

На правах рукописи

Яковенко Дарья Валерьевна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ И ЕГО
КОРРЕКЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНОМ У БЕЛЫХ КРЫС**

3.3.3 – патологическая физиология (биологические науки)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Благовещенск – 2021

Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедре нормальной и патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Сазонова Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Меньщикова Елена Брониславовна, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов.

Надеев Александр Петрович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической анатомии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «08» октября 2021 года в 9:00 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.0.062.02 (Д 999.199.02) на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» и федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 675006, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, д. 95

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», <https://cfpd.amursu.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
Доктор медицинских наук

Приходько Анна Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Окислительный стресс является одним из главных звеньев многих патологических состояний; изучается роль активных форм кислорода (АФК) в формировании механизмов канцерогенеза (Moloney J.N. et. al., 2018), заболеваний сердечно-сосудистой (Jarkovska D. et. al., 2017), дыхательной (Суфиева Р.И. и др., 2016) и пищеварительной систем (Wang J. et. al., 2016), а также возможность их нейтрализации. Окислительный стресс сопровождается угнетением пролиферации и активацией апоптоза клеток (Woo H. P. et. al., 2018).

Понимание факта вовлеченности АФК в патогенез многочисленных заболеваний и процесса старения привело к массовому производству и применению лекарственных препаратов и биологически активных добавок с антиоксидантной активностью. Вместе с тем, появляются противоречивые данные об эффективности использования антиоксидантов (Henkel R. et. al., 2019). Имеются исследования, демонстрирующие негативные последствия использования некоторых антиоксидантов (Sena L. et. al., 2012). Одной из причин этого парадокса может быть «подавление эндогенной системы антиоксидантной защиты организма» (Сазонтова, Т. Г. и др., 2005) и особая роль АФК в физиологических внутриклеточных процессах (Schieber M. et. al., 2014). Генерация АФК необходима для стимуляции клеточного деления (Mittler R., 2017).

Степень разработанности темы диссертации

Нарушение баланса образования АФК и факторов антиоксидантной защиты приводит к окислительному стрессу. Причиной окислительного стресса может быть, как увеличение АФК, так и снижение уровня антиоксидантов, а также сочетание того и другого (Меньщикова Е. Б. и др., 2006). Избыточная нейтрализация и/или подавление образования АФК может обусловить формирование «восстановительного стресса». По мнению Лю Б.Н. и соавт., «в ходе эволюционной адаптации организмов к возрастанию концентраций

кислорода в земной атмосфере, закрепились специализированные диапазоны дисбалансов между прооксидантами и антиоксидантами», в виде последовательности (по мере возрастания количества АФК в клетке): пролиферация – апоптоз – канцерогенез – цитолиз. Таким образом, можно говорить о физиологическом диапазоне концентрации АФК, которые необходимы для нормального функционирования клеток (Ward P. T. J., 2017).

Несмотря на широкое применение антиоксидантов, следует отметить противоречивость сведений литературы о влиянии натуральных антиоксидантов на структурный гомеостаз (Roy J., 2017). Хорошо описан и проанализирован антипролиферативный и проапоптотический эффект антиоксидантов в культурах опухолевых клеток (Klaunig, J. E., 2018), но данные о влиянии экзогенных антиоксидантов на нетрансформированные ткани и клетки млекопитающих – немногочисленны (Tseluyko S.S., 2019). Остаются неясными особенности влияния АФК и антиоксидантов на анаболические и пролиферативные процессы в различных клеточных популяциях, в разные периоды онтогенеза.

Цель исследования: Исследовать закономерности изменения анаболических процессов при окислительном стрессе и его коррекции антиоксидантом дигидрохверцетином в различных клеточных популяциях белых крыс

Задачи исследования:

1. Изучить показатели пролиферативных процессов и нуклео-нуклеолярного аппарата клеток различных клеточных популяций новорожденных и половозрелых белых крыс, а также первичной культуры фибробластов, в условиях окислительного стресса.

2. Исследовать характер влияния антиоксиданта дигидрохверцетина на показатели пролиферативных процессов и нуклео-нуклеолярного аппарата клеток различных клеточных популяций новорожденных и половозрелых белых крыс, а также в первичной культуре фибробластов.

3. Изучить показатели пролиферативных процессов и нуклео-нуклеолярного аппарата клеток различных клеточных популяций половозрелых

белых крыс после действия гипобарической гипоксии на фоне влияния антиоксиданта дигидрохверцетина.

4. Изучить показатели пролиферативных процессов и нуклео-нуклеолярного аппарата клеток различных клеточных популяций новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению антиоксиданта дигидрохверцетина.

5. Оценить показатели пролиферативных процессов и нуклео-нуклеолярного аппарата клеток в первичной культуре пульмональных фибробластов при моделировании окислительного стресса на фоне влияния антиоксиданта дигидрохверцетина.

Научная новизна. Впервые проведен сравнительный анализ реакции нуклео-нуклеолярного аппарата различных клеточных популяций при моделировании окислительного стресса и его коррекции дигидрохверцетином у новорожденных и половозрелых белых крыс.

Исследованы эффекты введения дигидрохвертина в периоде новорожденности на синтез ДНК, параметры нуклео-нуклеолярного аппарата клеток широкого спектра клеточных популяций. В эксперименте показано отсутствие неблагоприятных последствий введения исследуемого антиоксиданта на организм новорожденных животных как на интактном фоне, так и после антенатальной гипоксии. Продемонстрированы онтогенетические особенности реакции клеточных популяций новорожденных и половозрелых белых крыс на снижение уровня АФК под воздействием антиоксиданта.

