

# Отчет о проверке на заимствования №1



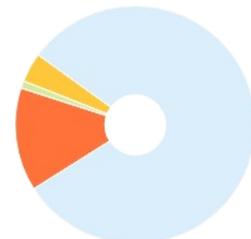
**Автор:** Яковенко Дарья Валерьевна  
**Проверяющий:** Клеутина Татьяна Александровна ([tak051083@gmail.com](mailto:tak051083@gmail.com) / ID: 2)  
**Организация:** Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания  
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://cfpd.antiplagiat.ru>

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

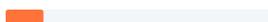
№ документа: 47  
 Начало загрузки: 22.06.2021 04:30:17  
 Длительность загрузки: 00:00:39  
 Имя исходного файла: Диссертация \_Яковенко Д.В.(антипл).pdf  
 Название документа: Диссертация \_Яковенко Д.В.(антипл)  
 Размер текста: 1 кБ  
 Символов в тексте: 177450  
 Слов в тексте: 18385  
 Число предложений: 550

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

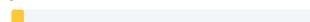
Последний готовый отчет (ред.)  
 Начало проверки: 22.06.2021 04:30:57  
 Длительность проверки: 00:00:39  
 Комментарии: не указано  
 Поиск с учетом редактирования: да  
 Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс, Сводная коллекция РГБ, сfpd, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, Медицина, Диссертации НББ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по Интернету, Патенты СССР, РФ, СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



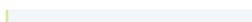
### ЗАИМСТВОВАНИЯ

13,98% 

### САМОЦИТИРОВАНИЯ

4,19% 

### ЦИТИРОВАНИЯ

1,02% 

### ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

80,81% 

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.  
 Самоцитирование — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.  
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.  
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.  
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.  
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.  
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.  
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарии
[01]	2,17%	Симанкова, Анна Александровна Влияние биологически активных пептидов семейства опиоидов на морфофункциональные показатели развития головного мозга белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.03.03 Са... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	
[02]	1,3%	Самарина, Елена Юрьевна Нарушения пролиферативных и анаболических процессов при окислительном стрессе и их коррекция аналогом дерморфина : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.03.03 Санкт-Петербург 2017 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	
[03]	0,18%	<a href="https://esu.citis.ru/dissertation/Y3G6NMRU8NTZVPTRUQHSDX02">https://esu.citis.ru/dissertation/Y3G6NMRU8NTZVPTRUQHSDX02</a> <a href="https://esu.citis.ru">https://esu.citis.ru</a>	21 Мар 2018	Интернет Плюс	
[04]	1,12%	Цитопротективный эффект дигидрокверцетина в первичной культуре пульмональных фибробластов белых крыс в условиях оксидативного стресса. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	04 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[05]	0,52%	<a href="https://esu.citis.ru/dissertation/9QO6QUE5XM47DOGQVBFUJZQ7">https://esu.citis.ru/dissertation/9QO6QUE5XM47DOGQVBFUJZQ7</a> <a href="https://esu.citis.ru">https://esu.citis.ru</a>	21 Мар 2018	Интернет Плюс	
[06]	0,04%	Электронная библиотека ДВГМУ :: Цитопротективный эффект дигидрокверцетина в первичной культуре пульмональных фибробластов белых крыс в условиях оксидативного стресса <a href="http://fesmu.ru">http://fesmu.ru</a>	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[07]	1,4%	Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Гистология,.... <a href="http://earthpapers.net">http://earthpapers.net</a>	28 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[08]	1,07%	ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ, АНАБОЛИЧЕСКИЕ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	17 Июл 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
		Цитопротективный эффект дигидрокверцетина в первичной			

[09]	1,85%	культуре пульмональных фибробластов белых крыс в условиях оксидативного стресса. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	04 Авг 2016	eLIBRARY.RU
[10]	0,62%	Крыжановская, Светлана Юрьевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 03.00.25 Владивосток 2008 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ
[11]	0,66%	Толстенок, Иван Владимирович Изучение влияния глипролинов и их аргининсодержащих аналогов на состояние тканевого гомеостаза покровного эпителия : диссертация ... кандидата биологических наук : 14.03.06 Владивосток 2017 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ
[12]	1,46%	Биосинтетические процессы в кардиомиоцитах белых крыс после введения биофлавоноида дигидрокверцетина. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	27 Окт 2018	eLIBRARY.RU
[13]	0,26%	Влияние регуляторных пептидов семейства опиоидов на ранние постнатальные церебральные последствия антенатальной гипоксии. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	04 Авг 2016	eLIBRARY.RU
[14]	0,08%	Пинаева, Ольга Геннадьевна Структурно-функциональное состояние печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, и коррекция возникающих нарушений аналогами лей-энкефалина : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.03.03 Хабаровск 2017 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2017	Сводная коллекция РГБ
[15]	0,79%	Биосинтетические процессы в кардиомиоцитах белых крыс после введения биофлавоноида дигидрокверцетина. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	27 Окт 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[16]	0,09%	Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза <a href="http://netess.ru">http://netess.ru</a>	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[17]	0,52%	Симанкова, Анна Александровна Влияние биологически активных пептидов семейства опиоидов на морфофункциональные показатели развития головного мозга белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.03... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2017	Сводная коллекция РГБ
[18]	0,21%	Влияние неонатального введения опиоидного пептида даларгин на отдаленные церебральные последствия антенатальной гипоксии. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	14 Янв 2020	eLIBRARY.RU
[19]	0%	Цитопротективное влияние агониста m/d-опиоидных рецепторов пептида седатина на первичную культуру пульмональных фибробластов белых крыс в условиях оксидативного стресса. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	04 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[20]	0,13%	Влияние антенатальной гипоксии на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени белых крыс. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	11 Мая 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[21]	0,88%	ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ, АНАБОЛИЧЕСКИЕ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	17 Июл 2018	eLIBRARY.RU
[22]	0%	Диссертация на тему «Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза», скачать бесплатно автореферат по специальности ВАК РФ 03.00.25 - Гистология... <a href="https://dissercat.com">https://dissercat.com</a>	17 Мар 2021	Интернет Плюс
[23]	0,02%	Электронная библиотека ДВГМУ :: Цитопротективный эффект дигидрокверцетина в первичной культуре пульмональных фибробластов белых крыс в условиях оксидативного стресса <a href="http://fesmu.ru">http://fesmu.ru</a>	01 Окт 2016	Интернет Плюс
[24]	0,05%	Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Гистология,... <a href="http://earthpapers.net">http://earthpapers.net</a>	17 Мар 2021	Интернет Плюс
[25]	0,14%	Цитопротективный эффект неопиатного аналога лей-энкефалина в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	25 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[26]	0%	Участие регуляторных пептидов в поддержании тканевого гомеостаза слизистой оболочки желудка <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина
[27]	0,15%	Онтогенетические особенности влияния опиоидного пептида седатин на количество ядрышек и процессы свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	15 Ноя 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[28]	0%	Белолубская, Дария Степановна диссертация ... кандидата медицинских наук : 03.00.25 Владивосток 2008 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ
[29]	0%	Крыжановская, Светлана Юрьевна Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 03.00.25 Владив... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	21 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ

[30]	0,03%	скачать <a href="https://cfpd.amursu.ru">https://cfpd.amursu.ru</a>	10 Фев 2018	Интернет Плюс
[31]	0,21%	Цитопротективный эффект неопиатного аналога лей-энкефалина в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	25 Янв 2019	eLIBRARY.RU
[32]	0,08%	Гусева, Ольга Евгеньевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.01.08 Хабаровск 2010 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ
[33]	0,24%	Дальневосточный медицинский журнал <a href="http://fesmu.ru">http://fesmu.ru</a>	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[34]	0,05%	Онтогенетические особенности влияния опиоидного пептида седатин на количество ядрышек и процессы свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	15 Ноя 2015	eLIBRARY.RU
[35]	0%	Лазинская, Ольга Владимировна Морфологические особенности развития коры головного мозга крыс при экспериментальной акселерации : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.03.04 Хабаровск 2016 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ
[36]	0%	Клинико-патогенетическое обоснование применения даларгина у пациентов с синдромом раздраженного кишечника с диареей и синдромом избыточного бактериального роста <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина
[37]	0,52%	не указано	раньше 2011	Шаблонные фразы
[38]	0,5%	не указано	раньше 2011	Цитирование
[39]	0,15%	Исмаилов, Руслан Самедович Сравнительный анализ развития и течения бактериального простатита, вызываемого различными уропатогенами : экспериментально-клиническое исследование : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.01.23 Ростов-на-Дону 2020 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	16 Июнь 2021	Сводная коллекция РГБ
[40]	0,06%	Цитопротективный эффект эхинохрома А в первичной культуре пульмональных фибробластов белых крыс в условиях окислительного стресса. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	18 Июнь 2020	eLIBRARY.RU
[41]	0%	Загородний, Александр Сергеевич Структурно-метаболический и ультраструктурный анализ пролиферативной активности эпителия слизистой оболочки полости рта при красном плоском лишае : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.03.02, 03.03.04 Ново... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	30 Июл 2012	Сводная коллекция РГБ
[42]	0%	Совершенствование системы оказания медицинской помощи работникам железнодорожного транспорта с хроническими заболеваниями легких (на примере ДВОСТЖД ОАО "РЖД") <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина
[43]	0,22%	Посмотреть текст диссертации <a href="http://wwwimb.dvo.ru">http://wwwimb.dvo.ru</a>	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[44]	0%	Оптимизация диагностики и лечения острого токсического гепатита, развившегося вследствие употребления спиртосодержащих дезинфектантов, у пациентов с алкогольной болезнью печени <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	20 Дек 2016	Медицина
[45]	0%	<a href="http://www.applied-research.ru/pdf/2012/2012_01.pdf">http://www.applied-research.ru/pdf/2012/2012_01.pdf</a> <a href="http://applied-research.ru">http://applied-research.ru</a>	02 Ноя 2020	Интернет Плюс
[46]	0%	<a href="http://www.applied-research.ru/pdf/2012/2012_01.pdf">http://www.applied-research.ru/pdf/2012/2012_01.pdf</a> <a href="http://applied-research.ru">http://applied-research.ru</a>	02 Ноя 2020	Интернет Плюс
[47]	0,11%	Влияние флавоноидов на механизмы развития окислительного стресса при токсических поражениях печени <a href="http://dslib.net">http://dslib.net</a>	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[48]	0,04%	ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ НИТРАТА СВИНЦА БЕРЕМЕННЫМ КРЫСАМ НА БИОГЕНЕЗ АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ, ЛЕГКИХ И ПОЧКАХ ИХ ПОТОМСТВА. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	29 Авг 2008	eLIBRARY.RU
[49]	0,15%	Даренская, Марина Александровна Адаптивные и дизадаптивные реакции организма при дисрегуляционных состояниях у представительниц различных этнических групп Восточной Сибири : диссертация ... доктора биологических наук : 14.03.03 Иркутск 2014 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ
[50]	0%	Влияние избытка и дефицита гормонов на морфометрические, гистохимические и биохимические показатели развития неокортекса и гиппокампа мозга крыс + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Клеточная биология, ц... <a href="http://earthpapers.net">http://earthpapers.net</a>	11 Апр 2019	Интернет Плюс
[51]	0%	Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза <a href="http://dslib.net">http://dslib.net</a>	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[52]	0%	Способ лечения вертебрально-базиллярной недостаточности. Патент РФ 2356527 <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ

[53]	0,03%	семейства опиоидов на ранние постнатальные церебральные последствия антенатальной гипоксии <a href="http://fesmu.ru">http://fesmu.ru</a>	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[54]	0%	49947 <a href="http://e.lanbook.com">http://e.lanbook.com</a>	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС
[55]	0%	Попова, Клавдия Евгеньевна Оценка состояния нейро-эндокринной системы детей 6-7 летнего возраста, перенесших критические состояния при рождении : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.01.08 Хабаровск 2017 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2017	Сводная коллекция РГБ
[56]	0%	Полиморфные генетические маркеры сахарного диабета 2-го типа и их ассоциации с клинико-метаболическими показателями в русской популяции <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	28 Апр 2017	Медицина
[57]	0,15%	СОСТОЯНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА: СВЯЗЬ С "КИСЛОРОДНО-ПЕРЕКИСНЫМИ" ЭФФЕКТАМИ В НОРМЕ ПРИ КЛЕТОЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ И АПОПТОЗЕ. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	07 Янв 2009	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[58]	0,04%	Хабаровск <a href="http://roag-school.ru">http://roag-school.ru</a>	21 Июн 2021	Интернет Плюс
[59]	0%	Репродуктивная функция, прооксидантно-антиоксидантное состояние, кислородтранспортная функция крови в системе "мать-плод" у крыс при действии бактериального эндотоксина и таурина в организме <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ
[60]	0,05%	Татарина Наталья Кирилловна Дисс.doc	20 Сен 2017	Кольцо вузов
[61]	0%	татарина наталя кирилловна Дисс. 2.doc	21 Сен 2017	Кольцо вузов
[62]	0%	Диссертация Л.И. Константинова	09 Ноя 2015	Кольцо вузов
[63]	0%	КЛИ-1	16 Ноя 2015	Кольцо вузов
[64]	0%	КЛИ 5	23 Ноя 2015	Кольцо вузов
[65]	0,22%	Коррекция опиоидным пептидом седативных постгипоксических нарушений тканевого гомеостаза различных клеточных популяций белых крыс. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	06 Янв 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[66]	0%	<a href="http://health-family.ru/upload/iblock/21e/21e6969312821297ddbed6282d364153.pdf">http://health-family.ru/upload/iblock/21e/21e6969312821297ddbed6282d364153.pdf</a> <a href="http://health-family.ru">http://health-family.ru</a>	15 Дек 2018	Интернет Плюс
[67]	0,08%	Фомин, Олег Анатольевич Фармако-токсикологические свойства ликвора и его применение при гепатозе крупного рогатого скота : диссертация ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.03 Краснодар 2019 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ
[68]	0%	татарнова наталя кирилловна Дисс. 3.doc	21 Сен 2017	Кольцо вузов
[69]	0%	татарина наталя кирилловна Дисс. 3.doc	21 Сен 2017	Кольцо вузов
[70]	0%	ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ <a href="http://lib.knigi-x.ru">http://lib.knigi-x.ru</a>	21 Дек 2020	Интернет Плюс
[71]	0%	Андреева, Наталья Николаевна диссертация ... доктора биологических наук : 03.00.13 Нижний Новгород 2007 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ
[72]	0%	Разработка способов выявления и идентификации штаммов Francisella tularensis с помощью молекулярно-генетических методов <a href="http://microbe.ru">http://microbe.ru</a>	30 Авг 2017	Интернет Плюс
[73]	0%	Шутров, Иван Евгеньевич Экспериментальное обоснование комплексной стимуляции репаративно-регенеративных процессов при повреждении седалищного нерва : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.03.03 Москва 2017 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	14 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ
[74]	0,09%	Epidemics and immigration in a local community with limited resources and external demographic pressure <a href="http://m-hikari.com">http://m-hikari.com</a>	05 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)
[75]	0%	Диссертация Салчак С.М	28 Сен 2020	Кольцо вузов
[76]	0%	КОРБОЛИНА Елена Евгеньевна ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, С КОТОРЫМИ АССОЦИИРОВАНО РАЗВИТИЕ РАННИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ У КРЫС OXYS, - PDF Скачать Бесплатно <a href="https://docplayer.ru">https://docplayer.ru</a>	11 Ноя 2020	Интернет Плюс
[77]	0%	КОРБОЛИНА Елена Евгеньевна ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, С КОТОРЫМИ АССОЦИИРОВАНО РАЗВИТИЕ РАННИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ У КРЫС OXYS, - PDF Скачать Бесплатно <a href="https://docplayer.ru">https://docplayer.ru</a>	25 Фев 2021	Интернет Плюс
[78]	0%	Структурная реорганизация и пролиферативная активность эпителия слизистой оболочки полости рта при красном плоском лишае - автореферат диссертации по медицине скачать бесплатно на тему 'Патологическая анатомия', специальность ВАК РФ 14.03.02 <a href="http://medical-diss.com">http://medical-diss.com</a>	17 Мар 2021	Интернет Плюс
		Новые подходы к созданию и экспериментальному изучению		

[79]	0%	препаратов на основе противоопухолевых ферментов <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	28 Апр 2017	Медицина
[80]	0,14%	Влияние регуляторных пептидов семейства опиоидов на ранние постнатальные церебральные последствия антенатальной гипоксии. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	04 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[81]	0%	Захарова, Наталья Алексеевна Научное обоснование и разработка технологии пробиотических биоактивных эмульсий и продуктов на их основе : диссертация ... кандидата технических наук : 05.18.07 Воронеж 2020 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ
[82]	0%	Диагностика и лечение синдрома длительного сдавления в раннем посткомпрессионном периоде (экспериментально-клиническое исследование) <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	04 Июл 2017	Диссертации НББ
[83]	0,15%	105529 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	13 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС
[84]	0%	Метаболические эффекты этаноламина при алкогольной интоксикации и отмене этанола у крыс <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	06 Дек 2018	Диссертации НББ
[85]	0%	104225 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	13 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС
[86]	0%	Возможность использования рыбного желатина для изготовления биодegradируемых пленочных композиций с целью профилактики спаячных осложнений. <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Фев 2021	eLIBRARY.RU
[87]	0%	Клинические, иммунологические и морфологические взаимосвязи у больных розацеа на фоне лечения пимекролимусом <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	20 Дек 2016	Медицина
[88]	0%	Активность (изо)ферментов креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы, содержание креатина в сыворотке крови и мышечной ткани, проницаемость эритроцитарных мембран при трихинеллезе различной степени тяжести: (Эксперимент. исслед.) <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	06 Дек 2018	Диссертации НББ
[89]	0%	Романов Д.А.	21 Мая 2015	Кольцо вузов
[90]	0%	захарова	28 Мая 2015	Кольцо вузов
[91]	0,14%	Скачать статью в формате Adobe PDF <a href="http://mediasphera.ru">http://mediasphera.ru</a>	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[92]	0%	не указано <a href="http://sgau.ru">http://sgau.ru</a>	29 Авг 2018	Интернет Плюс
[93]	0%	Материалы 16-го Всероссийского стоматологического форума и выставки Дентал-Ревю 2019, 11—13.02.19, Москва, Россия (часть 5) - Российская стоматология - 2020-01 - Издательство «Медиа Сфера» <a href="https://mediasphera.ru">https://mediasphera.ru</a>	13 Окт 2020	Интернет Плюс
[94]	0%	Материалы 16-го Всероссийского стоматологического форума и выставки Дентал-Ревю 2019, 11—13.02.19, Москва, Россия (часть 5) - Российская стоматология - 2020-01 - Издательство «Медиа Сфера» <a href="https://mediasphera.ru">https://mediasphera.ru</a>	02 Ноя 2020	Интернет Плюс
[95]	0%	Материалы 16-го Всероссийского стоматологического форума и выставки Дентал-Ревю 2019, 11—13.02.19, Москва, Россия (часть 5) - Российская стоматология - 2020-01 - Издательство «Медиа Сфера» <a href="https://mediasphera.ru">https://mediasphera.ru</a>	02 Ноя 2020	Интернет Плюс
[96]	0,02%	Фундаментальные исследования. № 6, часть 2, 2013 <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС
[97]	0%	<a href="http://www.imbp.ru/WebPages/WIN1251/Science/DisserSov/Pastushkova2015/Pastushkova-dis.doc">http://www.imbp.ru/WebPages/WIN1251/Science/DisserSov/Pastushkova2015/Pastushkova-dis.doc</a> <a href="http://imbp.ru">http://imbp.ru</a>	06 Фев 2019	Интернет Плюс
[98]	0%	Нарушение процессов перекисного окисления липидов, проницаемости гематоэнцефалического барьера и их коррекция при ишемии головного мозга (экспериментально-клиническое исследование) <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ
[99]	0%	Разработка и обоснование применения сорбционно-дренажных устройств в комплексном лечении гнойных ран и абсцессов мягких тканей <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	06 Дек 2018	Диссертации НББ
[100]	0%	Свободнорадикальные процессы и метаболизм йода в клетках щитовидной железы: фундаментальные и прикладные аспекты <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ
[101]	0%	скачать полный текст выпуска <a href="http://cfpd.amursu.ru">http://cfpd.amursu.ru</a>	02 Дек 2016	Интернет Плюс
[102]	0%	Научное обеспечение гигиенической безопасности работников биотехнологических предприятий, контактирующих с промышленными микроорганизмами <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	16 Янв 2020	Диссертации НББ
[103]	0%	Фармация СанктПетербургСпецЛит2006 УДК 598 615Я47 Авторы-Белодубровская Галина Александровна Бер <a href="http://samzan.ru">http://samzan.ru</a>	09 Янв 2017	Интернет Плюс
[104]	0%	РОЛЬ ОРБИТО-ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА В АДАПТИВНО-КОМПЕНСАТОРНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ПОРАЖЕНИИ СТВОЛА МОЗГА КРЫС <a href="http://pdf.knigi-x.ru">http://pdf.knigi-x.ru</a>	25 Мар 2021	Интернет Плюс
		Механизмы редокс-регуляции синаптической передачи в		

[105]	0%	гиппокампе <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	
[106]	0%	ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ (экспериментальное исследование) <a href="http://diss.seluk.ru">http://diss.seluk.ru</a>	20 Ноя 2020	Интернет Плюс	
[107]	0,02%	Власть. Исполнительная власть. Путеводитель <a href="http://studentlibrary.ru">http://studentlibrary.ru</a>	20 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	
[108]	0%	Т. 18, № 2 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	28 Апр 2017	Медицина	
[109]	0%	<a href="http://permisc.ru/images/docs/disser/D.999.219.02/Cheremnykh_disser.pdf">http://permisc.ru/images/docs/disser/D.999.219.02/Cheremnykh_disser.pdf</a> <a href="http://permisc.ru">http://permisc.ru</a>	17 Мар 2021	Интернет Плюс	
[110]	0%	Усовершенствование диагностики копытной гнили овец с помощью молекулярно-генетических методов <a href="http://diss.seluk.ru">http://diss.seluk.ru</a>	25 Мар 2021	Интернет Плюс	
[111]	0%	<a href="http://mgavm.ru/library/doc/diploms/ed-43.pdf">http://mgavm.ru/library/doc/diploms/ed-43.pdf</a> <a href="http://mgavm.ru">http://mgavm.ru</a>	25 Мар 2021	Интернет Плюс	
[112]	0%	Анатомо-топографические особенности артерий и элементов клапанного аппарата сердца человека <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	06 Дек 2018	Диссертации НББ	
[113]	0%	Внутриутробная гипоксия и ее влияние на зубочелюстную систему детей, проживающих в экологически неблагоприятных районах (клинико-экспериментальное исследование) - автореферат диссертации по медицине скачать бесплатно на тему 'Стоматология', специальность... <a href="http://medical-diss.com">http://medical-diss.com</a>	28 Мар 2019	Интернет Плюс	
[114]	0%	104227 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	13 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	
[115]	0%	Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды   Контент-платформа Pandia.ru <a href="https://pandia.ru">https://pandia.ru</a>	08 Фев 2019	Интернет Плюс	
[116]	0%	Кафедра медицинской химии <a href="https://lgmu.ru">https://lgmu.ru</a>	13 Дек 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0%	Кафедра медицинской химии <a href="https://lgmu.ru">https://lgmu.ru</a>	13 Дек 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0%	Джалилова, Джулия Шавкатовна Морфологические и молекулярно-биологические особенности системной воспалительной реакции у животных с разной устойчивостью к гипоксии : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.03.04 Москва 2019 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0%	49964 <a href="http://e.lanbook.com">http://e.lanbook.com</a>	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0%	Влияние длительного стресса и введения производных гормонов коркового вещества надпочечников на показатели развития головного мозга крыс <a href="http://dslib.net">http://dslib.net</a>	08 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0%	1(29)/ фефверварляь 1(29)/ PDF <a href="https://docplayer.ru">https://docplayer.ru</a>	16 Янв 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0%	Функционально-метаболические аспекты адаптации респираторной системы к изменяющимся условиям внешней среды у военнослужащих <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0%	Роль свободнорадикальных процессов в адаптации организма к изменению уровня кислорода <a href="https://revolution.allbest.ru">https://revolution.allbest.ru</a>	17 Мар 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0%	60057 <a href="http://e.lanbook.com">http://e.lanbook.com</a>	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0%	Йодсодержащие тиреоидные гормоны и система протеолиза при стрессе <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0%	Конвективный массоперенос кислорода в гистоструктурах и водных компартаментах тканей <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	0%	Разработка способов коррекции стрессорных повреждений щитовидной железы и сердца крыс <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0%	Клинико-иммунологическое обоснование иммунопрофилактики гриппа у больных туберкулезом легких <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0%	Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 апреля 2013 г. N 281 "Об утверждении научных платформ медицинской науки" <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	22 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0%	Противовирусный иммунитет – тема научной статьи по фундаментальной медицине читайте бесплатно текст научно-исследовательской работы в электронной библиотеке КиберЛенинка <a href="https://cyberleninka.ru">https://cyberleninka.ru</a>	21 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0%	49938 <a href="http://e.lanbook.com">http://e.lanbook.com</a>	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0%	Функциональная характеристика уδТ-лимфоцитов при рассеянном склерозе <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[133]	<input type="text" value="0%"/>	Профилактика и лечение железодефицитной анемии у беременных <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	<input type="text" value="0%"/>	Комплексная оценка и коррекция менопаузальных нарушений у женщин в постменопаузе <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	<input type="text" value="0%"/>	Новые методы диагностики и хирургического лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни при грыжах пищеводного отверстия диафрагмы <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[136]	<input type="text" value="0%"/>	Фундаментальные исследования. № 6, часть 7, 2014 <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	<input type="text" value="0%"/>	ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА ХРОНИЧЕСКОГО БРОНХИТА И ХОБЛ: МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫЕ И ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ 14.02.03 - Общественное здоровье и здравоохранение 14.01.25 - Пульмонология Авторефератдиссертации на соискание ученой степен... <a href="http://dissers.ru">http://dissers.ru</a>	11 Мая 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	<input type="text" value="0%"/>	Актуальные вопросы теории и практики медицины <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	<input type="text" value="0%"/>	Т. 160, № 9, сентябрь <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	28 Апр 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	<input type="text" value="0%"/>	Способ лечения острого постстрептококкового гломерулонефрита в эксперименте. Патент РФ 2393547 <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	<input type="text" value="0%"/>	Методы и алгоритмы прогнозирования положения мягких тканей лица пациента после лечения зубочелюстных аномалий <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[142]	<input type="text" value="0%"/>	Биохимические механизмы регуляции мелатонином и его метаболитами функционального состояния митохондрий <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[143]	<input type="text" value="0%"/>	Перспективы применения препаратов кверцетина для профилактики и лечения атеросклероза   "Гострі та невідкладні стани у практиці лікаря" <a href="https://urgent.com.ua">https://urgent.com.ua</a>	18 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[144]	<input type="text" value="0%"/>	<a href="http://abiturient.stgau.ru/science/dis/dis_presto/sevrykov_2016.pdf">http://abiturient.stgau.ru/science/dis/dis_presto/sevrykov_2016.pdf</a> <a href="http://abiturient.stgau.ru">http://abiturient.stgau.ru</a>	28 Окт 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[145]	<input type="text" value="0%"/>	<a href="http://www.stgau.ru/science/dis/dis_presto/sevrykov_2016.pdf">http://www.stgau.ru/science/dis/dis_presto/sevrykov_2016.pdf</a> <a href="http://stgau.ru">http://stgau.ru</a>	07 Ноя 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[146]	<input type="text" value="0%"/>	Балдин, Алексей Викторович Раково-сетчаточные антигены в контексте диагностических и иммунотерапевтических подходов в онкологии : диссертация ... кандидата медицинских наук : 03.01.03 Москва 2020 <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[147]	<input type="text" value="0%"/>	Лечебные природные ресурсы курорта Нальчик <a href="http://emil.ru">http://emil.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[148]	<input type="text" value="0%"/>	Современное законодательство в сфере содержания, использования и охраны животных (Д.Б. Горохов, журнал "Журнал российского права", N 4, апрель 2017 г.) <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	21 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[149]	<input type="text" value="0%"/>	<a href="http://www.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/about_rsmu/disser/14/d_kosh_kin_fa_01.pdf">http://www.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/about_rsmu/disser/14/d_kosh_kin_fa_01.pdf</a> <a href="http://rsmu.ru">http://rsmu.ru</a>	06 Фев 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[150]	<input type="text" value="0%"/>	<a href="https://www.volgmed.ru/uploads/dsovet/thesis/2-592-malcev_dmitrij_vasilevich.pdf">https://www.volgmed.ru/uploads/dsovet/thesis/2-592-malcev_dmitrij_vasilevich.pdf</a> <a href="https://volgmed.ru">https://volgmed.ru</a>	22 Дек 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[151]	<input type="text" value="0%"/>	<a href="http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/images/dissertations/files/goncharov/Dissertation_Goncharov.pdf">http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/images/dissertations/files/goncharov/Dissertation_Goncharov.pdf</a> <a href="http://imb.dvo.ru">http://imb.dvo.ru</a>	25 Мар 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[152]	<input type="text" value="0%"/>	<a href="https://iteb.ru/upload/iblock/daf/Dissertatsiya_PERSHINA_EV.pdf">https://iteb.ru/upload/iblock/daf/Dissertatsiya_PERSHINA_EV.pdf</a> <a href="https://iteb.ru">https://iteb.ru</a>	07 Июн 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[153]	<input type="text" value="0%"/>	Мартинювич Г.Г., Черенкевич С.Н. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ МИНСК БГУ 2008 УДК 577.3'32/.36:577.334 Рецензенты: доктор биологических наук, профессор, <a href="http://libed.ru">http://libed.ru</a>	18 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[154]	<input type="text" value="0%"/>	Приказ Министерства здравоохранения РФ от 4 марта 2013 г. N 113 "Об утверждении плана мероприятий в образовательных учреждениях высшего профессионального образования, находящихся в ведении Министерства здравоохранения Российской Федерации, на 2013 год" <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	12 Янв 2017	СПС ГАРАНТ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[155]	<input type="text" value="0%"/>	Диагностика оптических нейропатий различного генеза - автореферат диссертации по медицине скачать бесплатно на тему 'Глазные болезни', специальность ВАК РФ 14.01.07 <a href="http://medical-diss.com">http://medical-diss.com</a>	10 Дек 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[156]	<input type="text" value="0%"/>	Etude des effets neuroprotecteurs des stilbènes de la vigne sur la maladie de Parkinson <a href="https://core.ac.uk">https://core.ac.uk</a>	22 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[157]	<input type="text" value="0%"/>	Особенности деструкции опухоли на модели экспериментальной аденокарциномы эрлиха при фотодинамической терапии с сенсбилизатором второго поколения группы хлоринов <a href="http://disus.ru">http://disus.ru</a>	21 Июн 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
		КОРРЕКЦИЯ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЕТЧАТКИ С			

[158]	0%	ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИСТАНТНОГО И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ ЭРИТРОПОЭТИНОМ <a href="http://net.knigi-x.ru">http://net.knigi-x.ru</a>	10 Мая 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[159]	0%	Способ коррекции метаболического синдрома с применением кумыса и гипобаротерапии. Патент РФ 2472514 <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[160]	0%	Альпинизм часть 1 <a href="http://pilgrim-andy.narod.ru">http://pilgrim-andy.narod.ru</a>	21 Июнь 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

107  
Министерство здравоохранения Российской Федерации  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
37  
высшего образования  
«Дальневосточный государственный медицинский университет»

12  
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) 2

Диссертация на соискание ученой степени  
37  
кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук,  
профессор Е.Н. Сазонова

43  
Хабаровск – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Роль редокс-статуса в регуляции состояния клетки.....	13
1.2. Общие свойства и физиологические эффекты биофлавоноидов.....	19
1.3. Анализ механизмов антиоксидантного эффекта растительных биофлавоноидов.....	24
1.4. Влияние растительных биофлавоноидов на процессы пролиферации и анаболическую активность клеток.....	28
1.5. Резюме.....	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Характеристика экспериментальных животных.....	38
2.2. Характеристика используемого вещества.....	38
2.3. Характеристика исследуемых тканей.....	39
2.4. Организация экспериментов <i>in vivo</i> .....	42
2.4.1. Введение дигидрокверцетина и забор материала.....	42
2.4.2. Моделирование гипоксического воздействия.....	43
2.4.2.1. Моделирование антенатальной гипоксии.....	44
2.4.2.2. Моделирование гипоксического воздействия на половозрелых животных.....	45
2.4.3. Приготовление гистологических препаратов.....	45
2.4.4. Приготовление радиоавтографов.....	46
2.4.5. Определение митотического режима эпителиальной ткани.....	48
2.4.6. Исследование нуклео-нуклеолярного аппарата клеток.....	49
2.4.7. Метод хемилюминесценции (ХМЛ).....	51
2.4.8. Определение уровня фактора роста нервов методом иммуноферментного анализа.....	52
2.5. Организация эксперимента <i>in vitro</i> .....	53
2.6. Статистическая обработка данных.....	56

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	57
3.1. Влияние окислительного стресса на показатели пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций .....	57
3.1.1. Влияние окислительного стресса на различные клеточные популяции половозрелых белых крыс.....	57
3.1.2. Пролиферативные и анаболические процессы в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.....	66
3.1.3. Влияние окислительного стресса на пролиферативные и анаболические процессы в первичной культуре пульмональных фибробластов .....	69
3.2. Влияние дигидрокверцетина на пролиферативную и анаболическую активность различных клеточных популяций в условиях окислительного стресса .....	70
3.2.1. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции половозрелых белых крыс в условиях окислительного стресса .....	70
3.2.2. Влияние дигидрокверцетина на пролиферативные и анаболические процессы в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии .....	79
3.2.3. Влияние дигидрокверцетина на первичную культуру пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса .....	82
3.3. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции белых крыс.....	84
3.3.1. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции половозрелых белых крыс.....	84
3.3.2. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции новорожденных белых крыс .....	93
3.3.3. Влияние дигидрокверцетина на первичную культуру пульмональных фибробластов.....	97
4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	99
ВЫВОДЫ .....	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

## ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс является одним из главных звеньев многих патологических состояний; изучается роль активных форм кислорода (АФК) в формировании механизмов канцерогенеза [84, 300, 310, 311, 317], заболеваний сердечно-сосудистой [36, 191, 225, 368], дыхательной [32, 118, 132] и пищеварительной систем [153, 197, 314, 416], а также возможность их нейтрализации.

Хорошо известны механизмы повреждающего влияния активации свободнорадикального окисления. АФК могут вызывать модификацию молекул нуклеиновых кислот с накоплением белков-маркеров окислительного повреждения ДНК [63, 175]; индуцировать неспецифическую трансформацию молекул белков на посттрансляционном уровне, что приводит к их агрегации, появлению межбелковых сшивок и разрыву полипептидной цепи [205]. АФК влияют на липиды клеточных мембран за счет активации процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ): происходит повреждение целостности биологических мембран, нарушение текучести и проницаемости цитолеммы [292]. Продукты ПОЛ образуют аддукты с белками, что может привести к индукции токсичности, которая в свою очередь участвует в развитии дегенеративных заболеваний [357]. Помимо этого, АФК повышают проницаемость наружной митохондриальной мембраны за счет окислительной модификации белков митохондриальной мембраны, приводя к запуску внутреннего пути апоптоза с выходом цитохрома С, формированием апоптосомы [130, 286]. АФК также индуцируют кластеризацию рецепторов к проапоптическим цитокинам семейства фактора некроза опухоли, активируя внешний путь апоптоза [347]. Таким образом, АФК, несомненно, являются факторами, способствующими апоптозу. В более высоких концентрациях АФК могут провоцировать некротическую гибель клетки [47, 68, 70].

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 [150, 162, 419, 241, 278]. Имеются исследования, демонстрирующие негативные последствия использования некоторых антиоксидантов [365]. Одной из причин этого парадокса может быть «подавление эндогенной системы антиоксидантной защиты организма» [103]. Кроме того, следует принять во внимание значимую роль АФК в физиологических внутриклеточных процессах [214, 359]. Образование АФК необходимо для нормальной жизнедеятельности организма. АФК являются сигнальными мессенджерами, которые влияют на активность факторов транскрипции и ферментов, на экспрессию генов [1, 125, 269]. При очень низких внутриклеточных концентрациях АФК наблюдаются патологические изменения за счет ингибирования физиологических функций, нарушения индукции защитных механизмов клетки: NIF-фактора, белков теплового шока и сигнального пути антиоксидант-респонсивного элемента [211, 251, 279, 414, 422].

Дуализм эффектов АФК наиболее ярко проявляется в отношении анаболических процессов – роста и пролиферации клеток. Генерация АФК необходима для стимуляции клеточного деления [63, 200, 288, 407]. Вместе с тем, окислительный стресс сопровождается угнетением пролиферации и активацией апоптоза [27, 58, 270, 418]. В условиях целостного организма, как совокупности клеток, отличающихся пролиферативной активностью, уровнем антиоксидантной защиты, особенностями митогенного сигналинга, прогнозировать характер реакции клеточной популяции на изменение редокс-статуса крайне затруднительно. По-видимому, существуют выраженные тканевые и онтогенетические отличия реакции клеток на диапазон концентраций свободных радикалов.

Это обстоятельство определило актуальность проводимого исследования – оценки роли, как избытка (в модели окислительного стресса), так и недостатка (при воздействии антиоксиданта), АФК в изменении процессов пролиферации, роста, анаболизма в различных клеточных популяциях.

## **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 [84]. Избыточная нейтрализация и/или подавление образования АФК может обусловить формирование «восстановительного стресса». По мнению Лю Б.Н. и соавт. [69], «в ходе эволюционной адаптации организмов к возрастанию концентраций кислорода в земной атмосфере, закрепились специализированные диапазоны дисбалансов между прооксидантами и антиоксидантами»,<sup>38</sup> в виде последовательности (по мере возрастания количества АФК в клетке): пролиферация – апоптоз – канцерогенез – цитолиз [69]. Таким образом, можно говорить о физиологическом диапазоне концентрации АФК, которые необходимы для функционирования клеток [244, 417].

В научной литературе малочисленны данные о влиянии АФК на процессы анаболизма и пролиферации в условиях целостного организма. Несмотря на широкое применение антиоксидантов, следует отметить противоречивость сведений литературы о влиянии натуральных антиоксидантов на структурный гомеостаз [319]. Хорошо описан и проанализирован антипролиферативный и проапоптотический эффект антиоксидантов в культурах опухолевых клеток [151, 160, 250, 268], но данные о влиянии экзогенных антиоксидантов на нетрансформированные ткани и клетки млекопитающих немногочисленны [236, 295]. 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<sup>12</sup> 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.<sup>31</sup>

### **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<sup>31</sup> 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 <sup>37</sup>

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. <sup>31</sup>

Полученные результаты <sup>48</sup> могут быть полезны при определении показаний и/или противопоказаний к использованию лекарственных препаратов и биологически активных добавок, созданных на основе <sup>1</sup> 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, <sup>12</sup> может служить экспериментальным обоснованием возможности использования <sup>1</sup>

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 работы**

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: новорожденных (1-7 сутки жизни) и половозрелых (3-месячный возраст) животных. 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 нуклеолярного аппарата клеток различных клеточных популяций. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы «Statistica 6.0».

### **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 дигидрокверцетина.

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

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

### **Степень достоверности и апробация результатов**

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).<sup>39</sup>

Материалы исследования были представлены и обсуждены на 67-й Итоговой научной конференции<sup>1</sup> «Актуальные вопросы современной медицины» (23 апреля 2010 г., г. Хабаровск); 69-й Итоговой региональной студенческой 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<sup>11</sup> (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<sup>17</sup>

вузовской науки – 2019» (27-28 февраля 2019 г., Москва); XXII Краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов (январь 2020 г., г. Хабаровск).<sup>17</sup>

### **Личное участие автора**

Личный 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.<sup>49</sup>

### **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.<sup>1</sup>

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ<sup>1</sup>

### 1.1. Роль редокс-статуса в регуляции состояния клетки

Редокс-статус клетки – баланс между продукцией активных форм кислорода (АФК) и восстановителей (факторов антиоксидантной защиты) [54] – играет особую роль в регуляции важнейших физиологических и патологических процессов в клетке [45]. Понятие АФК объединяет высокореактивные соединения, образующиеся в результате клеточного дыхания и представляющие собой промежуточные продукты метаболизма кислорода: синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), супероксидный ( $\dot{\text{O}}^{-2}$ ), гидроксильный ( $\dot{\text{O}}\text{H}$ ), гидропероксильный ( $\text{H}\dot{\text{O}}^2$ ), пероксильный ( $\text{R}\dot{\text{O}}^2$ ) и алкоксильный ( $\text{R}\dot{\text{O}}$ ) радикалы, гипохлорит ( $\text{ClO}^-$ ), озон ( $\text{O}_3$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), монооксид углерода ( $\text{CO}$ ) и другие. АФК классифицируют по химической природе (активные формы кислорода и активные формы азота), по механизму их образования (первичные и вторичные) [54], по биологической значимости (природные и чужеродные) [84].

Поддержание баланса между образованием и утилизацией АФК необходимо для нормальной жизнедеятельности, как каждой клетки, так и организма в целом. Для инактивации АФК в клетке имеются факторы антирадикальной защиты - антиокислительная система клеток. Антиоксиданты, тормозящие перекисное окисление биомолекул, подразделяют на вещества с ферментативными свойствами и не обладающие ферментативной активностью; на полярные (водорастворимые) и неполярные (жирорастворимые); на мембранные, внутриклеточные и внеклеточные [84]. Нарушение баланса образования АФК и факторов антиокислительной системы клеток приводит к окислительному стрессу. Причиной окислительного стресса может быть, как увеличение АФК, так и снижение уровня антиоксидантов, а также сочетание того и другого [84].

Длительное время АФК рассматривались исключительно как повреждающие клетку факторы. АФК способны вызывать модификацию молекул нуклеиновых кислот, соответственно, влияя на генетический аппарат клеток [63].

Под действием АФК возможны одно- и двунитевые разрывы макромолекулы ДНК [85], нуклеотидные замены [285] и, следовательно, искажение точности считывания биологической информации [234]. Маркером окислительного повреждения ДНК является 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-ОН-dG), подобная окислительная модификация часто приводит к нуклеотидным заменам гуанина на тимин [47].

Окислительный стресс индуцирует неспецифичные модификации молекул белков на посттрансляционном уровне, что может способствовать их агрегации, появлению межбелковых сшивок и разрыву полипептидной цепи [205]. Большинство эффектов АФК на белки являются необратимыми и приводят к потере функции этих белков, которые, в конечном счете, разрушаются и удаляются протеасомами [420, 235]. Наиболее чувствительны к окислению АФК серосодержащие аминокислоты цистеин и метионин, в результате чего образуются дисульфиды и метионинсульфоксид [262].

Важными мишенями повреждающего действия АФК являются липиды клеточных мембран. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) может активироваться с помощью собственных ферментных систем: циклооксигеназы [370], липоксигеназы [388]. Неферментативное повреждение целостности биологической мембраны под воздействием АФК нарушает текучесть и проницаемость цитолеммы, тем самым приводя к апоптозу [292]. Продукты ПОЛ, возникающие в результате клеточного метаболизма, образуют аддукты с белками, включая ферменты и сигнальные молекулы. С одной стороны, это может стимулировать антиоксидантную систему и цитопротекцию, с другой – может привести к индукции токсичности, которая в свою очередь участвует в развитии дегенеративных заболеваний [357]. Малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненала (4-HNE) - важный продукт ПОЛ, способен модулировать экспрессию множества различных генов, участвующих в контроле пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток [247].

Окислительный стресс, прежде всего, связан с нарушением работы митохондрий. Митохондрии – основное место образования АФК в клетке и,

одновременно, мишень для их воздействия [189]. АФК повышают проницаемость наружной митохондриальной мембраны за счет окислительной модификации белков МРТ-пор, приводя к падению мембранного потенциала митохондрий, транслокации в цитозоль цитохрома с, запускающего формирование апоптосомы внутреннего пути апоптоза [130, 286]. ПОЛ является важным механизмом длительной мембранной пермеабилзации [401], которая может произойти после открывания мегаканала  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой МРТ-поры [240]. Чувствительность МРТ-поры к  $\text{Ca}^{2+}$  многократно увеличивается при окислительном стрессе [190].

АФК также индуцируют кластеризацию рецепторов к проапоптическим цитокинам семейства фактора некроза опухоли, активируя внешний путь апоптоза [347]. Таким образом, АФК, несомненно, являются факторами, способствующими апоптозу. В более высоких концентрациях АФК могут провоцировать некротическую гибель клетки [47, 68, 70].

Сопряженная с гиперпродукцией АФК дисфункция митохондриальных систем сопровождается нарушением синтеза и транскрипции митохондриальной ДНК и может привести к аутофагической активности [196, 273]. Митофагия (аутофагия митохондрий) в этих условиях выполняет функцию отрицательной обратной связи: генерированные митохондриями АФК индуцируют аутофагическое уменьшение количества митохондрий. Физиологическая роль АФК-индуцированной аутофагии двойственна. При небольших концентрациях АФК, аутофагия имеет компенсаторный характер и способствует выживанию клетки в условиях недостаточного питания. Вместе с тем, высокие концентрации АФК могут индуцировать аутофагическую гибель клетки [154, 276].

АФК способствуют росту и развитию опухолей [293]. Опухолевые клетки содержат более высокий, по сравнению с нормальными клетками, уровень АФК, что является одним из механизмов их значительной пролиферативной активности. При этом сигнальный путь включает фосфоинозитид-3-киназу, ядерный фактор NF- $\kappa$ B и митоген-активированные протеинкиназы [288]. В злокачественных опухолях наблюдаются повышенные уровни маркера окислительного повреждения ДНК 8-ОН-dG. Особую роль в канцерогенезе может играть

индукция АФК мутации гена p53, как супрессора опухоли. Уровень окислительного повреждения ДНК в клетках опухоли положительно коррелирует с ее инвазивностью [47].

Вместе с тем, в физиологических концентрациях АФК являются сигнальными молекулами, влияющими на экспрессию генов, на активность факторов транскрипции и ферментов [125, 269, 268]. «АФК принимают участие на начальных этапах внутриклеточной сигнализации, которая является многокомпонентной системой передачи сигнала к клеточному ядру, что получило название редокс-сигнализации» [103].

Считается, что генерация АФК в клетке усиливается в ответ на воздействие целого ряда неспецифических факторов (гипоксия, изменения температуры и т.д.) и запускает каскад компенсаторных цитопротективных реакций. Адаптация к гипоксии клетки и организма в целом определяется стабилизацией HIF (фактор, индуцируемые гипоксией) факторов, которые на транскрипционном уровне регулируют образование эритропоэтина и ферментов гликолиза [330]. Показано, что стабилизация HIF, возможна только при генерации митохондриями АФК [375]. Известно, что гипоксия индуцирует транспорт митохондрий в перинуклеарные зоны клетки, что, посредством возрастания концентрации АФК в ядре, способствует повышению экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия, необходимого для ангиогенеза [349]. Усиление продукции АФК является необходимым элементом защитных механизмов ишемического preconditionирования сердца и мозга [243, 263].

Во внутриклеточных механизмах действия многочисленных первичных мессенджеров, имеющих специфические рецепторы, также прослеживается вовлечение редокс-сигнализации. АФК активируют ряд систем реализации внутриклеточных сигналов, включая ферменты фосфоинозитид-3-киназы-протеинкиназы  $B\alpha$ , фосфолипазу  $C-\gamma 1$ , внеклеточно-регулируемую киназу. АМФ-активируемая протеинкиназа, способствующая выживанию клетки при стрессовых, повреждающих воздействиях, также регулируется АФК [149]. АФК вовлечен в регуляцию активности протеинкиназы А и протеинкиназы С [355].

АФК оказывают тоническое влияние на состояние рианодинных рецепторов саркоплазматического ретикула кардиомиоцитов. Окисление тиоловых групп цистеина в составе этих молекул существенно повышает их чувствительность к концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и способствует открытию кальциевых каналов. Показано, что в физиологических условиях выделяемые митохондриями кардиомиоцитов АФК регулируют частоту «пиков» повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в миоплазме. Это, в свою очередь, определяет деятельность «кальциевых часов» работы пейсмейкера. Таким образом, АФК являются важнейшими регуляторами сердечного ритма [46, 408]. Влияние АФК на кальциевый сигналинг также осуществляется через окисление аминокислот цистеина в структуре  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и насосов. Показано угнетающее влияние подобной окислительной модификации на работу  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса эндоплазматического ретикула [355]. Даже кратковременное увеличение концентрации АФК может приводить к активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [63] с последующим увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция [24].

АФК называют важнейшими регуляторами тканевого гомеостаза [346]. Они вовлечены в регуляцию процессов клеточной пролиферации [343, 319]. Редокс-зависимой является сигнализация с рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью, в том числе, рецептора к эпидермальному фактору роста. Стимуляция рецептора к эпидермальному фактору роста связана с продукцией АФК, которые вызывают транзиторную деактивацию тирозинфосфатаз, таким образом, пролонгируя митогенный сигнал. Также прямой АФК-зависимой стимуляции подвергается тирозинкиназа. АФК вовлечены в регуляцию пролиферации нейрональных стволовых клеток [200]. АФК способны активировать рецепторы к эпидермальному фактору роста и факторам роста из тромбоцитов без соответствующего лиганда. Имеются свидетельства, что снижение уровня АФК в клетке ниже некоего порогового уровня способно ухудшить течение ряда важных процессов, включая пролиферативную активность [288].

Эффекты АФК на процессы пролиферации обусловлены активностью NADPH-оксидаз [407]. NADPH-оксидазы, наряду с ферментативными комплексами цепи митохондрий, являются значимыми источниками АФК в клетке и важнейшими регулирующими факторами. NADPH-оксидазу считают непосредственным компонентом регуляции процессов пролиферации и клеточного роста [63], что получило название «окислительного митогенеза» [69].

Показано, что АФК, образованные NADPH-оксидазой, также играют критическую роль в активации эндотелиальной синтазы оксида азота и синтезе оксида азота [287].

Одним из механизмов регулирующего влияния АФК на ферментативные системы клетки является окисление серосодержащих аминокислот (цистеин, метионин) [152, 282], что приводит к снижению восстановленных и увеличению окисленных SH-групп в составе белков [184]. Также подвержены воздействию кислородных радикалов остатки пролина, гистидина и аргинина [201, 356]. Подобная окислительно-восстановительная модификация сульфгидрильных групп внутриклеточных белков существенно изменяет их активность, что влияет на клеточные функции. Например, окислительная модификация и активация некоторых протеинкиназ (тирозинкиназы, митоген-активируемых киназы, протеинкиназа С) [63] приводит к стимуляции транскрипционного ядерного фактора NF-κB и регуляции клеточного цикла на уровне генома [63].

Образованные митохондриями АФК являются факторами клеточной дифференцировки стволовых клеток [355]. Показана ведущая роль АФК в «переключении» от пролиферации к дифференцировке предшественников клеток сетчатки [346]. При «переходе клетки из состояния пролиферации в состояние дифференцировки количество митохондрий возрастает, потребление кислорода клеткой усиливается»,<sup>57</sup> что обуславливает существенное изменение редокс-статуса клетки [69].

Хотя генерация избыточных концентраций АФК является патогенетическим механизмом многих заболеваний, включая нейродегенеративную и онкологическую патологию, использование антиоксидантов не всегда приводит к

позитивному эффекту. Более того, некоторые исследования продемонстрировали негативный эффект антиоксидантов [365]. Одной из причин этого парадокса может быть «подавление эндогенной системы антиоксидантной защиты организма» [103].

Кроме того, при очень низких внутриклеточных концентрациях АФК наблюдаются патологические изменения за счет нивелирования физиологических функций оксидантов [384, 414].

По мнению Лю Б.Н. и соавт. [69], «в ходе эволюционной адаптации организмов к возрастанию концентраций кислорода в земной атмосфере, закрепилась специализированные диапазоны дисбалансов между прооксидантами и антиоксидантами», в виде последовательности (по мере возрастания количества АФК в клетке): пролиферация – апоптоз – канцерогенез – цитолиз [69]. Таким образом, можно говорить о физиологическом диапазоне концентрации АФК, которые необходимы для функционирования клеток [344, 417].

## 1.2. Общие свойства и физиологические эффекты биофлавоноидов

Биофлавоноиды – фенольные соединения растительного происхождения, характеризуются наличием двух ароматических колец, соединенных трехуглеродным мостиком, образующим пирановый или пироновый цикл (соединения ряда  $C_6-C_3-C_6$ ). Биофлавоноиды по количеству и положению гидроксильных групп, наличию и размещению отдельных заместителей делятся на флавонолы, флавоны, флаваноны, катехины, антоцианидины, лейкоантоцианидины, дигидрофлаванолы и др. [84].

Флаванолы (дигидрофлаванолы) отличаются от флаванонов наличием ОН группы при С-3 и содержат два асимметрических атома углерода в молекуле (С-2 и С-3) [352]. Природные дигидрофлавононы, соответствующие флавонолу кверцетин, называются дигидрокверцетин (ДГК) [5].

По молекулярному строению и функциям дигидрокверцетин близок кверцетину и рутину, но превосходит их по фармакобиологической активности.

Одна из важнейших особенностей этого вещества - наличие гидроксильных групп, что обеспечивает высокую антиоксидантную активность вещества. Дигидрокверцетин считают эталонным антиоксидантом [84, 164].

Биофлавоноиды широко распространены и обнаружены почти во всех высших растениях, в зеленых водорослях, споровых, хвощах. **Большинство дигидрофлавонолов выявлено в древесине хвойных (сосна, ель, лиственница) и лиственных (эвкалипт, бук, вишня) пород** [110]. Дигидрокверцетин до 1960 года заготавливался из лепестков роз, стеблей гинко-биллобы, косточек винограда [59]. В настоящее время, дигидрокверцетин получают из коры сибирской или даурской лиственницы [372].

Биофлавоноиды выступают в качестве основного контролера в процессах жизнедеятельности высших растений. Эти вещества влияют на образование лигнина и суберина, фотосинтез, пролиферацию и апоптоз клеток растений [51].

Организм млекопитающих не синтезирует биофлавоноиды, поэтому для млекопитающих они являются эссенциальными микронутриентами [93]. Потребность человека в биофлавоноидах, предположительно, составляет 50-100 мг/сут [10, 142, 348]. Биофлавоноиды не обладают кумулятивным и токсическим эффектом даже в больших концентрациях [51, 93], в том числе кластогенностью и ДНК-повреждающей активностью [40].

Биофлавоноиды обладают широким спектром действия на организм млекопитающих. Они способны тормозить окисление аскорбиновой кислоты и перекисное окисление липидов, инактивировать ионы тяжелых металлов через образование хелатных комплексов. Биофлавоноиды могут служить переносчиком молекул водорода между дыхательным субстратом и кислородом, за счет участия в окислительно-восстановительных процессах [51].

Флавоноиды натурального происхождения, в частности дигидрокверцетин, способны влиять на иммунные функции организма. Дигидрокверцетин активизирует макрофаги [87, 237], снижает адгезию лейкоцитов через ингибирование цАМФ-специфической фосфодиэстеразы [20], ослабляет

образование молекул адгезии в клетках эпидермиса [20], снижает активность протеинкиназы С и миелопероксидазы нейтрофилов [77].

Дигидрокверцетин стимулирует выработку интерферона [87, 237]. Активно обсуждается возможность применения биофлавоноидов в качестве противовирусных средств, в частности в отношении вируса Эбола [337, 342] и вируса Денге [223, 400]. Галочкина А.В. и соавторы [43] отмечают противовирусную активность дигидрокверцетина в отношении вируса Коксаки [43]. Описана противовирусная активность дигидрокверцетина в отношении вирусов гепатита А [194], гепатита С [257], энтеровируса А71 [271]. Противовирусный эффект реализуется за счет снижения синтеза вирусных частиц, уменьшения цитопатогенного действия вируса [43].

Антиаллергическая активность биофлавоноидов описана Mlsek J. [334] и Schwartz A. [362]. Ряд биофлавоноидов обладает противовоспалительным эффектом за счет уменьшения продукции оксида азота индуцибельной NO-синтазой фагоцитирующих клеток [147, 233]. По-видимому, можно говорить об иммуномодулирующих свойствах биофлавоноидов.

Активно обсуждается способность биофлавоноидов снижать летальность от сердечно-сосудистых заболеваний [51, 93]. Множество эпидемиологических исследований демонстрируют обратную связь между потреблением пищи, богатой флавоноидами, и рисками сердечно-сосудистой патологии [397]. Биофлавоноиды оказывают выраженное кардиопротективное действие в модели ишемии/реперфузии сердца. Дигидрокверцетин минимизирует ишемическое повреждение митохондрий кардиомиоцитов [215]. Бревискапин снижает размер инфарктной зоны при экспериментальной ишемии/реперфузии *in vivo* и улучшает выживаемость кардиомиоцитов при гипоксии *in vitro*. Эффект опосредован сигнальным путем PI3K/Akt/eNOS [192]. Дигидрокверцетин нашел применение в комплексном лечении ишемической болезни сердца, благодаря улучшению микроциркуляции и гемодинамических показателей малого круга кровообращения, увеличению фракции сердечного выброса, снижению периферического сопротивления сосудов [74].

Дигидрокверцетин уменьшает гипертрофию кардиомиоцитов, индуцированную ангиотензином-II или повышенной постнагрузкой (стенозом аорты), благодаря ингибированию избыточного образования свободных радикалов, и уменьшению фосфорилирования протеинкиназ – внеклеточно-регулируемой киназа и c-Jun N-концевой киназы [393].

Некоторые биофлавоноиды обладают гипотензивными свойствами. Механизм основывается на ингибировании ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) [141, 267]. Спазмолитический эффект на гладкомышечную стенку сосудов также достигается за счет увеличения продукции эндотелиоцитами брадикинина и NO [193, 331] и снижения уровня эндотелина и тромбоксана В2 [193].

Описан капилляропротективный эффект биофлавоноидов, который выражается в уменьшении проницаемости сосудистой стенки и осуществляется за счет цитопротективного влияния на эндотелиоциты [264].

Дигидрокверцетин не влияет на базальный тонус вен, но способен уменьшать венотоническое действие норадреналина [19]. Биофлавоноид способствует компенсации при хронической венозной недостаточности [20], улучшает бактериологический фон на поверхности трофических язв и процессы регенерации [94].

Дигидрокверцетин оказывает выраженное влияние на сосудистую систему мозга. Его применение может приводить как к увеличению объемной скорости кровотока в головном мозге, так и уменьшению. Дуализм эффекта обеспечивает широкое применение биофлавоноида при различных состояниях [23].

Описано благоприятное влияние биофлавоноидов на углеводный и липидный обмен [28]. Гиполипидемическое действие дигидрокверцетина может быть полезно при комплексном лечении ожирения, особенно у детей [30]. Дигидрокверцетин снижает синтез холестерина в гепатоцитах за счет ингибирования HMG-CoA-редуктазы [289, 380]. Биофлавоноиды также способны нормализовать уровень холестерина за счет снижения окисления липопротеидов низкой плотности [315], что позволяет активно использовать вещества этой

группы при лечении дислипидемий, атеросклероза и метаболического синдрома [181, 347].

Имеются данные о влиянии дигидрокверцетина на дыхательную систему. Дигидрокверцетин оказывает цитопротективное влияние на мерцательный эпителий трахеи [22, 88, 96] и слизистой полости носа [37, 133]. В эксперименте, при блеомицин-индуцированном повреждении легочной ткани, дигидрокверцетин оказывает противовоспалительное действие: уменьшает тканевой отек, инфильтрацию полиморфноядерными лейкоцитами и формирование легочного фиброза. В механизмах эффекта существенную роль играют супрессия индуцибельной NO-синтазы и снижение активности циклооксигеназы-2 [220].

Дигидрокверцетин получил широкое применение при лечении сахарного диабета и его последствий. При экспериментальном стрептозоцин-индуцированном диабете, аналог дигидрокверцетина способствует увеличению размеров островков Лангерганса и количества  $\beta$ -клеток в них [79, 133, 258]. При этом регистрируется увеличение уровня инсулина в крови; снижение концентрации глюкозы и количества гликозилированного гемоглобина; улучшаются процессы гликогенеза в гепатоцитах [258]. Эффект обусловлен антиоксидантным влиянием биофлавоноидов на поджелудочную железу, что проявляется нормализацией тканевого уровня малонового диальдегида и глутатиона [246, 255]. По данным Dias A.S. et al [338], введение кверцетина белым крысам оказывает мощное гепатопротекторное действие в модели стрептозотоцинового диабета: в ткани печени уменьшается экспрессия индуцибельной NO-синтазы и концентрация продуктов пероксидации липидов. Гепатопротекторный эффект биофлавоноида силимарина сопровождается активацией белок-синтетической функции гепатоцитов и стимуляцией РНК-полимеразы [245].

Дигидрокверцетин оказывает терапевтическое действие на офтальмологические осложнения сахарного диабета: диабетическая ретинопатия [177, 350], отслойка сетчатки [411], катаракта [374], изменения в стекловидном теле [415] и др.

Биофлавоноиды обладают антиагрегантной активностью, улучшают реологические свойства крови [56, 91], способны нормализовать гемостатический потенциал крови при сахарном диабете [28]. Уменьшение агрегации тромбоцитов под действием биофлавоноидов реализуется через повышение уровня циклических нуклеотидов и снижение цитоплазматической концентрации кальция. При этом уменьшается активность тромбоксан-синтетазы [57, 169].

Дигидрокверцетин оказывает выраженный радиопротекторный эффект. Применение дигидрокверцетина у мышей в условиях сублетального облучения повышает выживаемость животных [126], предотвращает радиационное цитогенетическое повреждение клеток костного мозга - в 1,5-1,8 раза ограничивая выход полихроматофильных эритроцитов с микроядрами после  $\gamma$  – облучения. Радиозащитное действие дигидрокверцетина обеспечивается его способностью инактивировать гидроксильные радикалы, которые являются основными агентами повреждающего действия ионизирующей радиации. Дигидрокверцетин, как и другие флавоноиды, защищает нуклеиновые кислоты, белки и фосфолипиды мембраны клетки. Образующиеся при этом радикальные формы молекул флавоноидов или продуктов их превращений нетоксичны в отношении биомакромолекул и устраняют накопившиеся АФК [389].

Таким образом, следует отметить широкий спектр патологических состояний, при которых отмечают положительный эффект биофлавоноидов. Основным саногенетическим механизмом эффектов биофлавоноидов является антиоксидантное действие.

### **1.3. Анализ механизмов антиоксидантного эффекта растительных биофлавоноидов**

Флавоноиды способны отдавать атомы водорода, тем самым взаимодействуя с АФК ( $O_2^-$ ,  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$  и др.) и подавляя каскадные процессы перекисного окисления липидов [81, 84]. Благодаря наличию гидроксильной

группы в положении С3 и С3', эти вещества эффективно подавляют продукцию супероксид-аниона в ксантин-ксантинооксидазной реакции [210, 377].

Исследования Червяковского Е.М. и др. [135] показали, что гидроксирование В-кольца биофлавоноидов приводит к увеличению противорадикального эффекта, особенно при моногидроксилировании в положении С4'. Экспериментальные данные говорят о прямой связи между количеством гидроксильных групп и антирадикальной эффективностью. Полифенолы, содержащие в своей структуре от двух до шести ОН-групп, способны превзойти по антиоксидантной активности аналоги витамина Е, а при наличии более трех гидроксильных групп проявляют большую антиоксидантную активность, чем аскорбиновая кислота [266]. Для угнетения индуцированного окисления липосом особенно важно наличие фенольных гидроксильных групп в положении С3'-, С4'-, С5' [167, 174]. Защита от свободно-радикального окисления зависит и от наличия двойной связи между 2 и 3 атомами углерода в соотношении с карбонильной группой в положении С4 [84]. При наличии этой связи ограничивается подвижность В-кольца, что способствует ингибированию ферментативной продукции АФК [183]. Кроме того, антиоксидантную активность обеспечивает наличие фенольных групп в положении С3 и С5 в соотношении с карбонильной группой в положении С4 [230]. Такой комплекс необходим для связи ионов железа и ингибирования образования радикалов в реакции разложения гидроперекисей [195]. При этом, присутствие ОН-радикала в С3 положении обеспечивает стабилизирующее действие на молекулу вещества [147].

37  
Таким образом, можно сделать вывод, что выраженность антиоксидантной активности зависит от наличия трех составляющих: фенольных гидроксидов в положении С3' и С4', двойной связи между 2-м и 3-м атомами углерода в С-кольце при наличии карбонильной группы в положении С4, а также ОН-группы в С3 и С5 совместно с карбонильной группой [84]. 47  
Дигидрокверцетин имеет 2 особенности структуры из трех. От кверцетина дигидрокверцетин отличается отсутствием двойной связи С2-С3, что, однако, не уменьшает его антиоксидантные свойства [84]. Максимальный антирадикальный потенциал

дигидрокверцетина обеспечивается наличием стабильной кольцевой структуры и пяти фенольных групп в сочетании с карбонильной группой в положении С4 [340]. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина, аналогичные свойству токоферола, проявляются в дозировках 50-100 мг/кг [185]. В этих дозировках дигидрокверцетин способен ингибировать супероксид-анион радикал, защищать митохондриальный комплекс от перекисных радикалов и подавлять активацию НАДН-зависимой цитохром-Р-450-редуктазы, которая индуцирует микросомальное перекисное окисление липидов [325]. Дигидрокверцетин имеет свойство скавенжера в отношении супероксидных анионов [148].

Однако, антиоксидантное действие биофлавоноидов основано не только на особых физико-химических свойствах, но и на способности влиять на некоторые компоненты ферментативного и неферментативного звена антиоксидантной защиты клеток. Имеет место воздействие на активность фермента ксантинооксидазы, контроль над комплексообразованием редокс-активных металлов, повышение усвояемости витамина С [173, 208, 221, 244, 275]. Boušová I. и соавторы [302] говорят о влиянии ряда флавоноидов на экспрессию глутатион-S-трансферазы [302]. Кверцетин способен контролировать образование глутатиона и деятельность глутатионредуктазы [156, 278]. В высоких концентрациях биофлавоноид способствует усилению активности Cu/Zn-супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [326]. Ряд флавоноидов, содержащихся в Расторопше пятнистой, в том числе дигидрокверцетин, увеличивает содержание глутатиона в гепатоцитах [245].

Флавоноиды бергамота уменьшают индуцированные окислительным стрессом структурные повреждения кишечника, снижают продукцию провоспалительных цитокинов, инфильтрацию ткани нейтрофилами, через воздействие на NF-κB и на митоген-активированную протеинкиназу [162]. Экстракты бергамота и апельсина уменьшают генерацию АФК в культуре эпителиальных клеток легкого человека при Fe<sup>3+</sup>-индуцированном окислительном стрессе, улучшают функционирование митохондрий, предотвращают

окислительное повреждение ДНК. Эти эффекты сопровождаются повышением концентрации каталазы [301].

Экстракт Кизила лекарственного, содержащий биофлавоноиды, в дозировке 100 мкг/мл ингибирует активность ксантиноксидазы и фагоцитарную генерацию АФК через воздействие на Cu/Zn-супероксиддисмутазу, Mn-супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу [249].

Биофлавоноиды Кардамона Яванского подавляют перекисное окисление липидов в клетках печени, индуцированное воздействием  $CCl_4$ . Гепатопротекторное действие сопровождается увеличением содержания в гепатоцитах антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и глутатион-S-трансфераза [158].

Предварительная обработка нейрональных клеток комплексом натуральных флавоноидов (даукостерол, пектолиарин и астрагин) показала их протективное действие против  $H_2O_2$ -индуцированной гибели клеток и ингибирующее влияние на образование АФК. Эффект сопровождается повышением внутриклеточной концентрации гемоксигеназы-1 и супероксиддисмутазы [305].

Zhao L. и соавторы [327] исследовали влияние комплекса биофлавоноидов *Rosa laevigata* на показатели окислительного стресса в тканях почек крыс в условиях ишемии. Выявлено, что биофлавоноиды снижают уровень малонового диальдегида и повышают уровень гемоксигеназы-1 [327].

Биофлавоноидные соединения, содержащиеся в настойке прополиса, особенно пиноцембрин и галангин, повышают жизнеспособность клеток благодаря активации антиокислительных ферментов и снижения уровня внутриклеточного кальция. Их антиапоптозный эффект сопровождается уменьшением активности каспазы-3 [209].

Биофлавоноид гиперозид оказывает цитопротективное действие в культуре эпителиальных клеток хрусталика при  $H_2O_2$ -индуцированном окислительном стрессе за счет увеличения экспрессии мРНК гемоксигеназы-1 [250]. Антиоксидантный эффект биофлавоноида наргенина опосредован сигнальным

путем «NO – цГМФ - протеинкиназа G - АТФ-зависимые калиевые каналы» с участием гемоксигеназы-1 [299].

Биофлавоноид ориентин ингибирует апоптоз кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии за счет нейтрализации супероксид-анионов и гидроксильных радикалов [159, 303, 306, 378].

Антиоксидантный, противовоспалительный и противоопухолевый эффекты лютеолина связывают с увеличением активности супероксиддисмутазы [150, 216, 329, 404]. Эпигаллокатехин-3-галлат (катехин из зеленого чая) обладает антиоксидантным действием за счет индукции гемоксигеназы-1 [386].

Байкалеин - флавоноид, содержащийся в Шлемнике байкальском, - эффективно ингибирует H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированное повреждение ДНК клеток и апоптоз, снижает уровень АФК, благодаря повышению активности гемоксигеназы-1 и тиоредоксинредуктазы-1 [178].

Антиоксидантный эффект биофлавоноидов обуславливает их многочисленный позитивные эффекты в условиях окислительного стресса: сохранение пластичности эритроцитов [180]; снижение накопления на стенках артерий холестерина и профилактика гиперлипидемии [176]; нейропротективные эффект [333].

Вместе с тем, некоторые биофлавоноиды за счет сильного антиоксидантного эффекта, могут оказывать цитотоксичное действие на клетки человека. Эти эффекты наблюдаются при применении высоких концентраций веществ [202]. Так, кверцетин обладает генотоксичностью и может вызывать повреждения ДНК в экспериментах *in vivo* [188]. Дигидрокверцетин такими побочными свойствами не обладает [92], даже при повышении дозы до 2000 мг/кг [40].

#### **1.4. Влияние растительных биофлавоноидов на процессы пролиферации и анаболическую активность клеток**

В научной литературе приводятся противоречивые сведения о влиянии биофлавоноидов на процессы поддержания структурного гомеостаза тканей. Имеются указания как на активирующее, так и на угнетающее влияние биофлавоноидов на анаболические и пролиферативные процессы.

Кверцетин стимулирует пролиферативную активность нейрональных клеток субвентрикулярной зоны головного мозга крыс после фокальной церебральной ишемии [218], усиливает рост швановских клеток и миелинизацию поврежденного аксона *in vitro* [238]. Биофлавоноиды экстракта чая стимулируют рост нейритов спинномозговых нейроглиев новорожденных мышей [115]. Биофлавоноиды Шлемника байкальского увеличивают количество дофаминергических нейронов в черной субстанции в экспериментальной модели болезни Паркинсона [217]. Towatari K. и соавторы [321] отмечают стимуляцию пролиферации в эпителии кожи мышей под действием растительных биофлавоноидов. Кверцетин благоприятно влияет на регенеративную способность ткани печени: при этом увеличивается пролиферация гепатоцитов; эффект сопровождается ингибированием образования малонового диальдегида и восстановлением уровня глутатиона [403]. Комплекс биофлавоноидов оливкового масла стимулирует рост и пролиферацию остеобластов человека *in vitro* [318]. Биофлавоноиды Корейской горянки активируют пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток и повышают экспрессию цитокинов, усиливающих остеогенез [232]. Икариин – биофлавоноид китайского лекарственного растения *Epimedium brevicornum* Maxim - способствует пролиферации клеток Сертоли *in vitro*, что обуславливает протективное влияние икариина на мужскую репродуктивную систему [252].

Позитивное влияние биофлавоноидов на структурный гомеостаз клеточных популяций включает не только стимуляцию пролиферации, но и угнетение процесса апоптоза. Кверцетин препятствует апоптозу нейронов за счет уменьшения набухания митохондрий и конденсации хроматина [335]. Кверцетин также снижает апоптотический индекс гепатоцитов в модели частичной гепатэктомии у крыс [403]. Дигидрокверцетин при блеомицин-индуцированном

повреждении легких уменьшает степень апоптоза [220]. Сильмарин ингибирует апоптоз культивируемых мезенхимальных стволовых клеток человека, вызванный сывороточной депривацией, через угнетение митохондриального пути [253, 367]. Бревискапин может обеспечить значительную кардиопротекцию при ишемии-реперфузии миокарда путем подавления апоптоза кардиомиоцитов через PI3K/Akt/eNOS сигнальные пути [192]. Дигидрокверцетин уменьшает гибель культивируемых эпителиоцитов кожи, индуцированную токсическим влиянием кадмия [294].

Вместе с тем, многочисленные данные литературы указывают на угнетающее влияние биофлавоноидов на процессы пролиферации. *In vitro* биофлавоноиды ингибируют пролиферацию (останавливают клеточный цикл в фазе G1) в раковых клетках поджелудочной железы [260]. По данным Rogovskii V.S. et al. [170], дигидрокверцетин угнетает пролиферацию клеток культуры рака молочной железы человека MCF-7. Изокверцетин демонстрирует значительное антипролиферативное действие на клетки глиобластомы [182]. Дигидрокверцетин) и ряд других биофлавоноидов блокируют клеточный цикл в фазе G1 и ингибируют клоногенность клеток колоректального рака HCT116 [227]. По данным ряда авторов, биофлавоноиды угнетают развитие рака печени [199, 259]. Содержащий биофлавоноиды экстракт *Opuntia humifusa* подавляет пролиферацию клеток рака шейки матки человека за счет остановки клеточного цикла в G1-фазе [160]. Антипролиферативное действие биофлавоноидов замечено в отношении мышинных фибробластов NIH/3T3 [382]: имеет место блок клеточного цикла в фазе G1 [398]. Кверцетин уменьшает миграцию и матриксную активность культуры орбитальных фибробластов, что приводит к антифиброзному эффекту при болезни Грейвса [161]. Роговский В.С. и соавторы [3] зарегистрировали выраженное антипролиферативное влияние дигидрокверцетина в культуре фибробластов. Напыление дигидрокверцетина на титановые импланты ингибирует пролиферацию десневых фибробластов и усиливают дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты

[341]. Показана способность дигидрокверцетина и ряда других биофлавоноидов ингибировать пролиферацию лимфоидных клеток в культуре [207].

Противоопухолевое действие дигидрокверцетина может быть обусловлено его ингибирующим влиянием на триптофан 2,3-диоксигеназу – иммуномодуляторный фермент, подавляющий противоопухолевый иммунный ответ [316]. В механизмах антиканцерогенного действия дигидрокверцетина при раке кожи, индуцированном ультрафиолетовым облучением, существенную роль играет взаимодействие с рецепторами эпидермального фактора роста и фосфоинозитид-3-киназой с ингибированием их активности [396]. Антипролиферативный эффект полифенолов яблочного сока в культуре клеток HT29 аденокарциномы толстой кишки также связывают с ингибированием рецепторов к эпидермальному фактору роста [256]. Ингибирующее действие дигидрокверцетина на пролиферацию клеток DU-145 карциномы простаты человека осуществляется за счет активации полимеризации микротрубочек, что приводит к остановке клеточного цикла [286]. Антипролиферативный эффект экстракта *Opuntia humifusa* в культуре клеток рака шейки матки человека сопровождается снижением концентрации циклина D1, циклин-зависимой киназы (Cdk4) и уменьшением фосфорилирования белка ретинобластомы. При этом экспрессия белков p2 и p53 значительно повышается [160].

В целом можно отметить, что<sup>37</sup> антипролиферативный эффект биофлавоноидов и дигидрокверцетина, в частности, преимущественно регистрируется в культурах опухолевых клеток. Причем, противоопухолевый эффект зависит от вида опухоли [261]. Существенную роль в антиканцерогенном эффекте биофлавоноидов имеет угнетение продукции АФК [165].

Антиканцерогенный эффект биофлавоноидов обусловлен не только подавлением клеточной пролиферации, но и активацией процесса апоптоза [358]. In vitro биофлавоноиды повышают активность апоптоза в раковых клетках поджелудочной железы [260]. Полифенольные соединения перечного дерева индуцируют апоптоз и аутофагическую гибель клеток DU145 предстательной железы человека [309, 322]. В 2014 году, Huang G. и соавторы [259] исследовали

влияние биофлавоноидов *Bidens bipinnata* L. на прогрессирование рака печени *in vivo* и *in vitro* и установили, что экстракт стимулирует апоптоз, активирует каспазы 3, 8 и 9 [259]. Кверцетин индуцирует апоптоз в дозировке более 20 мкМ через ингибирование STAT3-сигнального пути, что можно использовать для профилактики или лечения рака молочной железы. [339]. Флавоноиды ингибируют синтазу жирных кислот, избыточно экспрессируемую в злокачественных опухолях, и, тем самым, индуцируют апоптоз раковых клеток [254]. По данным Ryu S. et al. [336], кверцетин повышает гибель клеток, вызывает деполяризацию митохондриальных мембран и повышает концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитоплазме культивируемых клеток остеосаркомы.

Таким образом, следует отметить противоречивость сведений о влиянии растительных антиоксидантов на структурный гомеостаз. Антипролиферативный и проапоптотический эффект биофлавоноидов, как правило, реализуется на опухолевых клетках. Сведения о влиянии биофлавоноидов и, в частности, дигидрокверцетина на нетрансформированные ткани и клетки млекопитающих немногочисленны. Остается неясным характер влияния растительных биофлавоноидов на анаболические и пролиферативные процессы при различном редокс-статусе клеток.

## 1.5. Резюме

Сведения литературы свидетельствуют о неоднозначной роли АФК в жизнедеятельности организма. На рисунке 1 суммированы данные о патогенетических механизмах влияния окислительного стресса на состояние клеток и потенциальные «точки приложения» действия биофлавоноидов.

Избыточная концентрация АФК может привести к гибели клетки. С образованием АФК в реакциях, сходных с реакцией Фентона при избытке ионов  $Fe^{2+}$ , связана такая разновидность клеточной гибели как ферроптоз [226].

Окислительная модификация белков плазмолеммы способна вызвать инактивацию жизненно важных мембранных ферментов, например,  $Na^+/K^+$ -

АТФазы,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, транспортеров глюкозы; модифицировать рецепторные молекулы, нарушив сигнальную трансдукцию. Окислительная модификация мембранных липидов приводит к резкому повышению проницаемости мембран, как плазмолеммы, так и митохондриальной мембраны. Избыточная продукция АФК сопряжена с активацией сигнального пути ASK1/JNK, запускающего апоптоз [412]. Митохондриальный путь апоптоза при интенсивном окислительном стрессе включает белок p66shc, который индуцирует формирование митохондриальной транзитной поры, выход цитохрома С в цитозоль [343].

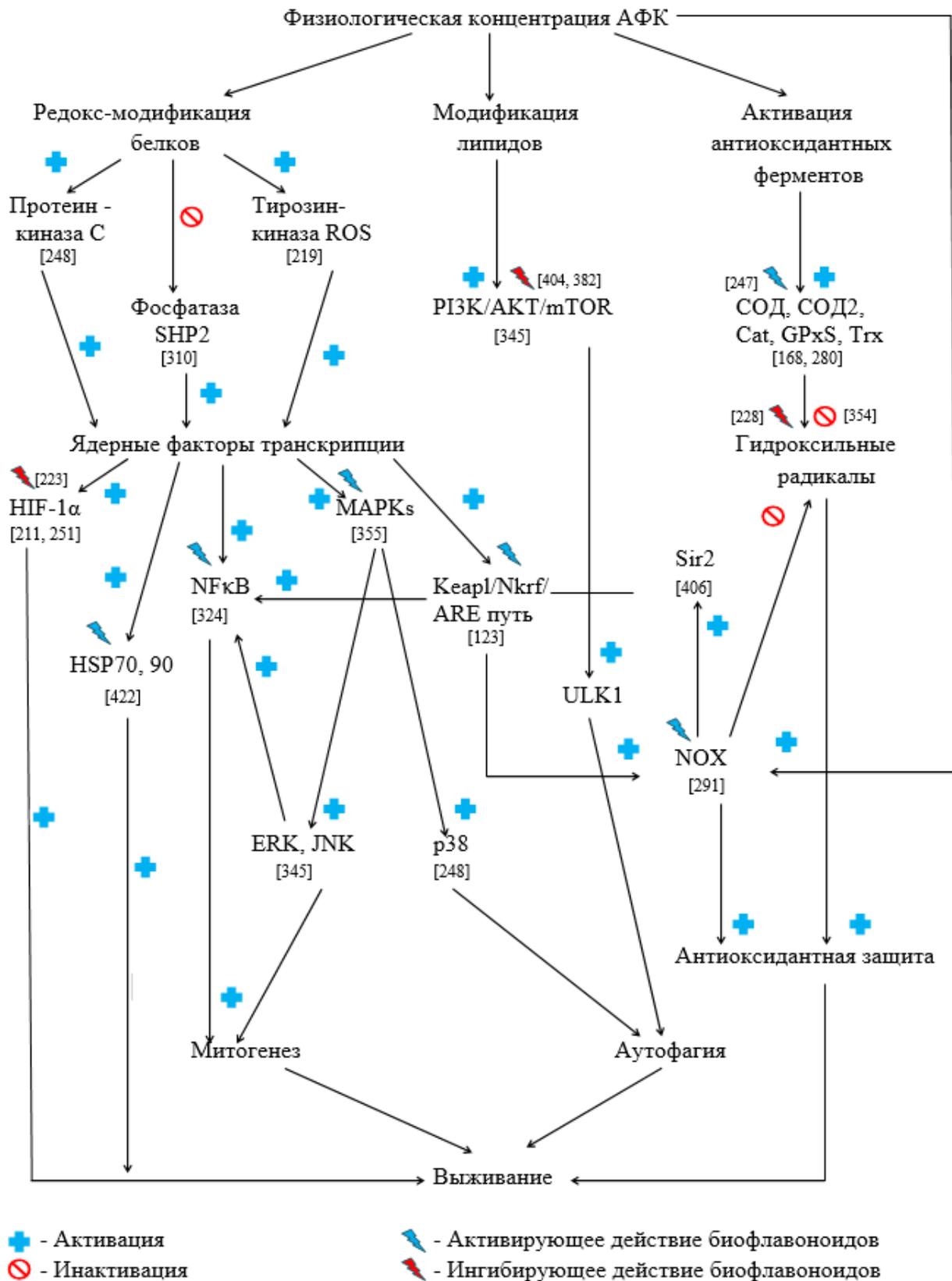


Рисунок 1 - Патогенетические механизмы повреждающего влияния высоких концентраций АФК на клетку и потенциальные «точки приложения» действия биофлавоноидов

В сигнальные пути нарушения базовых процессов в клетке при действии избытка АФК также вовлечены повышение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , блокирование mTOR. Важнейший проапоптотический белок p53 накапливается в клетке при окислительной модификации ДНК [240]. В условиях выраженного окислительного стресса экзогенные антиоксиданты, вероятно, способны улучшить состояние клеток, восстановить нормальное течение базовых внутриклеточных процессов.

Однако, не следует забывать о вовлеченности физиологических концентраций АФК в процессы жизнедеятельности клетки. Интегрированные сведения литературы об этом отражены на рисунке 2. АФК участвуют в адаптации клетки к умеренным стрессорным воздействиям, способствуют выживанию клетки.

Из множества механизмов включения защитных систем при умеренном повышении концентрации АФК, можно выделить 3 основных направления: модификация белков и липидов мембран, а также включение антиоксидантных систем. Редокс-модификация белков приводит к активации протеинкиназ, тирозинкиназ и угнетению фосфатаз, что в свою очередь активирует ядерные факторы транскрипции (HIF-1 $\alpha$ , NF $\kappa$ B, MAPKs и др.) и Keap1/Nrf2/ARE путь. Все это приводит к активации анаболических процессов в клетке, участвует в регуляции митогенеза. Модифицируя липиды мембран, АФК активирует PI3K/AKT/mTOR путь, в конечном итоге приводя к физиологической аутофагии, а, следовательно, и сохранению жизнеспособности клетки. Однако, по данным литературы, экзогенный антиоксидант может угнетать запуск этого защитного пути [425]. Использование мощных экзогенных антиоксидантов с полной элиминацией АФК может нарушить течение компенсаторно-приспособительных реакций и, соответственно, ухудшить состояние клетки. Биофлавоноиды имеют свойство блокировать HIF-1 $\alpha$  [211], что может снизить стресс-устойчивость клетки.

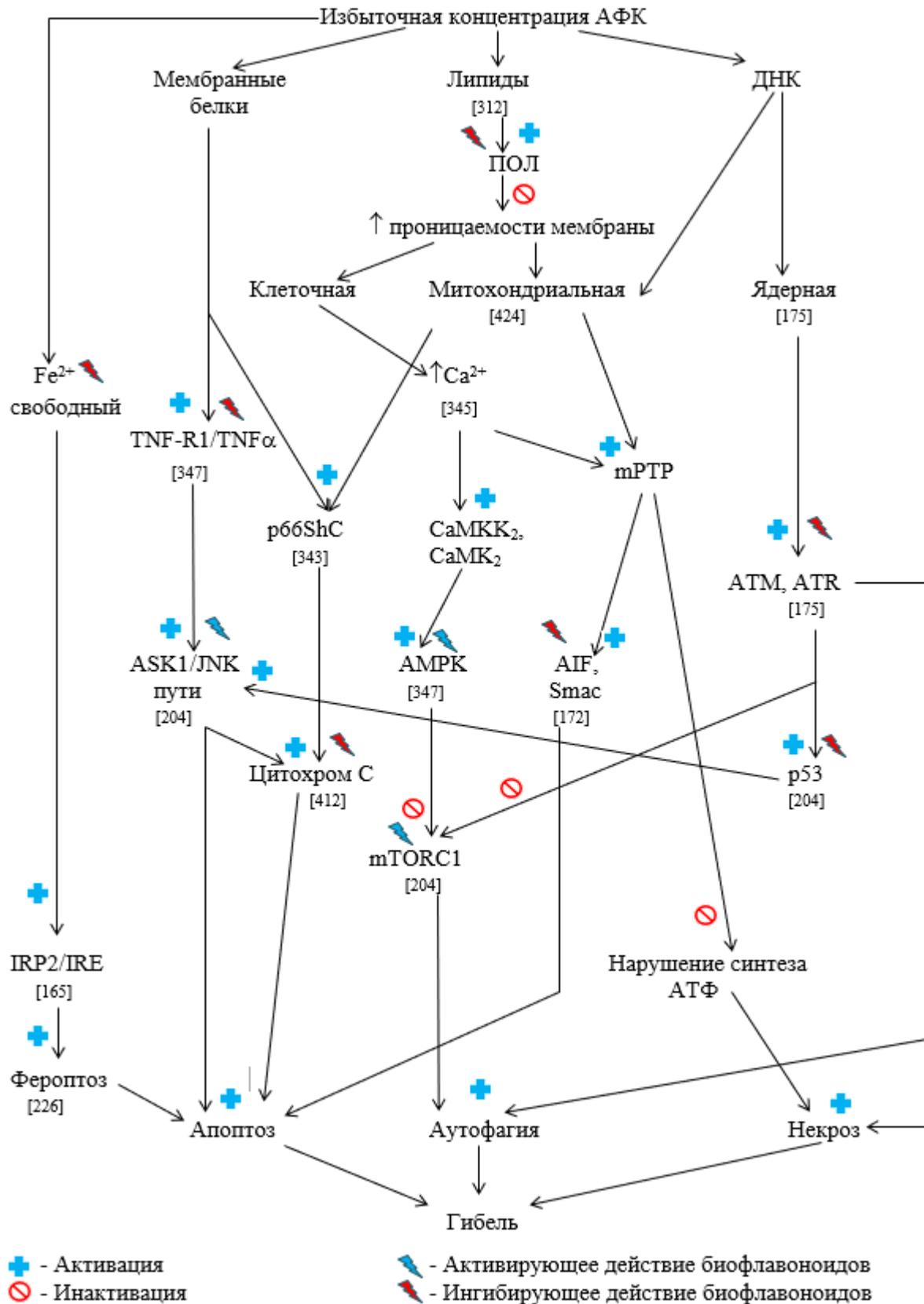


Рисунок 2 - Механизмы вовлечения физиологических концентраций АФК в регуляции жизнедеятельности клетки и «точки приложения» действия биофлавоноидов в этих условиях

В наибольшей мере «дуализм» эффектов АФК и экзогенных антиоксидантов может проявиться в таких базовых событиях жизнедеятельности клетки, как рост и пролиферация. При этом определяющую роль может иметь «редокс-контекст» - исходный уровень свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы в клеточной популяции. Соответственно, можно предполагать важные онтогенетические и тканеспецифические особенности реакции анаболических процессов на изменения концентрации АФК при стрессе, гипоксии или воздействии антиоксидантов.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика экспериментальных животных

В экспериментах использовали белых крыс линии Wistar: новорожденных (1-7 сутки жизни) и половозрелых (3-месячного возраста) животных. Крыс содержали в условиях вивария ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России при естественном световом режиме и температуре 20-22°C. Кормление осуществляли по принципу *ad libitum* стандартным гранулированным кормом для лабораторных животных. Правила содержания соответствовали методическим рекомендациям по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений (РД-АПК 3.10.07.02-09). Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г). На проведение экспериментов было получено разрешение этического комитета ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 4 от 05.06.2018). В экспериментальных исследованиях было использовано 378 белых крыс линии Wistar.

### 2.2. Характеристика используемого вещества

Использовали натуральный флавоноид дигидрокверцетин ( $C_{15}H_{12}O_7$ ) (рисунок 3).

Дигидрокверцетин является производным кверцетина и отличается отсутствием двойной связи в положении C2-C3.

Дигидрокверцетин считают эталонным антиоксидантом. На основе этого вещества существуют биологически активные добавки и лекарственные препараты.

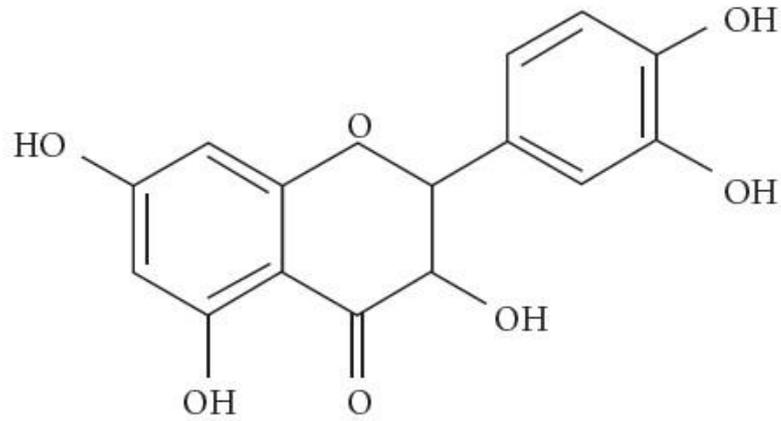


Рисунок 3 – Химическая структура дигидрокверцетина

По данным Реестра лекарственных средств [142] зарегистрированы следующие биологически-активные добавки – Дигидрокверцетин+, Дигидрокверцетин П (Дигидрокверцетин плюс), Дигидрокверцетин с экстрактом виноградных косточек, Дигидрокверцетин 10, Дигидрокверцетин «Сантерелла», Дигидрокверцетин (Таксифолин), Дигидрокверцетин NTG®, Дигидрокверцетин — ЭКО, Дигидрокверцетин ORAC, ДГК (дигидрокверцетин), ЦитоРеактор-дигидрокверцетин, Лецитин + дигидрокверцетин, МАГ БИО — дигидрокверцетин, ДКВ-99, Валемидин® Плюс, Араглин Д, Капилар®, Окулист®, КАРДИО Капилар® с коэнзимом Q10.

В исследовании применяли дигидрокверцетин производства ООО «Аметис» (Россия) чистотой не менее 98%. В экспериментах *in vitro* использовался дигидрокверцетин фирмы Sigma Aldrich (США) (степень очистки не менее 98%). Определение массовой доли дигидрокверцетина в сухом веществе проводится методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

### 2.3. Характеристика исследуемых тканей

В работе проведен анализ влияния дигидрокверцетина на широкий спектр клеточных популяций: исследовали клетки различной локализации, тканевой принадлежности, строения и эмбрионального происхождения.

В качестве объектов исследования *in vivo* использовали следующие клеточные популяции: нейроны коры больших полушарий (II и V слой неокортекса собственнотеменной доли) и поля CA1 гиппокампа; гепатоциты; кардиомиоциты; энамелобласты и одонтобласты зубных зачатков; эпителиоциты и миоциты двенадцатиперстной кишки; glanduloциты поджелудочной железы; эпителиоциты переднего эпителия роговицы; эпителиоциты и фибробласты кожи ушной раковины.

Неокортекс собственнотеменной доли соответствует соматосенсорной зоне S1 [270]. Гиппокамп является важным интегратором поведенческих актов, принимающим участие в оценке вероятности наступления событий [107]. Поле С1 гиппокампа используется для анализа последствий воздействия в развитии интегративных реакций организма, и, в частности, в формировании пространственной памяти [60]. Пролиферативная активность нейронов, определяемая по доле ядер, находящихся в S-фазе клеточного цикла [34, 48, 361], является важным критерием, характеризующим развитие головного мозга в раннем онтогенезе [101].

Миокард в разных зонах характеризуется особенностями морфогенеза, кровоснабжения, морфологии [11, 12, 75, 100]. Исследованию подвергали субэндокардиальные слои миокарда левого и правого желудочков, поскольку эти зоны миокарда содержат минимальное количество немышечных клеток [78]. Для миокарда новорожденных крыс характерна высокая пролиферативная активность, достигающая 60% [25]. В миокарде половозрелых млекопитающих присутствует популяция кардиомиоцитов способных к пролиферации, однако, количество таких клеток крайне малочисленно и не способно обеспечить регенеративные процессы в сердце [100]. Постнатальный рост миокарда млекопитающих, преимущественно, обеспечен гипертрофией кардиомиоцитов [104].

Для анализа реакции на исследуемые воздействия висцеральной гладкой мышечной ткани, анализировали популяцию миоцитов двенадцатиперстной

кишки. При активации миоцитов, в них возрастает уровень биосинтетических процессов, что выражается в увеличении размеров ядра и ядрышек [49].

Энамелобласты локализуются во внутреннем эмалевом эпителии зубного зачатка и участвуют в образовании органического белкового матрикса эмали за счет белок-синтетической функции [402]. Белок-синтетическая функция одонтобластов обуславливает формирование дентина зубного органа [108]. Мы оценивали белок-синтетическую функцию энамелобластов и одонтобластов новорожденных крыс путем выявления зон ядрышковых организаторов и подсчета количества ядрышек.

Гепатоциты новорожденных белых крыс характеризуются высокой интенсивностью синтеза ДНК и полиплоидизации [12]. Гепатоциты взрослых млекопитающих, преимущественно, находятся G<sub>0</sub>-фазе клеточного цикла [8].

Поджелудочная железа крыс представляет собой диффузный орган, располагающийся в брыжейке тонкой кишки [85, 105]. Изменение количества ядрышек в ядрах клеток отражает функциональную активность glanduloцитов поджелудочной железы [297].

В коже ушной раковины анализировали две клеточные популяции – эпителиоциты эпидермиса и фибробласты дермы. В эпителии подсчитывали пролиферирующие клетки герминативной зоны – базального и шиповатого слоев. Пролиферативную активность фибробластов анализировали в сосочковом слое дермы.

Митотическую активность и количество патологических митозов после исследуемого воздействия изучали на тотальных препаратах переднего эпителия роговицы. Передний эпителий роговицы является тканью с высокой пролиферативной активностью и служит классическим объектом для исследования митотической активности, вследствие возможности приготовления тотальных препаратов и достоверной идентификации фаз митоза и форм патологических митозов [33, 67].

Исследование *in vitro* проводили на первичной культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс. Фибробласты при культивировании обладают высокой пролиферативной активностью, что обеспечивает конфлюентный рост и формирование монослоев [332].

Широкий спектр исследуемых клеточных популяций был обусловлен необходимостью анализа универсальности и/или тканеспецифичности регистрируемых эффектов.

## 2.4. Организация экспериментов *in vivo*

### 2.4.1. Введение дигидрокверцетина и забор материала

Дигидрокверцетин вводили животным внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг. В литературе приводится широкий спектр доз дигидрокверцетина, используемых в экспериментах с белыми крысами: 100 мг/кг [265]; 10 и 20 мг/кг [390]; 10 и 100 мг/кг [23], 30 мг/кг [80]. В диссертационной работе Щукиной О.Г. [139] минимально действующей дозировкой у крыс при пероральном употреблении названа дозировка 86 мг/кг. Доза 50 мг/кг использовалась в работе Жердева В.П. [114]. В результате анализа литературы, нами была избрана доза для парентерального введения дигидрокверцетина 50 мг/кг, как приводящая к выраженному антиоксидантному эффекту.

Для исследования влияния дигидрокверцетина в периоде новорожденности, вещество вводили белым крысам с 2 по 6 сутки жизни ежедневно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество растворителя. Эвтаназию новорожденных крыс осуществляли с помощью быстрой декапитации на 7 сутки после рождения. Согласно классификации [35], с 1 по 7 сутки после рождения крыс считаются периодом новорожденности. Введение веществ производили в одно и то же время

(10 часов утра), учитывая суточный ритм анаболической активности ткани [108].  
 Забор материала осуществляли через 24 часа после заключительного введения.

3-месячным белым крысам дигидрокверцетин вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг ежедневно в течение 5 дней. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество растворителя. Эвтаназию животных производили через 24 часа после заключительной инъекции с помощью предварительного помещения крыс под воздействие паров хлороформа в течение 30 секунд и последующей декапитации на уровне шейного отдела позвоночника.

В течение эксперимента осуществляли гравиметрию животных в динамике.

#### 2.4.2. Моделирование гипоксического воздействия

Для моделирования окислительного стресса у половозрелых животных использовали модель гипобарической гипоксии. Данная модель основана на снижении парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе [8, 65, 73, 86, 102, 109]. Для «подъема» животных использовалась экспериментальная гипобарическая камера СБК-48 объемом 1,5 куб.м. Понижение давления в камере достигалось с помощью вакуумного пластинчатороторного электронасоса марки ВНК-2. Величину разрежения воздуха контролировали по манометру (цена деления 20 мм.рт.ст.). Гипобарическому воздействию крысы подвергались натощак (пищевая депривация в течение 18 часов). Создавалась гипобария, соответствующая высоте 9000 метров над уровнем моря: атмосферное давление 224 мм.рт.ст., парциальное давление кислорода 42 мм.рт.ст. (при норме 159 мм.рт.ст.). Эти показатели соответствуют тяжелой гипоксии [62, 102].

Экспозиция животных в гипобарической камере осуществлялась ежесуточно в течение 4-х часов. Воздействие проводили в течение 5 дней в одно и то же время – с 9 до 13 часов, учитывая хронобиологические особенности чувствительности к гипоксии [131]. Длительность компрессии и декомпрессии

составляла по одному часу (скорость 8-10 мм.рт.ст. в минуту). Динамика «подъема» и «спуска» подбиралась с учетом допустимых величин скорости измерения барометрического давления [61] для исключения баротравм. Экспозиция стационарной гипоксии составляла 2 часа. Температура воздуха в барокамере соответствовала температуре воздуха в лаборатории и составляла в среднем 18-22 градуса Цельсия.

#### 2.4.2.1. Моделирование антенатальной гипоксии

По классификации, гипобарическая модель антенатальной гипоксии является гипоксической экзогенной [82] и обусловлена недостатком поступления кислорода к плоду. Отмечается комплексный патогенез гипоксического состояния, усугубляющегося последующим нарушением работы сердца, метаболическим и дыхательным ацидозом [117]. Режим антенатальной гипоксии организовывали по принятой в лаборатории методике, основанной на клинических и экспериментальных данных.

Для получения беременных крыс с установленным сроком беременности, самок включали в эксперимент с учетом фазы эстрального цикла, в период диэструса. В каждую клетку (площадь 0,6 кв. м) помещали одного половозрелого самца и четырех половозрелых 3-месячных самок. Анализируя мазки из влагалища, устанавливали наличие беременности по нахождению сперматозоидов и последующему периоду межтечки. Беременных крыс-самок рассаживали по индивидуальным клеткам за три дня до предполагаемых родов. Согласно клиническим данным, гипоксия плода чаще всего диагностируется во второй половине беременности [117]. У крыс продолжительность беременности составляет 21-23 дня [35]. Гипобарическое воздействие проводили с 14 по 19 день беременности.

#### 2.4.2.2. Моделирование гипоксического воздействия на половозрелых животных

Оценка воздействия повторной гипобарической гипоксии проводилась на половозрелых 3-месячных белых крысах-самцах <sup>34</sup> линии Wistar средней массой 200 гр. Гипобарическую гипоксию по указанному выше методу проводили ежесуточно в течение 5 дней с 9 до 13 часов (4-х часовое воздействие). <sup>10</sup> Компрессию и декомпрессию проводили, соответственно, по одному часу.

#### 2.4.3. Приготовление гистологических препаратов

Ткани животных для гистологического исследования забирали тотчас после эвтаназии. У новорожденных животных осуществляли забор головного мозга (без обонятельных луковиц), ушной раковины, сердца, печени, фрагмента нижней челюсти. У половозрелых животных осуществляли забор головного мозга (без обонятельных луковиц), глазного яблока, сердца, печени, фрагмента двенадцатиперстной кишки с сальником, крови. Органы (головной мозг, печень, сердце) промывали в физиологическом растворе, обсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали на электронных весах «ВК-300», со II (высоким) классом взвешивания.

Материал подвергали фиксации в течение 24 часов в 10% формалине, приготовленном на фосфатном буферном растворе. После окончания фиксации, фрагменты ткани помещались для промывки под проточную воду на 24 часа, далее последовательно находились в батарее восходящих спиртов (40%, 60%, 70%, 96%, 100%) и ксилола, с последующим заключением в парафин. На микротоме “Leica” готовили срезы фрагментов тканей в парафине толщиной 5-6 мкм и помещали их на обезжиренные предметные стекла. <sup>7</sup> Гистологические срезы подвергались депарафинированию ксилолом и батареей нисходящих спиртов (100%, 96%, 70%).

#### 2.4.4. Приготовление радиоавтографов

У 7-суточных белых крыс процессы пролиферации в тканях оценивались методом авторадиографии с  $^3\text{H}$ -тимидином. За 60 минут до эвтаназии, крысам интраперитонеально вводили меченный тритием тимидин (уд. активность 84 Кюри/моль) в дозе 1 мкКюри на грамм веса.

Депарафинированные гистологические срезы исследуемых тканей покрывали, с помощью проволочной петли, тонким слоем ядерной фотоэмульсии (Iford, Великобритания), которую расплавляли в термостате при температуре 42°C в смеси с дистиллированной водой в соотношении 1:1 [34]. Приготовленные гистологические препараты, покрытые фотоэмульсией, помещали в светонепроницаемый контейнер и выдерживали при температуре 4-6°C в течение 3-4 недель. Время выдержки подбирали индивидуально в зависимости от исследуемого органа. По окончании необходимого времени экспозиции, препараты обрабатывали проявителем Д19, закрепляли тиосульфатом натрия и проводили окраску гематоксилином Лилли-Майера и эозином.

Пролиферативную активность определяли по наличию зерен серебра над ядром клетки (ядра, имеющие 5 и более треков серебра, считались мечеными). Подсчитывали индекс меченых ядер (ИМЯ, %) – долю меченых ядер в общем количестве ядер клеточной популяции. Индекс меченых ядер характеризует пул клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. В каждой исследуемой ткани для оценки индекса меченых ядер просматривали, как минимум, 1000 ядер.

Кроме того, подсчитывали показатель интенсивности метки (ИМ), как среднее число треков серебра над 50 ядрами в каждой клеточной популяции. По интенсивности метки косвенно оценивали скорость ДНК-синтетических процессов в клетках.

Микроскопирование радиоавтографов выполняли с помощью микроскопа «Jenalumar» (Германия), иммерсионного объектива 90х, окуляров 10х.

Исследовали ДНК-синтетическую активность эпителия ушной раковины, миокарда, печени, неокортекса и гиппокампа головного мозга (рисунок 4).

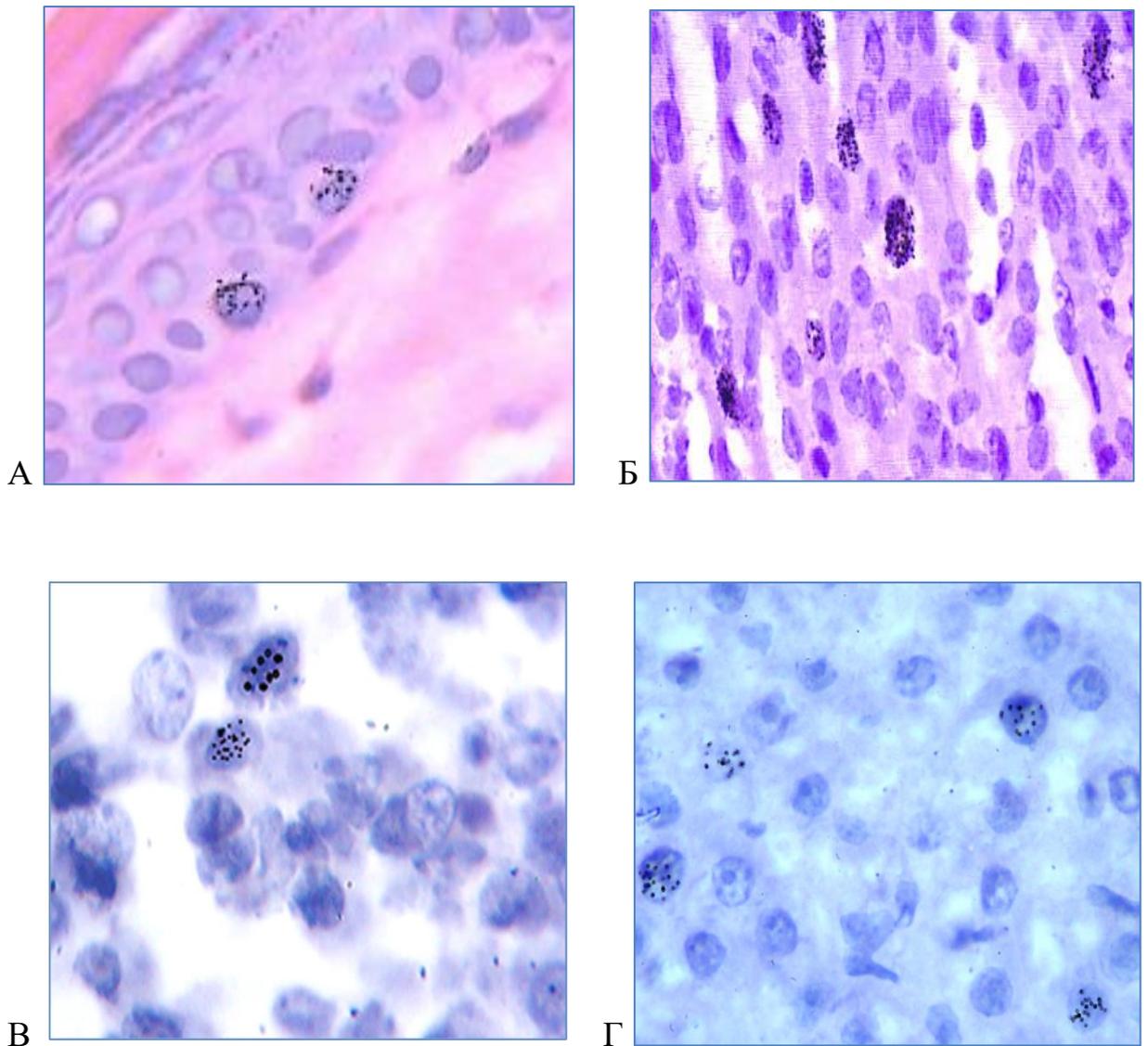


Рисунок 4 - Радиоавтографы исследованных тканей (иммерсионный объектив 90x, окуляры 10x): А – эпителий кожи 7-суточных белых крыс; Б – миокард субэндокардиальной зоны левого желудочка 7-суточных белых крыс; В – гиппокамп 7-суточных белых крыс; Г - гепатоциты 7-суточных белых крыс

#### 2.4.5. Определение митотического режима эпителиальной ткани

Роговицу левого глаза 3-месячных белых крыс использовали для приготовления тотального препарата. После фиксации и промывки глазного яблока осуществляли препаровку и выделение роговицы. Роговицу окрашивали гематоксилином Лилли – Майера, дифференцировали в слабом растворе солянокислого спирта, проводили по гистологической батарее восходящих спиртов. Просветляли в карбол-ксилоле и ксилоле, затем заключали в канадский бальзам. При проводке после 70°C спирта, роговицу надрезали по краям и делили на четыре сектора для равномерного расположения ее между предметным и покровным стеклом.

На тотальных препаратах роговицы в переднем эпителии (многослойный плоский неороговевающий эпителий) просматривали не менее 10000 эпителиоцитов для подсчета числа фигур митозов и вычисления митотического индекса (МИ) в промилле (рисунок 5). Также оценивали распределение митотических фигур по фазам митоза (профаза, метафаза, анафаза, телофаза) и подсчитывали долю патологических митозов (учитывали «мосты», отставание хромосом, многополюсные митозы).

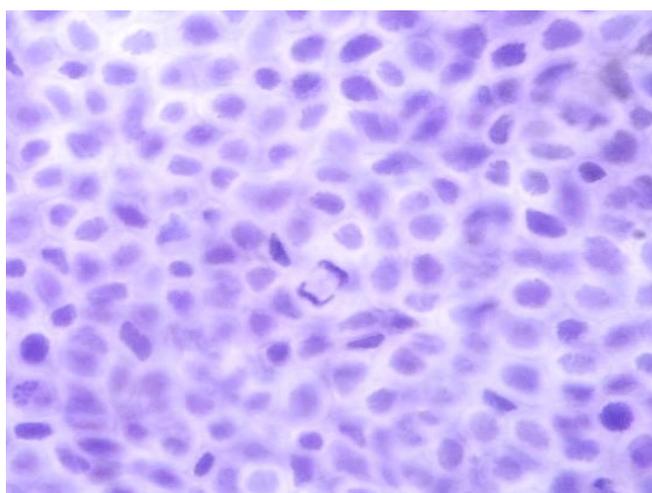


Рисунок 5 - Микропрепарат роговицы глаза (объектив 40х, окуляры 10х)

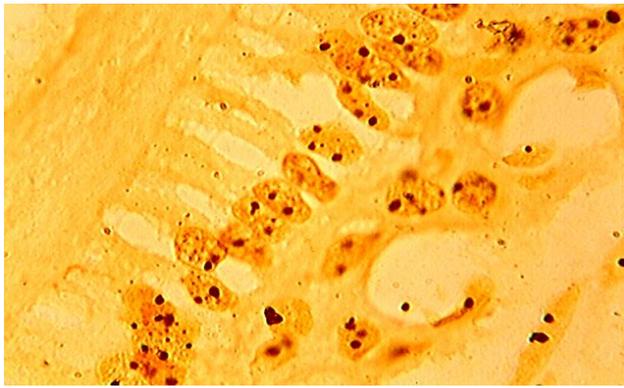
#### 2.4.6. Исследование нуклео-нуклеолярного аппарата клеток

По данным литературы, количество и размер ядрышек отражает активность белок-синтетических процессов в клетке [353]: показана прямая корреляция между количеством ядрышек и активностью синтеза белка [71, 137, 376]. Процесс регуляции синтеза РНК и образования рибосом зависит от ядрышкообразующих зон хромосом, которые связаны с кислыми негистоновыми аргентофильными белками, входящими в состав ядрышек [140].

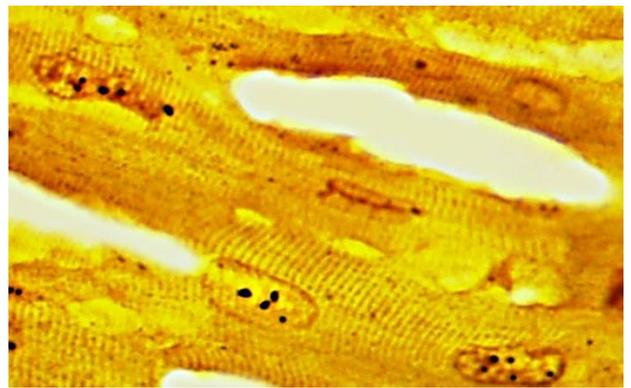
Методика окраски AgNOR проводилась для выявления ядрышек по методу, описанному в работах Мамаева Н.Н. и соавт. [72] и Коржевского Д.Э. [52]. Гистологические препараты депарафинировали, 20 минут выдерживали в 1% растворе муравьиной кислоты, промывали в дистиллированной воде в течение 10 минут. Смесь (1 часть желатина, приготовленная на 1% растворе муравьиной кислоты, 2 части 50% раствора азотнокислого серебра) наносили под покровное стекло, выдерживали в термостате 20 минут при температуре 37°C. При достижении оптимального окрашивания (оценивали визуально), срезы промывали в дистиллированной воде. Далее, препараты обезвоживали в батарее восходящей концентрации спиртов, просветляли в ксилоле и заключали под покровное стекло в канадский бальзам.

Морфометрию нуклео-нуклеолярного аппарата проводили, используя анализатор изображения "МЕКОС-Ц" (объектив 40х, окуляры 7х). В полуавтоматическом режиме высчитывалась площадь ядер и суммарную площадь ядрышек в 50 клетках каждой исследуемой ткани.

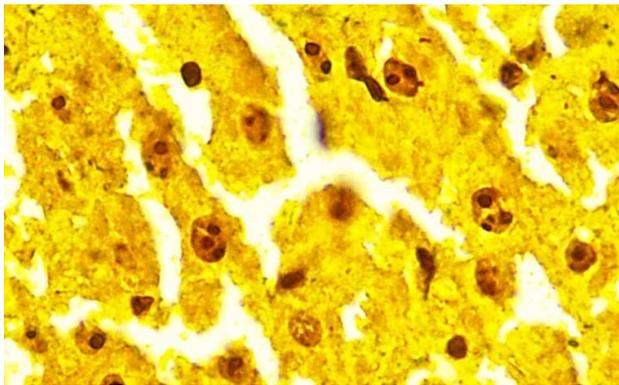
Среднее число ядрышек в ядрах клеток подсчитывали на микроскопе МИКМЕД-6 (объектив 90х, окуляр 7х), просматривая не менее 200 ядер в каждой клеточной популяции (рисунок 6).



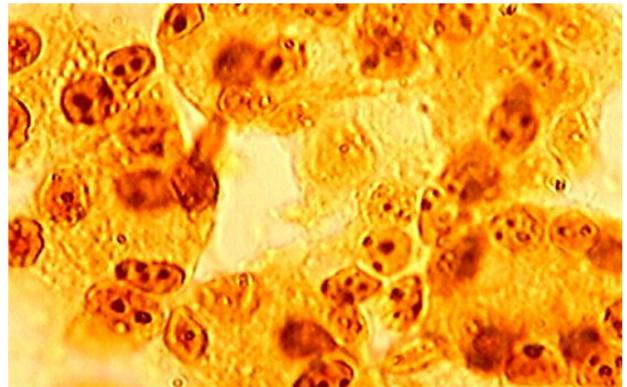
А



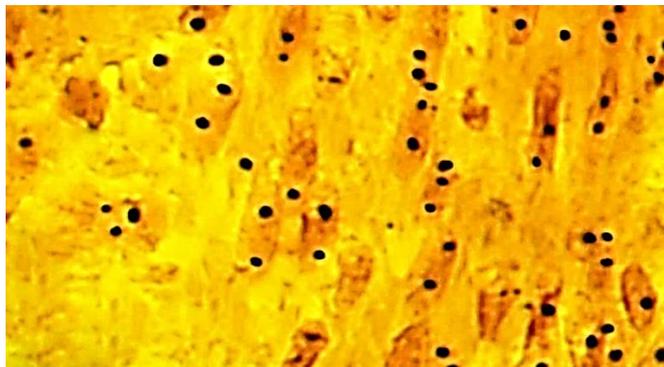
Б



В



Г



Д

Рисунок 6 - Микропрепараты исследованных тканей, окраска азотнокислым серебром (объектив 90х, окуляры 10х): А – энамелобласты зубного зачатка 7-суточной белой крысы; Б – кардиомиоциты 3-месячной белой крысы; В – гепатоциты 3-месячной белой крысы; Г - glanduloциты поджелудочной железы 3-месячной белой крысы, Д – гладкие миоциты двенадцатиперстной кишки 3-месячной белой крысы

#### 2.4.7. Метод хемилюминесценции (ХМЛ)

Для комплексной оценки процессов свободнорадикального окисления использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ): анализировали гомогенаты сердца, головного мозга, печени и сыворотку крови половозрелых животных.

Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER». Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы "Finlab". Спонтанную и индуцированную  $Fe^{2+}$  ХМЛ исследовали по методу [105]. 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 [16], 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.

Автор выражает свою благодарность за неоценимую помощь при проведении этой экспериментальной части исследования и обсуждении полученных результатов ведущему научному сотруднику Центральной научно-исследовательской лаборатории Дальневосточного государственного медицинского университета, директору Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания – НИИ охраны материнства и детства, д.м.н. Лебедько Ольге Антоновне.

#### 2.4.8. Определение уровня фактора роста нервов методом иммуноферментного анализа

Основными белками, отвечающими за дифференцировку, выживание, функционирование, синаптическую пластичность нейронов в центральной и периферической нервной системе являются нейротрофины: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4 (NT-4) [26, 358]. Наиболее важными считают фактор роста нервов и нейротрофический фактор мозга [39], синтез которых происходит, в первую очередь, в исследуемых нами зонах – в неокортексе и гиппокампе [369]. Фактор роста нервов обеспечивает работу и выживание холинергических нейронов базальных ганглиев переднего мозга, координирующих связь гиппокампа и неокортекса [274, 280]; сохраняет популяцию нейронов и связь между ними на должном уровне, регулирует репарационные процессы [39]; принимает участие в защите головного мозга после ишемии и реперфузии [143].

В образцах сыворотки крови 3-месячных самцов определяли уровень фактора роста нервов иммуноферментным методом на аппарате BIO-RAD Model 550 Microplate Reader с использованием коммерческих иммуноферментных наборов (Rat Nerve Growth Factor (NGF) ELISA Kit) компании Cusabio Biotech Co., Ltd (Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Забор крови осуществляли во время эвтаназии животных, не получавших еду и воду в течение 16 часов. Кровь подвергали центрифугированию. Для получения сыворотки (100 мкл) плазму очищали путём естественного свертывания от фибриногена.

Концентрацию фактора роста нервов в сыворотке крови определили по следующей методике: необходимые реагенты доводили до комнатной температуры, центрифугировали, разводили до нужных концентраций. На планшете в каждую лунку добавляли 100 мкл стандартного раствора (Standart) и 100 мкл исследуемой сыворотки (образца), накрывали клейкой лентой. Время инкубации образцов сывороток составляло 2 часа при температуре 37 °С. После чего жидкость удаляли, не промывая лунки. Далее, добавляли 100 мкл

концентрированного раствора биотин-антитела (Biotin-antibody 1x) в каждую лунку, накрывали клейкой лентой и повторно инкубировали (1 час, температура 37°C). Жидкость аспирировали, лунку мыли раствором промывочного буфера объемом 200 мкл <sup>1</sup> трехкратно. Сушку планшета осуществляли фильтровальной бумагой. В каждую лунку планшета добавляли концентрированный раствор HRP-авидина (HRP-avidin 1x) (100 мкл) и накрывали планшет новой клейкой лентой, и инкубировали в течение 60 минут при температуре <sup>37</sup> 37°C. Из лунок жидкость удаляли и мыли промывочным раствором буфера объемом 200 мкл пятикратно. Планшет переворачивали и сушили при помощи фильтровальной бумаги. В каждую лунку помещали 90 мкл ТМВ-субстрата (ТМВ Substrate), выдержку проводили в течение 15-30 минут при температуре <sup>37</sup> 37°C в темном месте. Добавляли 50 мкл стоп-раствора (Stop Solution) в каждую лунку и перемешивали. На заключительном этапе оценивали оптическую плотность каждой лунки в течение 5 минут (аппарат BIO-RAD Model 550 Microplate Reader) с длиной волны 450 нм. Вычитали показания с поправкой на длину волны, что позволило откорректировать оптические дефекты. <sup>1</sup>

## 2.5. Организация эксперимента in vitro

Для исследования влияния окислительного стресса и антиоксиданта in vitro использовали <sup>2</sup> первичную культуру пульмональных фибробластов <sup>9</sup> 7-суточных белых крыс линии Wistar.

Биоптаты правого легкого <sup>9</sup> 7-суточных белых крыс дезагрегировали механически, обрабатывали коллагеназой панкреаса краба (Биолот, Россия) (500 ед/мл, <sup>9</sup> температура 37°C, 15 минут), отмывали дважды раствором Хенкса (Биолот, Россия) <sup>9</sup> и высевали в культуральные флаконы. Культивирование <sup>9</sup> пульмональных фибробластов осуществлялось в <sup>2</sup> среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США) в газовой среде с 5% содержанием <sup>9</sup> CO<sub>2</sub>. <sup>23</sup> Для исследования использовали клетки <sup>9</sup> 5 пассажа. В эксперименте исследовали <sup>4</sup> 36 монослоев фибробластов.

Для оценки влияния антиоксиданта дигидрокверцетина (Sigma Aldrich, США) *in vitro*, пульмональные фибробласты инкубировали с антиоксидантом в течение 6 часов при концентрации вещества в культуральной среде 160 мкМ (50 мг/л).

Добавление в культуру клеток 0,001мл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60 мкМ) с экспозицией в течение 2 часов моделировало окислительный стресс [21]. Были определены следующие экспериментальные серии: 1 - "контроль"; 2 - "ДГК" (воздействие дигидрокверцетина в течение 6 часов); 3 - "окислительный стресс" (добавление в культуральную среду H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с экспозицией в течение 2 часов); 4 - "ДГК + окислительный стресс" (воздействие дигидрокверцетина в течение 6 часов с обработкой культуры в заключительные 2 часа инкубации перекисью водорода).

Пролиферативную активность пульмональных фибробластов оценивали с помощью метода авторадиографии с <sup>3</sup>H-тимидином: клеточные монослои 60 минут инкубировали при температуре 37°C в растворе Хенкса с <sup>3</sup>H-тимидином (1 мкКюри/мл), промывали в растворе Хенкса и фиксировали в 96% этиловом спирте. Монослои фибробластов на гистологических стеклах покрывали ядерной фотоэмульсией Ilford (Великобритания). Инкубацию монослоев проводили при температуре 4°C в течение 28 суток. Далее обрабатывали проявителем Д-19 с фиксацией в растворе гипосульфита натрия (33%), окрашивали гематоксилином. Индекс меченых ядер рассчитывали путем просмотра 10000 фибробластов каждого монослоя и выражали в процентах (рисунок 7).

Параметры нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов анализировали с помощью компьютерной морфоцитометрии (аппарат «МЕКОС-Ц», объектив 40х, окуляры 7х) в монослоях фибробластов, окрашенных по методу AgNOR [52, 53]: оценивали площадь ядер, суммарную площадь и среднее количество ядрышек. В каждом монослое проводили морфометрию 50 клеток. На микроскопе Биолам (объектив 90х, окуляр 7х) осуществляли подсчет среднего числа ядрышек путем просмотра не менее 200 ядер фибробластов.

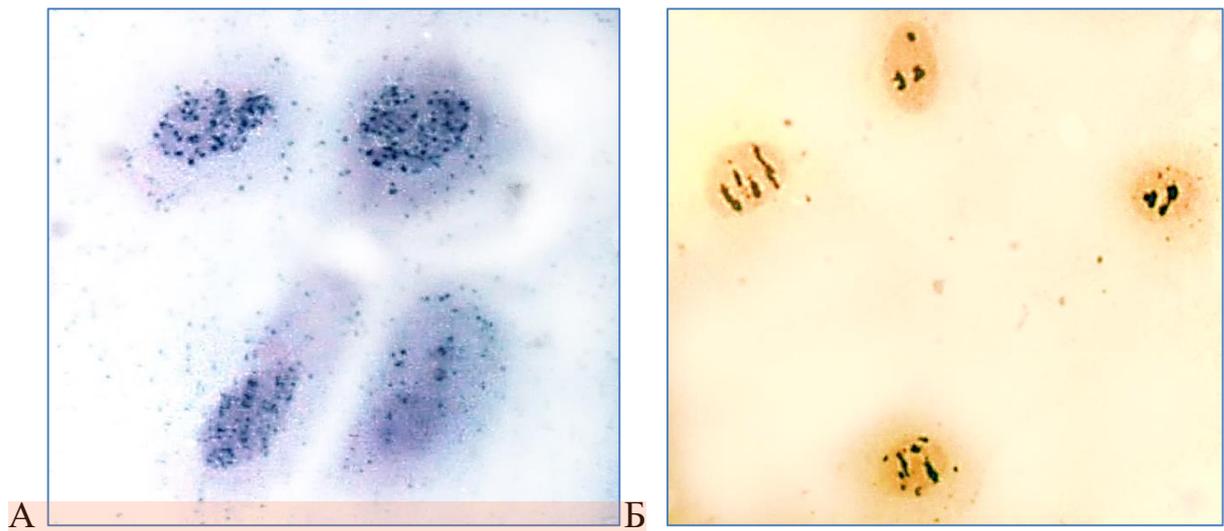


Рисунок 7 - Микропрепараты пульмональных фибробластов: <sup>2</sup>

А – радиоавтографы культуры пульмональных фибробластов (иммерсионный объектив 90х, окуляры 10х);

Б – культура пульмональных фибробластов, окрашенных азотнокислым серебром (объектив 90х, окуляры 7х)

Метод люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии клеток позволяет оценивать интенсивность процессов генерации пульмональными фибробластами супероксид-анион радикалов [16, 308]. Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50В «PERKIN ELMER», сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы «Finlab». С помощью раствора трипсина-Версена (Биолот, Россия) фибробласты снимались с подложки и трехкратно отмывались раствором Хенкса. В камере Горяева проводили подсчет клеток в суспензии фибробластов. Для хемилюминесцентного анализа использовали  $1 \times 10^6$  клеток. Люцигенин (*N, N'*-dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate; Sigma-Aldrich) добавляли в конечной концентрации 5  $\mu\text{M}$  и определяли светосумму люцигенин-зависимого свечения (Sluc) за 5 минут, выраженную в относительных единицах. Хемилюминесцентное исследование проводили под руководством ведущего научного сотрудника Центральной научно-исследовательской лаборатории

Дальневосточного государственного медицинского университета д.м.н. О.А. Лебедько.

## 2.6. Статистическая обработка данных

Для проведения статистической обработки данных экспериментальных исследований<sup>91</sup> использовался пакет прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoftInc., США, 2006). Статистические выборки подвергали исследованию на нормальность распределения, используя W-критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения признаков, данные представляли в виде среднего значения (M), стандартной ошибки среднего (m). Для проведения парных сравнений показателей между группами «опыт» - «контроль» проводили с использованием t-критерия Стьюдента<sup>2</sup>. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .<sup>12</sup><sup>96</sup>

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 96

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

##### 3.1.1. