д.б.н. **Выштакалюк А.Б.**

**Парфенов А.А.**

*Рецензенты*

доцент каф. прикладной экологии ИЭиП КФУ, к.х.н. **Яковлева О.Г.**

с.н.с. лаборатории ХБИ ИОФХ им. А.Е. Арбузова, к.б.н. **Петров К.А.**

*Научный редактор*

д.б.н., проф. **Степанова Н.Ю.**

**«Метод индукции токсического повреждения печени крыс четыреххлористым углеродом при изучении потенциальных гепатопротекторов»:** учеб.-метод. пособие / В.В. Зобов, Н.Г. Назаров, А.Б. Выштакалюк, А.А. Парфенов – Казань: КФУ, 2019. – 19 с.

В учебно-методическом пособии представлены методы индукции токсического повреждения печени крыс четыреххлористым углеродом при изучении потенциальных гепатопротекторов. Предназначено для обучающихся по направлению основной профессиональной образовательной программы магистратуры «Экологическая безопасность и управление в сфере охраны окружающей среды» в качестве руководства для выполнения лабораторных и научно-исследовательских работ по дисциплине «Экологическая токсикология»

© Казанский федеральный университет, 2019

© Зобов В.В., 2019

© Назаров Н.Г., 2019

© Выштакалюк А.Б., 2019

© Парфенов А.А., 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Общая характеристика гепатопротекторов	6
Токсический гепатит	6
Практическая работа № 1. Моделирование токсического гепатита	7
Практическая работа № 2. Фиксация и обработка тканей для гистологического исследования	12
Основная литература	19

## Введение

В экономически развитых странах хронические заболевания печени входят в число шести основных причин смерти пациентов от 35 до 60 лет, составляя 14-30 случаев на 100 тыс. населения. Ежегодно в мире умирают 40 млн. человек от цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, развивающейся на фоне носительства вируса гепатита В. В странах СНГ цирроз встречается у 1 % населения. Чаще наблюдается у мужчин: соотношение мужчин и женщин составляет в среднем 3:1. Заболевание может развиваться во всех возрастных группах, но чаще после 40 лет.

Чаще заболевания печени развиваются при длительной интоксикации алкоголем (по разным данным, от 40-50 до 70-80 %) и на фоне вирусных гепатитов *B*, *C* и *D* (30-40 %). Более редкие причины — болезни желчевыводящих путей, застойная сердечная недостаточность, различные химические и лекарственные интоксикации. Хронические заболевания печени развиваются и при наследственных нарушениях обмена веществ (гемохроматоз, гепатолентикулярная дегенерация, недостаточность  $\alpha$ 1-антитрипсина), и окклюзионных процессах в системе воротной вены (флебопортальный цирроз). Первичный билиарный цирроз печени возникает без видимой причины. Приблизительно у 10-35 % больных этиология остается неясна.

Возрастание медицинской и социальной значимости хронических заболеваний печени требует новых усилий в разработке вопросов этиологии, патогенеза, иммунологии, диагностики, лечения и профилактики этих заболеваний.

Повреждения печени вызывают серьезные нарушения в регуляции обмена веществ, детоксикации и антимикробной защиты. Также велик риск возникновения заболеваний печени у работников экстремальных географических зон и у спортсменов высшей квалификации. Часто причина этого связана с тем, что человек плохо адаптируется к новым условиям жизни, труда и спорта, организм не может настроить свою работу под оптимальный режим; его органы и системы работают с перегрузками, что приводит к

возникновению и развитию хронических заболеваний, в том числе заболеваний печени.

В лечении заболеваний печени основную роль играет восстановление поврежденных клеток печени – гепатоцитов. Для ускорения этого процесса используются препараты-гепатопротекторы. В настоящее время фармакологическая группа данных средств представлена небольшим набором препаратов. К сожалению, большинство представленных в России метаботропных препаратов не обладает научно-доказанными гепатопротекторными свойствами, а обладает эффектом плацебо. К тому же, данные препараты являются импортными и, как правило, дорогостоящими. Российских препаратов с доказанной гепатопротекторной эффективностью на фармацевтическом рынке нет. В связи с этим, актуальным является поиск и изучение свойств новых отечественных препаратов-гепатопротекторов.

## **Общая характеристика гепатопротекторов**

Гепатопротекторы — лекарственные средства, улучшающие метаболические процессы в печени, повышающие ее устойчивость к патогенным воздействиям, а также способствующие восстановлению ее функций при различных повреждениях.

Гепатопротекторный эффект в той или иной степени могут проявлять различные фармакологические средства, улучшающие метаболические процессы в организме, ингибирующие перекисное окисление липидов (ПОЛ), обладающие антигипоксической активностью, защищающие митохондриальные и микросомальные ферменты от повреждения, замедляющие синтез коллагена и повышающие активность коллагеназы. Таким образом, группа гепатопротекторов включает вещества различного химического строения с разнонаправленным воздействием на метаболические процессы.

Гепатопротекторы составляют около 9,2 % от общего количества лекарственных средств. (Минушкин, 2002) Их можно разделить по происхождению на несколько групп:

1. Гепатопротекторы растительного происхождения, содержащие естественные или полусинтетические флавоноиды;
2. Фосфолипидные препараты;
3. Препараты животного происхождения (органопрепараты);
4. Гепатопротекторы — производные аминокислот;
5. Селеносодержащие препараты;
6. Препараты урсодегидрохоловой кислоты;
7. Синтетические препараты;
8. Препараты других групп (Минушкин, 2002).

### **Токсический гепатит**

Токсический гепатит – это заболевание печени, острого или хронического течения, развивающееся в результате попадания в организм химических или других вредных веществ (лекарственные препараты, алкоголь, токсины

грибов), токсического действия их на клетки печени, сопровождающее воспалением клеток и их смертью, и проявляющееся увеличением печени в размерах, болью в правом подреберье и прогрессирующей желтухой.

Токсический гепатит острого течения, называется «Острый токсический гепатит», развивается в результате однократного попадания высокой дозы гепатотропного яда или маленькой дозы яда, обладающего сродством к печёночным клеткам. Как правило, симптомы повреждения печени появляются через 2-5 суток.

Токсический гепатит хронического течения, называется «Хронический токсический гепатит», развивается при многократном попадании маленьких доз яда, не обладающего сродством с клетками печени, может проявиться через месяцы или годы. Проявления острого токсического гепатита выраженные, протекают тяжело. Больного необходимо срочно госпитализировать, а при несвоевременном оказании медицинской помощи, может токсический гепатит привести к смерти. Хронический токсический гепатит развивается медленно, симптомы появляются постепенно, если не устранить причину, то осложняются циррозом печени и печёночной недостаточностью.

Попадание в организм вредных веществ может быть случайным, профессиональным (деятельность на работе) или умышленным (желаемым). Вредные вещества, которые попадают в организм и поражают печень, называются печёночными ядами. Они попадают в организм по разным путям. Через пищеварительный тракт: рот → желудок → кровь → печень. Через дыхательную систему: нос → легкие → кровь → печень. Через кожу яды тоже могут проникнуть в кровь, а потом в печень. Проникая в кровь, одни печёночные яды могут оказывать прямое действие на печёночную клетку (гепатотропные яды), нарушая её функцию и жизнедеятельность. Другие виды ядов, нарушают кровообращение в мелких сосудах, питающих печень. Это приводит к недостатку кислорода в клетках и их смерти, с последующим нарушением функции органа.

## Практическая работа № 1.

### Моделирование токсического гепатита

**Цель работы:** Постановка модели токсического гепатита с использованием четыреххлористого углерода для проведения лабораторного эксперимента по определению гепатопротекторных свойств веществ.

**Материалы и методы.** Перечень используемых в испытаниях оборудования и материалов:

- лабораторные прецизионные весы для взвешивания животных;
- аналитические весы для взвешивания соединений с точностью не менее 0.001 г;
- пипетки;
- инъекционные шприцы;
- исследуемые соединения;
- дистиллированная вода, 100мл;
- хлорид натрия (*NaCl*) 0,9 г для приготовления физиологического раствора, либо стерильный физраствор для инъекций;
- крысы лабораторные половозрелые в возрасте 3-10 месяцев, для одной серии экспериментов, одинакового пола (самцы или самки) и возраста: нелинейные или линейные – аутбредные *Wistar*, *Sprague Dawley* или других линий, в зависимости от задач эксперимента, из расчета не менее 3-4 штук в группе;
- ножницы, пинцеты.

**Теоретическая часть.** Метод токсического повреждения печени четыреххлористым углеродом разработан на основе методических рекомендаций, приведенных в (Миронов Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Минздрав РФ ЗАО «ИИА «Ремедиум». 2012. – С. 710-718). В результате наиболее избирательно повреждается печень, но не наблюдается массовой гибели и выраженного дистресса у животных.



Согласно поставленным задачам, исследования проводят по профилактической или по терапевтической схеме воздействия. Эксперимент проводят на половозрелых, предпочтительно линейных, крысах. По методу аналогов формируют группы численностью не менее 3-4 крыс в группе. Группы формируют из животных, однотипных по линии, полу, возрасту и массе тела. Животных содержат в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, температуре 18-26° С и световом режиме при 12-часовой смене светлого и темного времени суток.

Условия содержания животных и проведения экспериментов должны удовлетворять современным международным этическим нормам (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях), исследования должны иметь одобрение этического комитета.

Для моделирования токсического повреждения печени вводят 35% масляный раствор CCl<sub>4</sub> (ЧХУ) на растительном масле, в дозе 1,5 мл/кг перорально в течение 5 дней. При профилактической схеме тестируемые препараты вводят за 1-2 часа до введения ЧХУ. В зависимости от поставленных задач, курс введения препаратов может быть начат за несколько дней до начала токсического воздействия гепатотропного яда ЧХУ.

При терапевтической схеме сначала моделируют токсическое повреждение печени путем 5-кратного, в течение 5 дней, перорального введения 35% масляного раствора ЧХУ в дозе 1,5 мл/кг. Введение препаратов для терапии смоделированного заболевания печени начинают на следующий день после последнего введения ЧХУ и продолжают, в зависимости от поставленных задач, от 5 до 30 дней. Для изучения динамики восстановления печени, формируют группы не менее 10-15 однотипных животных в каждой.

**Практическая часть.** Исследование конъюгатов Ксимедона с биогенными кислотами выполняется на половозрелых нелинейных или линейных крысах, в одном эксперименте должны быть задействованы однотипные животные: одной линии, одинакового пола и возраста (3-10

месяцев). В зависимости от задач эксперимента, количество животных отбирается из расчета не менее 3-4 в группе. Для изучения динамики изменения показателей, отбирается не менее 10-15 животных в группе. Эксперименты на животных проводятся в условиях вивария, соответствующих современным требованиям к содержанию животных (приточно-вытяжная вентиляция, 12-часовой световой день, бактерицидный облучатель, очищенная вода). Кормление и поение животных организуется без ограничений, стандартным кормом для лабораторных животных в виде гранул, изготовленном по ТУ 9296-002-70941247-2005.

Процедура эксперимента:

1. Произвести отбор по 15 животных для 7-и экспериментальных групп.
2. Индукция токсического гепатита 35%-м масляным раствором  $CCl_4$  (ЧХУ) в дозе 1,5 мл/кг перорально в течение 5 суток.
3. После индукции токсического гепатита крыс, начиная со следующего дня после последнего введения  $CCl_4$ , внутривбрюшино вводятся исследуемые производные пиримидина – конъюгаты Ксимедона в терапевтических дозах, в диапазоне от 0,2 до 2,2 мг/кг. (соединение 29Д в дозе 1/2500 от ЛД50 (2,2 мг/кг) и, для установления минимальной эффективной терапевтической дозы, - в дозах 1/10000 (0,54 мг/кг), 1/25000 (0,22 мг/кг) и 1/50000 (0,11 мг/кг) от ЛД50).
4. В качестве вещества сравнения используется препарат Тиотриазолин как эталон эффективности воздействия гепатопротекторного лекарственного средства в оптимальной терапевтической дозе 2,4 мг/кг, составляющей 1/2500 от ЛД50.
5. Исследуемые производные пиримидина перед введением растворить в стерильном физрастворе (в буфусах).
6. Контрольной группе вводится физраствор (аптечный, в буфусах).
7. Декапитация крыс исследуемых групп для отбора гистологического материала проводится под анестезией: у интактных животных, на следующий день после последнего введения  $CCl_4$ , и после последнего введения тестируемых веществ. Для изучения динамики изменения показателей часть

животных (не менее 3 штук) выводится из опыта путем эвтаназии на 3-й, 7-й, 11-й и 21-й день после введения CCl<sub>4</sub>. Анестезию проводят внутрибрюшинным введением 8% хлоралгидрата в количестве 0,4 мл на 100 массы животного.

8. После декапитации крыс извлекают печень, определяют ее массу на лабораторных прецизионных весах и отбирают образцы для гистологического исследования.

8. Для дальнейшего гистологического исследования образцы тканей фиксируются в забуференном формалине (10%).

## Практическая работа №2.

### Фиксация и обработка тканей для гистологического исследования

**Цель работы:** Проведение подготовки гистологических проб в рамках исследования по определению гепатопротекторных свойств веществ в модели токсического гепатита.

**Материалы и методы.** Перечень используемых в испытаниях оборудования и материалов:

- пипетки;
- дистиллированная вода, 100мл;
- образцы печени, отобранные в результате опытов по гепатопротекции после эвтаназии животных;
- гистологические кассеты;
- чашки Петри;
- забуференный формалин (10%);
- ножницы;
- автоматический гистопроцессор *Sacura Tissue-Tek Vip.5* либо два термостата, установленных на 37 и 60° С;
- вытяжной шкаф;
- станция для заливки в парафин *MtPoint ESD-2800* или другой модели, либо термостат, установленный на 60° С с посудой для расплавления парафина;
- микротом ротационный *Sacura Accu-Cut SRM200* или другой модели, либо санный микротом *MC-2*;
- микротом-криостат *Sacura Tissue-Tek CriO3* или другой модели;
- наборы реактивов для фиксации, заливки и окрашивания гистологических препаратов;
- посуда для реактивов для проводки тканей (плотно закрывающиеся емкости) в случае отсутствия автоматического гистопроцессора.

**Теоретическая часть.** Фиксация органов обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Фиксация всегда приводит к большим или меньшим изменениям структуры и объема ткани, степень выраженности которых зависит от *pH* фиксатора, его концентрации, температуры, продолжительности воздействия и других факторов. Концентрация ионов водорода фиксатора должна соответствовать таковой в тканях, поэтому фиксатор должен иметь *pH*, близкий к нейтральному. Увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но вызывает еще большие изменения в тканях. Слишком продолжительная фиксация приводит к значительному уплотнению материала, что в дальнейшем затрудняет его обработку. Для каждого конкретного вида исследования подбирают наиболее приемлемый фиксатор. Чем меньшую деформацию будут претерпевать тканевые структуры при фиксации, чем быстрее и глубже будет их действие на ткань, тем лучшей считается фиксирующая жидкость.

Полноценная фиксация материала обеспечивается при соблюдении ряда требований.

1. После вырезки кусочка ткани его немедленно погружают в фиксатор.
2. Объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого материала в 10-20 раз, так как тканевая жидкость может существенно изменить концентрацию фиксатора.
3. В том случае, если цвет фиксатора изменяется после погружения в него кусочков ткани, фиксатор необходимо немедленно сменить.
4. Недопустимо повторное использование фиксаторов.
5. Для каждого фиксатора следует соблюдать установленное время фиксации. Длительное пребывание материала возможно лишь в некоторых фиксаторах, например, в 10% нейтральном формалине, жидкости Буэна.

Для фиксации лучше использовать емкости с широким горлом, чтобы не возникло проблем с извлечением фиксированного материала. Равномерность фиксации некоторых рыхлых тканей, например легочной, достигается

помещением их на дно банки, а поверх них - прокладки из слоя марли или ваты. Данный приём позволяет избежать дефекта фиксации кусочков лёгочной ткани в виде прилипания их к покрывающей банку перчаточной резине с последующем развитием аутолиза в кусочке. При большом количестве материала кусочки переслаивают ватой или марлей.

Чаще материал фиксируют при комнатной температуре, но для некоторых видов исследования (гистохимических, электронно-микроскопических и др.) необходимо проводить фиксацию при 4 °С. Материал срочных биопсий фиксируют при повышенной температуре фиксатора. При ускоренной фиксации в глубине объекта быстро развиваются аутолитические процессы.

**Практическая часть.** Для гистологического исследования образцы тканей фиксируются 10%-м забуференным формалином в течение 24 часов и подвергаются дальнейшей промывке и обработке в автоматическом гистопроцессоре *Sacura Tissue-Tek Vip.5* с использованием реагентов: формалин забуференный, изопропиловый спирт (среда для проводки тканей Изопреп), ксилол, парафиновая среда Гистомикс. Обработку ткани в гистопроцессоре на всех стадиях, за исключением парафина, проводят при температуре 37° С, обработку в парафине проводят при температуре 58° С. После обработки в гистопроцессоре (в течение 11 часов), образцы заливают в парафин (среду Гистомикс) – либо с помощью станции для заливки в парафин (*MtPoint ESD-2800* или другая модель), либо парафином, расплавленным в термостате при температуре 60° С. Блоки формируются на основе гистологической кассеты. Эти блоки в дальнейшем используются для изготовления парафиновых срезов толщиной 4-5 мкм на ротационном микротоме *Sacura Accu-Cut SRM200*.

При отсутствии возможности использовать автоматический гистопроцессор *Sacura Tissue-Tek Vip.5*, промывка и обработка тканей производится вручную по следующей схеме:

1. Промывание образцов в течение 3-4 часов.
2. Обезвоживание:

- 1) Спирт I (50%) (52 мл 96% спирта + 38 мл H<sub>2</sub>O) –1-2 часа,
- 2) Спирт II (70%) (73 мл 96% спирта + 27 мл H<sub>2</sub>O) –2-4 часа,
- 3) Спирт III (80%) (83 мл 96% спирта + 17 мл H<sub>2</sub>O) - 1 час,
- 4) Спирт IV (96%I) –30 минут,
- 5) Спирт V (96%II)–30 минут,
- 6) Спирт VI (96%III) – 10-12 часов,
- 7) Абсолютный спирт I – 30 минут,
- 8) Абсолютный спирт II – 30 минут,

### 3. Удаление спирта:

- 1) Смесь ксилола со спиртом 1:1 – 25 минут,
- 2) Ксилол I – 20 минут,
- 3) Ксилол II – 20 минут,

### 4. Пропитывание парафином готовой смесью «Гистомикс»:

- 1) Ксилол + Гистомикс при 37°C – 25 минут,
- 2) Гистомикс I при 58°C – 1 час,
- 3) Гистомикс II при 58°C – 1 час,

5. Заливка в парафин: Кусочки печени заливаются смесью «Гистомикс» при 58-60°C, охлаждаются и далее вырезаются кусочки в форме кубиков, которые монтируются на деревянные брусочки для формирования блоков. Затем готовятся срезы на санном микротоме МС-2 толщиной 5-7 мкм при установке ножа под углом 30-45°. Полученные срезы опускают в теплую дистиллированную воду (при 45-50°C) той стороной, которая была ближе к ножу. Стекло с нанесенным на него белком погружается в воду и ловятся срезы. Стекло со срезами промокается влажной фильтровальной бумагой и подогревается до легкого расплавления парафина.

Парафиновые срезы, полученные с помощью ротационного или санного микротомы, в дальнейшем подвергаются окраске гематоксилином и эозином.

Дальнейшая обработка гистологического материала производится аналогично работе с подготовкой срезов на автоматическом гистопроцессоре согласно пунктам 2-7.

Окрашивание препаратов гематоксилином и эозином ткани производится по следующей схеме:

1. Промывка парафиновых срезов в ксилоле для депарафинирования в течении 10 минут.
2. Промывка спиртом 96% - 5 мин
3. Промывка спиртом 70% - 3 мин
4. Промокание фильтровальной бумагой
5. Промывка дистиллированной водой 5 мин (не более суток)
6. Положить препарат на ванночку для окраски гематоксилином – 5-10 мин
7. Ополоснуть водопроводной водой 10 мин для созревания ядер.
8. Окрасить эозином при проявлении ядер 30 сек
9. Обработка 96%-м спиртом для дифференцировки, до появления нежно сиреневато-розового цвета препарата – 30 сек - 3 мин
10. Промокнуть и переместить в ксилол для просветления – 30 сек.
11. При заключении на стекло в центр среза нанести каплю бальзама или среды для заключения срезов Витрогель, осторожно покрыть покровным стеклом, чтобы не было пузырьков.
12. Слегка придавить и убрать лишнюю среду для заключения (бальзам или Витрогель).

1. Исследование жировой инфильтрации печеночной ткани при токсическом гепатите при НАЖБП проводится на замороженных гистологических срезах, окрашенных Суданом III или Суданом черным. Для изготовления замороженных срезов образцы замораживают в криогеле в формочках для криотомии, срезы толщиной 5-6 мкм изготавливают на микротоме-криостате *Sacura Tissue-Tek CriO3*, используя специальные стекла с адгезивным покрытием, затем окрашивают Суданом III или Суданом черным. По специфической окраске выявляются области жировой инфильтрации ткани печени. Для определения степени жировой инфильтрации печени подсчитывается площадь поля зрения при увеличении  $\times 10$ , затем выявляется



общая площадь ткани рассматриваемого участка печени и площадь ткани, инфильтрованной липидами.

Окрашивание замороженных срезов Суданом III или Суданом черным производится по следующей схеме:

1. спирт 50° - 1 мин.
2. спирт 70° - 1 мин.
3. краситель Судан (готовый раствор или приготовленный самостоятельно : 0,1-0,2 г порошка Судана добавить к 100 мл 70° этанола) – 1 час.

3. спирт 50° - промыть
4. заключить в теплый желатин (50° C)

Стекла с препаратами не подлежат длительному хранению, до исследования стекла хранить в холодильнике.

Все микроскопические и морфометрические исследования проводятся под микроскопом *Nikon H550S* с цифровой камерой *Nikon* и программным обеспечением *NIS-B*.

6. Далее необходимо рассчитать долю поражения печени в процентах от площади ткани печени. Каждый срез обрабатывается 5-6 раз.

7. Для изучения пролиферативной активности клеток печени, количества ретикулоэндотелиальных клеток и количества патологически измененных клеток на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывается общее количество гепатоцитов, количество ретикулоэндотелиальных клеток, количество двоядерных, многоядерных и безъядерных гепатоцитов, количество клеток с мелкокапельной и крупнокапельной жировой дистрофией, гидropической и баллонной дистрофией, а также количество некрозов. Исследование должно проводиться при объективах x40 и x100 (с использованием иммерсионного масла). Каждый срез обрабатывается по 9 раз.

**Анализируемые показатели и критерии оценки эффективности препаратов.** На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, исследуется

ядерно-цитоплазматическое соотношение путем анализа площади гепатоцитов, площади ядер и их количества, далее рассчитывается соотношение площади ядер к общей площади гепатоцитов и вычисляется индекс ядерно-цитоплазматического соотношения.

Для анализа полученных данных используется пакет статистического анализа *R* (версия 3.3.1). Результаты статистической обработки представляются в виде среднего и ошибки среднего. Статистическую значимость различий оценивается по критерию Манна-Уитни.

## Основная литература

- 1) Зобов В.В. Экология человека [Электронный ресурс <http://tulpar.kfu.ru/course/view.php?id=1843>]. Учебное пособие: полный курс лекций. - Режим доступа: курс доступен только зарегистрированным слушателям. - Казань: КФУ, 2015
- 2) Губарева, Любовь Ивановна. Экология человека: практикум для вузов / Л. И. Губарева, О. М. Мизирева, Т. М. Чурилова. -Москва: ВЛАДОС, 2005. -111 с.
- 3) Экология человека: учебник / под ред. А.И. Григорьева. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. -240 с.
- 4) Мовчан, Владислав Николаевич. Экология человека: учеб. пособие для студентов, обучающихся по экол. специальностям / В. Н. Мовчан; С.-Петербур. гос. ун-т. -СПб.: СПбГУ, 2004. -289 с.
- 5) Пивоваров Ю.П. Руководство к лабораторным занятиям по гигиене и основам экологии человека. – М: Изд-во Академия ИЦ, 2010.
- 6) Наследов А.Д. Математические методы психологического исследования. Анализ и интерпретация данных. Учебное пособие. / А.Д. Наследов – СПб.: Речь, 2004. – С. 392.
- 7) Ивашкин, В.Т. Алкогольно-вирусные заболевания печени / В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская. - М.: Литера, 2007. - 160 с.
- 8) Лупа, Х. Основы гистохимии / Х. Лупа - М.: Мир, 1980. - 344 с.
- 9) Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. - М.: Минздрав РФ ЗАО «ИИА «Ремедиум». - 2000. 398 с.
- 10) Скакун, Н.П. Клиническая фармакология гепатопротекторов / Н.П. Скакун, В.В. Шманько, Л.М. Охримович. - Тернополь: Збруч, 1995. - 272 с.