Выявлена тканеспецифическая реакция различных клеточных популяций половозрелых белых крыс на изменение уровня АФК: коррекция антиоксидантом избыточного уровня АФК при окислительном стрессе снижает показатели нуклео-нуклеолярного аппарата клеток сердца, но нормализует количество ядрышек в клеточных популяциях желудочно-кишечного тракта. Снижение концентрации АФК ниже физиологического уровня, при воздействии антиоксиданта на интактном фоне, угнетает нуклео-нуклеолярный аппарат кардиомиоцитов, миоцитов кишечника, экзокриноцитов поджелудочной железы, уменьшает пролиферативную активность

эпителиоцитов роговицы, но увеличивает количество ядрышек в ядрах нейронов неокортекса, что сопровождается повышением уровня фактора роста нервов в сыворотке крови животных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные позволяют дополнить сведения об эффективности и целесообразности приема препаратов и биологически активных добавок, созданных на основе биофлавоноидных антиоксидантов, в качестве поддерживающей или профилактической терапии патологических состояний, сопровождающихся окислительным стрессом; могут быть полезны при определении показаний и/или противопоказаний к использованию лекарственных препаратов и биологически активных добавок, созданных на основе натурального эталонного антиоксиданта дигидрокверцетина. Выявленное нейротрофическое действие биофлавоноидного антиоксиданта может быть полезным для использования в неврологии.

Доказанный позитивный эффект дигидрокверцетина на пролиферативную активность и состояние нуклео-нуклеолярного аппарата различных тканей новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, может служить экспериментальным обоснованием возможности использования фармакологических препаратов и веществ на основе этого биофлавоноидного антиоксиданта в педиатрии и неонатологии.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс (курс лекций) кафедр нормальной и патологической физиологии, фармации и фармакологии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России, о чем имеются акты внедрения.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России. В работе использовали белых крыс линии Wistar. Для выполнения поставленных задач автором применен комплекс современных биохимических (хемилюминесцентный метод, иммуноферментный анализ) и гистологических

(авторадиография, гистохимия, морфометрия) методов исследования, характеризующих процессы свободно-радикального окисления, пролиферативную активность и состояние нуклео-нуклеолярного аппарата клеток различных клеточных популяций. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы «Statistica 6.0».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменения анаболических процессов в условиях окислительного стресса носят однотипный характер в различных клеточных популяциях новорожденных и половозрелых белых крыс, а также в первичной клеточной культуре.

2. Нарушения пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций новорожденных животных, индуцированные антенатальной гипоксией, могут быть скорректированы введением в неонатальном периоде антиоксиданта дигидрохверцетина.

3. Введение антиоксиданта дигидрохверцетина перед гипоксическим воздействием не корректирует нарушения структурного гомеостаза в большинстве исследованных клеточных популяций половозрелых белых крыс.

4. Реакция анаболических процессов на воздействие антиоксиданта дигидрохверцетина носит отчетливый тканеспецифический характер и имеет выраженные онтогенетические особенности.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов проведенных экспериментальных исследований подтверждается достаточным объемом наблюдений и воспроизводимостью с использованием современных морфологических, гистологических, гистохимических методов, которые выполнялись при личном участии автора. Для оценки результатов исследования использовался комплексный статистический анализ с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (Statsoft Inc., R США).

Материалы исследования были представлены и обсуждены на 67-й Итоговой научной конференции «Актуальные вопросы современной медицины» (23 апреля 2010 г., г. Хабаровск); 69-й Итоговой региональной

научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины», (25-27 апреля 2012 г., г. Хабаровск); 70-й Итоговой региональной научной конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (апрель 2013 г., г. Хабаровск); XVII краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов (январь 2015 г., г. Хабаровск), XVIII краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов (январь 2016 г., г. Хабаровск); World Life Science Conference 2016 (1-3 ноября 2016 г., Пекин (Китай)), XIX Краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов (январь 2017 г., г. Хабаровск) XX Краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов (январь 2018 г., г. Хабаровск); Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2018» (12-13 апреля 2018 г., г. Санкт-Петербург); Общероссийском научном-практическом мероприятии «Эстафета вузовской науки – 2019» (27-28 февраля 2019 г., Москва); XXII Краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов (январь 2020 г., г. Хабаровск).

Личный вклад соискателя. Автор лично принимала участие во всех этапах диссертационного исследования. Совместно с научным руководителем д.м.н. Сазоновой Е.Н. были сформулированы цель и задачи исследования, разработан его дизайн. Вклад автора состоит в непосредственном участии в получении исходных данных, апробации результатов исследования, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по выполненной работе, оформлении текста диссертации.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, из них 5 – в журналах, рекомендованных ВАК для публикации диссертационных материалов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах и содержит 35 таблиц, 22 рисунка. Список литературы включает 425 источников, в том числе 144 отечественных и 281 иностранных авторов. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3-х глав собственных данных, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовали белых крыс породы Wistar: новорожденных (1-7 сутки жизни) и половозрелых (3-месячный возраст) животных. Моделирование окислительного стресса *in vivo* осуществляли гипобарической гипоксией «подъемом на высоту 9000 м» (pO_2 – 42 мм. рт. ст.). Гипоксию животных проводили пятикратно (ежедневно в течение 5-ти суток с экспозицией 4 часа). Окислительный стресс у половозрелых крыс-самцов моделировали непосредственным гипоксическим воздействием на исследуемых животных; состояние окислительного стресса у новорожденных животных моделировали воздействием антенатальной гипоксии: гипоксическому воздействию подвергали беременных крыс-самок с 15 по 19 сутки гестации.

Исследуемое вещество – натуральный флавоноид дигидрокверцетин ($C_{15}H_{12}O_7$) – вводили исследуемым животным в дозе 50 мг/кг, внутривентриально. 3-месячным крысам-самцам дигидрокверцетин вводили за 1 час до каждого гипоксического воздействия. Новорожденным животным дигидрокверцетин вводили с 2 по 6 сутки жизни ежесуточно. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество стерильного изотонического раствора хлорида натрия в аналогичном режиме. Всего в эксперименте использовано 378 животных.

Сразу после эвтаназии, у 7-суточных животных осуществляли забор головного мозга (без обонятельных луковиц), ушной раковины, сердца, печени, фрагмента нижней челюсти. У 3-месячных животных осуществляли забор головного мозга (без обонятельных луковиц), тимуса, глазного яблока, сердца, печени, фрагмента двенадцатиперстной кишки с поджелудочной железой, крови. Фиксацию и приготовление гистологических препаратов проводили по общепринятой методике.

Для анализа процессов синтеза ДНК применяли метод автордиографии. Приготовление радиоавтографов осуществляли по принятой в лаборатории

методике. Использовали ядерную фотоэмульсию Iford (Великобритания). Определяли индекс меченых ядер (ИМЯ) и интенсивность метки (ИМ) в коже ушной раковины, миокарде, печени, неокортексе и гиппокампе головного мозга 7-суточных животных.

Показатели ядрышкового аппарата анализировали в энамелобластах зубного зачатка, кардиомиоцитах, гладких миоцитах двенадцатиперстной кишки, гланулоцитах поджелудочной железы и гепатоцитах, окрашенных по методу AgNOR (Коржевский Д.Э., Гиляров А.В., 2010).

Интенсивность свободнорадикальных процессов оценивали методом хемилюминесценции (ХМЛ) в гомогенатах сердца, головного мозга, печени, а также сыворотке крови половозрелых животных (Владимиров Ю.А., Проскурнина Ю.В., 2009). Определяли: светосумму за 1 мин. спонтанной ХМЛ (S_{sp}), величина которой коррелирует с интенсивностью свободнорадикальных процессов; максимум быстрой вспышки ($H1$) индуцированной ХМЛ, свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов; светосумму ($S1_{ind}$) за 2 мин. после "быстрой" вспышки, отражающую интенсивность накопления перекисных радикалов. Кинетику ХМЛ, инициированную H_2O_2 в присутствии люминола (Арутюнян А.В. и соавт., 2000), анализировали по двум параметрам: максимуму быстрой вспышки ($H2$), указывающему на потенциальную способность исследуемого биосубстрата к перекисному окислению и светосумме ($S2_{ind}$) за 2 мин., величина которой зависит от активности антиоксидантной антирадикальной систем защиты.

В сыворотке крови определяли уровень NGF (фактора роста нервов) методом иммуноферментного анализа (Rat Nerve Growth Factor (NGF) ELISA Kit компании Cusabio Biotech Co., Ltd, Китай).

Объектом исследования *in vitro* служила первичная культура пульмональных фибробластов 1-суточных белых крыс породы Wistar. Окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду 0,001мл 3 % H_2O_2 (60 мкМ) с экспозицией в течение 2 часов (Самохвалов В.А. и соавт., 2003). Инкубацию пульмональных фибробластов с дигидрокверцетином проводили в течение 6 часов при концентрации вещества в культуральной

среде 10^{-7} М. ДНК-синтетическую активность пульмональных фибробластов исследовали методом автордиографии с ^3H -тимидином. Параметры ядрышкового аппарата клеток оценивали с помощью компьютерной морфоцитометрии на анализаторе изображения «МЕКОС-Ц» в монослоях фибробластов, окрашенных по методу AgNOR. Для оценки процессов генерации пульмональными фибробластами супероксид-анион радикала использовали метод люцигенин-зависимой хемилюминесценции (Владимиров Ю.А., Проскурнина Ю.В., 2009).

Статистические выборки подвергали исследованию на нормальность распределения, используя W-критерий Шапиро-Уилка. Определяли среднюю арифметическую величину (M), ее стандартную ошибку (m). Сравнение этих показателей между группами «опыт» - «контроль» проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия показателей считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты исследования обрабатывали с использованием программы «Statistica 6.0».

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Влияние окислительного стресса на показатели пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций

У половозрелых животных, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии, гравиметрические исследования выявили увеличение массы сердца на 15,21% и уменьшение массы тимуса на 25,75%.

Хемилюминесцентный анализ биосубстратов половозрелых животных, подвергнутых гипоксии, выявил выраженный окислительный стресс на системном уровне: в сыворотке крови увеличение $S_{sp.}$ в 2,55, $H1$ в 3,06; $S1_{ind}$ в 2,41, $H2$ в 2,26, $S2_{ind}$ в 2,39 раз; и на органом уровне: гомогенатах мозга, сердца и печени (увеличение $S_{sp.}$ в 2,75, 3,05, 3,74, $H1$ в 2,1, 1,67, 2,4; $S1_{ind}$ в 1,8, 2,83, 3,25, $H2$ 3,08, 2,38, 3,15, $S2_{ind}$ в 3,17, 2,63, 3,51 раз соответственно).

В миокарде половозрелых животных после гипоксического воздействия было зарегистрировано существенное снижение морфометрических показателей нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов (таблица 1).

Таблица 1 - Показатели нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

	Группа животных «Контроль» (n=12)	Группа животных «Гипоксия» (n=13)
Левый желудочек		
Площадь ядра (мкм ²)	48,80±1,16	43,97±1,23*
Суммарная площадь ядрышек (мкм ²)	3,69±0,14	3,18±0,12*
Количество ядрышек	1,97±0,07	2,04±0,14
Правый желудочек		
Площадь ядра (мкм ²)	50,45±1,53	39,95±1,21*
Суммарная площадь ядрышек (мкм ²)	2,75±0,10	2,02±0,10*
Количество ядрышек	1,93±0,03	2,00±0,05

Примечание -* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра (p<0,05)

Анализ структур пищеварительной системы половозрелых животных, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии, показал уменьшение количества ядрышек в ядрах гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки и в ядрах экзокриноцитов поджелудочной железы (таблица 2).

Таблица 2 - Количество ядрышек в ядрах клеток пищеварительной системы 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипоксии

	Группа животных «Контроль» (n=12)	Группа животных «Гипоксия» (n=13)
Миоциты мышечной оболочки двенадцатиперстной кишки	2,06±0,05	1,84±0,04*
Экзокриноциты поджелудочной железы	2,12±0,07	1,87±0,07*

Примечание -* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра (p<0,05)

Гравиметрические показатели 7-суточных животных после перенесенной антенатальной гипоксии отличались от показателей контрольной группы: имело место снижение массы тела на 24,8%, абсолютной массы печени на 19,21%, массы сердца на 25,6%. ДНК-синтетические процессы угнетались в головном мозге, сердце, печени и эпителии кожи подопытных животных (таблица 3).

Таблица 3 - Показатели ДНК-синтетических процессов (ИМЯ, %) в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Орган	Группа животных «Контроль» (n=13)	Группа животных «Антенатальная гипоксия» (n=12)
Нейроны собственно-теменной доли коры больших полушарий	1,096±0,233	0,571±0,049*
Нейроны поля СА1 гиппокампа	0,728±0,155	0,337±0,061*
Кардиомиоциты левого предсердия	5,76±0,67	3,87±0,29*
Кардиомиоциты правого предсердия	5,49±0,67	3,80±0,29*
Кардиомиоциты левого желудочка	8,33±0,67	5,60±0,21*
Кардиомиоциты правого желудочка	6,56±0,64	4,33±0,17
Гепатоциты	2,37±0,44	1,34±0,26*
Эпителиоциты кожи	10,79±1,38	7,58±0,68*
Фибробласты дермы кожи	5,59±0,62	4,53±0,29

Примечание -* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра (p<0,05)

Антенатальная гипоксия уменьшала количество ядрышек в ядрах нейронов II-го слоя неокортекса, энамелобластов и гепатоцитов на 19,2%, 16% и 6%, соответственно.

Воздействие на культивируемые пульмональные фибробласты среды с 60 мкМ перекиси водорода индуцировало повышение интенсивности люцигенен-зависимой ХМЛ в культуре на 78,3%. Этот эффект сочетался с практически полной блокадой ДНК-синтетических процессов в культуре, значительным уменьшением количества ядрышек в ядрах фибробластов, снижением на 63 % показателя площади ядер и на 51,6 % суммарной площади ядрышек фибробластов.

Влияние дигидрокверцетина на пролиферативную и анаболическую активность различных клеточных популяций в условиях окислительного стресса

Введение дигидрокверцетина 3-месячным белым крысам за 1 час до гипоксического воздействия нивелировало негативное влияние гипоксии на массу тимуса и сердца животных. Хемилюминесцентный анализ исследуемых субстратов половозрелых животных, подвергнутых пятикратному

гипоксическому воздействию с предварительным введением дигидрохверцетина, выявил уменьшение проявления окислительного стресса: ХМЛ-параметры этой группы были меньше, чем показатели животных, подвергнутых гипоксии без введения биофлавоноида. Это свидетельствует о проявлении системного антиоксидантного эффекта при гипоксическом воздействии.

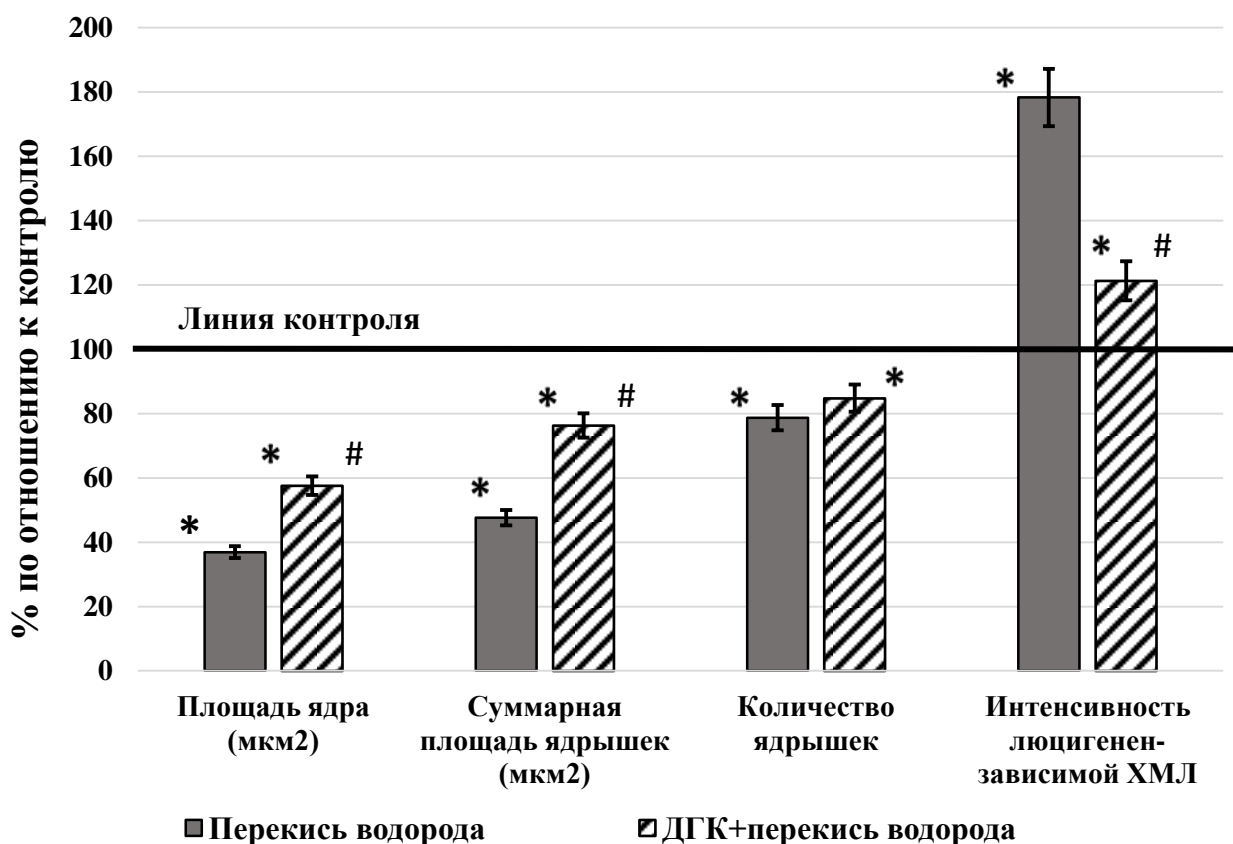
Дигидрохверцетин нивелировал негативное влияние гипоксии на нуклеолярный аппарат гладких миоцитов кишечника и клеток поджелудочной железы.

Однако, в других тканях эффект прегипоксического введения антиоксиданта имел иную направленность. В миокарде подопытных животных уменьшились размеры ядер кардиомиоцитов на 24,9% в левом желудочке и на 43% в правом желудочке. Анализ митотической активности переднего эпителия роговицы животных этой экспериментальной группы выявил изменения структуры митотического цикла с достоверным снижением доли метафаз на 37,96%; возрастанием доли телофаз на 67,7%; увеличением в 1,59 раза профазно-метафазного коэффициента и 4-кратным повышением количества патологических митозов.

У новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, введение дигидрохверцетина нивелировало негативные постгипоксические последствия в отношении ДНК-синтетической активности гепатоцитов, эпителиоцитов кожи и нейронов неокортекса и способствовало нормализации среднего количества ядрышек в ядрах гепатоцитов, энамелобластов. В ядрах нейронов неокортекса, кардиомиоцитов было зарегистрировано увеличение количества ядрышек.

Инкубация пульмональных фибробластов с дигидрохверцетином перед воздействием H_2O_2 существенно уменьшала генерацию супероксид-анион радикала в культуре, восстанавливала показатели нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов (рисунок 1).

Таким образом, влияние дигидрокверцетина на анаболическую активность клеток в условиях окислительного стресса было неоднозначным: имел место широкий спектр типов реакций – от полного или частичного



Примечание - * - достоверное отличие показателя от контрольного параметра, # - отличия достоверны по отношению к группе «Перекись водорода» ($p < 0,05$)

Рисунок 1 - Параметры нуклео-нуклеолярного аппарата и ХМЛ-анализа в первичной культуре пульмональных фибробластов, подвергнутых воздействию дигидрокверцетина (ДГК) и перекиси водорода

нивелирования негативных изменений до потенцирования негативных влияний окислительного стресса.

Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции белых крыс

Введение дигидрокверцетина 3-месячным крысам вызывало выраженный антиоксидантный эффект в 90% исследованных ХМЛ-показателях: снижение показателей в сыворотке крови S_{sp} на 37,76%, S_{1ind} на 36,85%, $H1$ на 17,83%,

S2_{ind} на 17%; H2 на 33,3%; в гомогенатах головного мозга S_{sp} – на 32,06%, S1_{ind} – на 23,45%, H1 – на 45,54%, S2_{ind} – на 25,42%, H2 – на 29,17%; в гомогенатах сердца S_{sp} – на 29%; S1_{ind} – на 24%; H1 – на 25,5%; S2_{ind} – на 21,2%; H2 – на 38,7%; в гомогенатах печени S_{sp} на 34,8%, S1_{ind} – на 29,5%, S2_{ind} – на 24,8%, H2 – на 34,9%.

Дигидрокверцетин стимулировал нуклеолярный аппарат нейронов головного мозга половозрелых животных: наблюдалось увеличение количества ядрышек в ядрах нейронов V слоя неокортекса собственно теменной доли на 9,5%, сочетанное с возрастанием доли ядер с 4 ядрышками в II слое неокортекса собственно теменной доли. Иммуноферментное исследование сыворотки крови выявило возрастание уровня фактора роста нервов (NGF) у 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых 5-кратному введению дигидрокверцетина (контроль - $60,32 \pm 12,87$ пг/мл; опыт - $98,54 \pm 12,49^*$ пг/мл; $p=0,01$), что подтверждает нейротрофическое действие биофлавоноида.

В миокарде 3-месячных белых крыс имели место негативные изменения морфометрических показателей нуклео-нуклеолярного аппарата после воздействия антиоксиданта: в кардиомиоцитах левого желудочка площадь ядер уменьшилась на 14%; суммарная площадь ядрышек – на 31,2%; в кардиомиоцитах правого желудочка площадь ядер снизилась на 33,2%; суммарная площадь ядрышек – на 13,4%.

Аналогичный эффект зарегистрирован и при анализе нуклеолярного аппарата клеток органов пищеварения: произошло снижение среднего количества ядрышек в миоцитах двенадцатиперстной кишки и в экзокриноцитах поджелудочной железы на 14% и 20%, соответственно.

После воздействия дигидрокверцетина у половозрелых животных на 45,7% снизился митотический индекс эпителия роговицы, уменьшилось количество метафаз на 38,6%, увеличилось количество телофаз на 134,4%, и в 2,97 раза возросла доля патологических митозов.

Введение дигидрокверцетина новорожденным белым крысам с 2 по 6 сутки жизни стимулировало в 2,4 раза ДНК-синтетические процессы в

нейронах поля СА1 гиппокампа; наблюдалось возрастание количества ядрышек гепатоцитов на 8,8%, кардиомиоцитов правого желудочка на 9,5%.

Воздействие антиоксиданта на первичную культуру пульмональных фибробластов индуцировало угнетение продукции супероксид-анион радикала (снижение интенсивности люцигенен-зависимой ХМЛ на 35,5%).

Морфометрическое исследование ядер фибробластов выявило уменьшение их размеров и суммарной площади ядрышек (таблица 4).

Таблица 4 - Параметры ядрышкового аппарата в первичной культуре пульмональных фибробластов при воздействии дигидрохверцетина (ДГК)

Исследуемая серия	Площадь ядра (мкм ²)	Суммарная площадь ядрышек (мкм ²)	Количество ядрышек
Серия клеток «Контроль»	218,60 ± 4,39	17,03 ± 0,39	3,95 ± 0,07
Серия клеток «ДГК»	197,94 ± 3,94* p=0,03	15,70 ± 0,37* p=0,01	3,98 ± 0,08

Примечание -* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра (p<0,05)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакция организма на окислительный стресс в периоде новорожденности и у взрослых млекопитающих была принципиально сходной и выражалась в угнетении анаболических процессов в различных клеточных популяциях. Сходный эффект мы наблюдали и при воздействии окислительного стресса на первичную культуру пульмональных фибробластов. Это свидетельствует о повреждающем влиянии избытка активных форм кислорода на клетки *in vitro* и *in vivo*.

У взрослых животных введение антиоксиданта перед воздействием гипоксии улучшало состояние некоторых клеточных популяций (миоциты мышечной оболочки двенадцатиперстной кишки, экзокриноциты поджелудочной железы), в то время как в других (кардиомиоциты, эпителиоциты роговицы) патологическое состояние нуклео-нуклеолярного аппарата потенцировалось. Причина ухудшения анаболических процессов в некоторых видах клеток при воздействии антиоксиданта при окислительном стрессе может быть обусловлена значимой ролью активных форм кислорода в

запуске компенсаторно-адаптационных реакций клетки на гипоксию, в формировании ишемического пре- и посткондиционирования.

Реакция новорожденных животных на воздействие антиоксиданта была однонаправленной: во всех исследованных клеточных популяциях дигидрохверцетин корректировал неблагоприятные последствия антенатального гипоксического воздействия. Выявленные различия могут быть обусловлены онтогенетическими особенностями: неонатальный период развития млекопитающих характеризуется явлениями окислительного стресса, ещё более выраженными у организма, родившегося после состояния антенатальной гипоксии. В условиях генерации избыточных концентраций свободных радикалов, использование антиоксиданта может существенно улучшить состояние клеточных популяций.

В эксперименте *in vitro* дигидрохверцетин уменьшал индуцированное перекисью водорода образование супероксид-анион радикала, частично нивелировал угнетение пролиферативной активности и показателей нуклео-нуклеолярного аппарата клеток.

Введение антиоксиданта половозрелым животным на интактном фоне привело к снижению показателей нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов, миоцитов двенадцатиперстной кишки, экзокриноцитов поджелудочной железы; уменьшению пролиферативной активности эпителиоцитов переднего эпителия роговицы, сочетанное со значительным возрастанием количества патологических митозов.

Пятикратное введение дигидрохверцетина новорожденным животным с 2 по 6 сутки жизни (на интактном фоне) стимулировало синтез ДНК в нейронах головного мозга, повышало анаболическую активность гепатоцитов и кардиомиоцитов.

Воздействие дигидрохверцетина *in vitro* уменьшало генерацию супероксид-анион радикала в культивируемых фибробластах и снижало показатели нуклео-нуклеолярного аппарата клеток.

Таким образом, можно отметить, что снижение концентрации АФК ниже физиологических значений при воздействии дигидрохверцетина угнетало

пролиферативную и анаболическую активность некоторых клеточных популяций. Исключение составляли клетки головного мозга, где антиоксидант, напротив, оказывал стимулирующий эффект на нуклеолярный аппарат ядер нейронов, сопровождающийся значительным увеличением содержанием фактора роста нервов (NGF) в сыворотке крови.

Анализируя, в целом, результаты проведенного исследования, можно заключить, что биофлавоноидный антиоксидант, снижающий активность свободнорадикальных процессов, оказывает защитное влияние на анаболические процессы при тяжелом окислительном стрессе, но может ухудшать состояние клеток при нормальном редокс-статусе, за счет чрезмерной элиминации активных форм кислорода, которые в физиологических количествах являются фактором мобилизации защитных систем клетки.

ВЫВОДЫ

1. Гипобарическая гипоксия индуцирует у половозрелых белых крыс активацию свободнорадикальных процессов на системном и органном уровнях, вызывает снижение размеров ядер и ядрышек в кардиомиоцитах, уменьшение количества ядрышек в миоцитах кишечника и экзокриноцитах поджелудочной железы, что свидетельствует о состоянии клеточного стресса.

2. Введение половозрелым белым крысам биофлавоноидного антиоксиданта дигидрокверцетина перед гипоксическим воздействием нивелирует постгипоксические изменения массы тимуса и сердца, существенно уменьшает активацию свободнорадикального окисления, как на организменном, так и на органном уровне. При этом имеют место разнонаправленные тканеспецифические изменения количества ядрышек в клетках различных клеточных популяций: уменьшаются количества ядрышек в ядрах нейронов гиппокампа, снижаются морфометрические показатели нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов; происходит нормализация количества ядрышек в ядрах миоцитов кишечника и экзокриноцитов поджелудочной железы.

3. Введением биофлавоноидного антиоксиданта дигидрохверцетина половозрелым белым крысам на интактном фоне приводит выраженному угнетению свободнорадикального окисления и к разнонаправленным тканеспецифическим изменениям количества ядрышек в клетках различных клеточных популяций. Имеет место увеличение количества ядрышек в ядрах нейронов неокортекса, что сопровождается повышением уровня фактора роста нервов в сыворотке крови животных. Наблюдается угнетение нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов, миоцитов кишечника, экзокриноцитов поджелудочной железы. В эпителии роговицы подопытных животных имеет место значительное снижение количества делящихся эпителиоцитов с изменением соотношения фаз митоза и возрастанием доли патологических митозов.

4. Антенатальная гипоксия приводит к угнетению ДНК-синтетических процессов в неокортексе и гиппокампе головного мозга, в миокарде, печени и эпидермисе новорожденных белых крыс; регистрируется уменьшение количества ядрышек в ядрах нейронов неокортекса, гепатоцитов, энамелобластов зубных зачатков, что свидетельствует о значительном угнетении анаболической активности тканей.

5. У новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению антиоксиданта дигидрохверцетина, отсутствует постгипоксическое снижение параметров анаболической активности исследованных клеточных популяций; более того, имеет место стимуляция синтеза ДНК в гиппокампе и увеличение количества ядрышек в кардиомиоцитах желудочков сердца.

6. Введение в периоде новорожденности на интактном фоне биофлавоноидного антиоксиданта дигидрохверцетина приводит к увеличению количества ядрышек в ядрах гепатоцитов и кардиомиоцитов. Сопутствующее снижение синтеза ДНК в кардиомиоцитах может быть отражением ускорения процессов дифференцировки.

7. В первичной культуре пульмональных фибробластов, при воздействии перекиси водорода, активация свободнорадикального окисления сопровождается резким угнетением пролиферативной активности клеток, уменьшением размеров ядер, снижением размеров и количества ядрышек. Предварительное воздействие антиоксиданта дигидрохверцетина уменьшает активность генерации супероксид-анион радикала; при этом наблюдается частичное восстановление ДНК-синтетических процессов и снижение негативных изменений нуклеолярного аппарата клеток. Подавление антиоксидантом базальной генерации супероксид-анион радикала сопровождается уменьшением размера ядер и ядрышек клеток.

8. Снижение выраженности окислительного стресса при введении антиоксиданта дигидрохверцетин оказывает преимущественно позитивное влияние на пролиферативную и анаболическую активность клеточных популяций в условиях окислительного стресса *in vitro* и *in vivo*. Однако, у половозрелых животных, антиоксидант способен снизить показатели анаболической активности некоторых клеточных популяций, что, вероятно, связано с ролью активированных кислородных метаболитов в поддержании структурного гомеостаза.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Яковенко, Д. В. Влияние дигидрохверцетина на некоторые показатели структурного гомеостаза в различных клеточных популяциях белых крыс / Д.В. Яковенко, Я.О. Ермоленко // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 67-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск, 2010. – С. 97-98.

2. Яковенко, Д. В. Влияние антенатальной гипоксии на пролиферативные процессы в популяции клеток кожи новорожденных белых крыс / Д.В. Яковенко, Я.О. Ермоленко // Актуальные вопросы современной

медицины: материалы 68-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск, 2011. – С. 120-122.

3. Влияние дигидрохверцетина на анаболическую активность гепатоцитов новорожденных белых крыс / Е. Н. Сазонова, О. Г. Пинаева, А. М. Ивасюк, О. В. Дещеня, Д. В. Яковенко // Теоретические, экспериментальные и практические основы формирования регионального рынка БАДов Материалы региональной научно – практической конференции Дальневосточного государственного медицинского университета. – Хабаровск, 2013. – С. 41-45.

4. Яковенко, Д. В. Влияние антенатальной гипоксии на пролиферативные процессы в популяции клеток кожи новорожденных белых крыс / Д.В. Яковенко, Ермоленко Я.О. // Теоретические, экспериментальные и практические основы формирования регионального рынка БАДов Материалы региональной научно – практической конференции Дальневосточного государственного медицинского университета. – Хабаровск, 2013. – С. 49-53.

5. Яковенко, Д. В. Влияние дигидрохверцетина на некоторые показатели структурного гомеостаза в различных клеточных популяциях белых крыс / Д. В. Яковенко, А. А. Симакова, О. Г. Пинаева // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 70-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск, 2013. – С. 36-40.

6. Влияние антенатальной гипоксии на некоторые показатели тканевого гомеостаза в печени белых крыс / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Д. В. Яковенко, С. С. Тимошин, С. К. Пинаев, Е. Н. Сазонова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - №3. – С. 301-304

7. Влияние дигидрохверцетина на структурный гомеостаз различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс / Д. В. Яковенко, А. А. Симакова, О. Г. Пинаева, Е. Н. Сазонова // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: материалы 1 региональной научно-

практической конференции Дальневосточного государственного медицинского университета. – Хабаровск, 2014. – С. 61-65.

8. Мамрукова, Н. А. Влияние дигидрохлорокверцетина на ядрышковый аппарат кардиомиоцитов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию / Н. А. Мамрукова, Д. В. Яковенко // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 72-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск. – 2015. – С. 347-348.

9. Томсинская, А. Е. Цитопротективное влияние дигидрохлорокверцетина при оксидативном стрессе в первичной культуре пульмональных фибробластов / А. Е. Томсинская, Д. В. Яковенко // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 72-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск, 2015. – С. 355-356.

10. Цитопротекторный эффект дигидрохлорокверцетина в первичной культуре фибробластов легких белых крыс в условиях окислительного стресса / Е. Н. Сазонова, Д. В. Яковенко, О. А. Лебедько, И. М. Мальцева, С. С. Тимошин // Дальневосточный медицинский журнал. – 2015. - №4. - С. 80-83.

11. Яковенко, Д. В. Влияние дигидрохлорокверцетина на пролиферативную и анаболическую активность в различных клеточных популяциях белых крыс в условиях окислительного стресса / Д.В. Яковенко // Молодые ученые - Хабаровскому краю. Материалы XVII краевого конкурса молодых ученых и аспирантов / под ред. С. М. Буркова (и др.). – Хабаровск, 2015. – С. 289-294.

12. Яковенко, Д. В. Цитопротективный эффект дигидрохлорокверцетина в условиях оксидативного стресса *in vitro*. // Молодые ученые - Хабаровскому краю. Материалы XVIII краевого конкурса молодых ученых и аспирантов / под ред. С. М. Буркова (и др.). – Хабаровск, 2016. - С. 482 -491.

13. Амиров, Т. Б. Влияние дигидрохлорокверцетина на митотическую активность эпителия роговицы в условиях оксидативного стресса / Т. Б. Амиров, Д. В. Яковенко // Актуальные вопросы современной медицины:

материалы 73-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск, 2016. – С. 29-31.

14. Самохвалов, Н. В. Особенности влияния гипоксического воздействия и антиоксиданта на параметры ядрышкового организатора клеток миокарда и головного мозга белых крыс / Н. В. Самохвалов, Д. В. Яковенко // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 73-й итоговой научной конференции молодых ученых и студентов Дальневосточного государственного медицинского университета с международным участием. – Хабаровск, 2016. – С. 48-50.

15. Самохвалов, Н. В. Особенности влияния гипоксического воздействия и антиоксиданта на параметры ядрышкового организатора клеток миокарда и головного мозга белых крыс / Н. В. Самохвалов, Д. В. Яковенко, С. Миида // Материалы всероссийского молодежного форума с международным участием. – Ставрополь, 2016. – С. 442-443.

16. Iakovenko, D. V. Cytoprotective effect of Taxifolin on the pulmonary fibroblasts culture, exposed to oxidative stress. / D. V. Iakovenko, O. A. Lebed'ko, E. N. Sazonova // 2016 World Life Science Conference Poster Presentation Abstract. – Beijing, 2016. - P. 326.

17. Амиров, Т. Б. Влияние дигидрокверцетина на митотическую активность эпителия роговицы в условиях оксидативного стресса / Т. Б. Амиров, Д. В. Яковенко // Фундаментальная наука в современной медицине 2017: материалы сателлитной дистанционной научно-практической конференции студентов и молодых ученых / под ред. А.В. Сикорского (и др.). – Минск, 2017. - С. 13-15.

18. Влияние дигидрокверцетина на некоторые показатели тканевого гомеостаза миокарда белых крыс при гипоксии / Д. В. Яковенко, М. Suguru, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: материалы III региональной научно-практической конференции Дальневосточного государственного медицинского университета,

посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ С.С. Тимошина. – Хабаровск, 2017. - С. 75-80.

19. Яковенко, Д. В. Цитопротективное действие дигидрохверцетина в условиях окислительного стресса / Д. В. Яковенко // Молодые ученые - Хабаровскому краю. Материалы XX краевого конкурса молодых ученых и аспирантов. – Хабаровск, 2018. - С. 286 -295.

20. Яковенко, Д. В. Цитопротективное действие дигидрохверцетина при окислительном стрессе / Д. В. Яковенко, Е. Н. Сазонова, О. А. Лебедько // Актуальные проблемы биомедицины – 2018 : материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2018, - С. 266-268.

21. Биосинтетические процессы в кардиомиоцитах белых крыс после введения биофлавоноида дигидрохверцетина / Е. Н. Сазонова, Д. В. Яковенко, О. А. Лебедько, А. Ю. Марочко, С. Л. Жарский, В. А. Добрых, М. Ф. Рзянкина, Т. В. Чепель // Якутский медицинский журнал. – 2018. - №3, Т. 63. – С. 109-112.

22. Проллиферативные, анаболические и свободнорадикальные процессы в организме белых крыс после введения дигидрохверцетина / Е. Н. Сазонова, Д. В. Яковенко, Н. В. Самохвалов, Т. Б. Амиров, О. А. Лебедько // Дальневосточный медицинский журнал. – 2018. - №1. – С. 92-96.

23. Влияние дигидрохверцетина на пролиферативные и анаболические процессы в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии / Д. В. Яковенко, Е. Н. Сазонова, А. А. Симанкова, М. Ф. Рзянкина, Т. В. Чепель, Т. В. Заболотских, О. Г. Пинаева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. - Т. 82, №4. – С. 41-44.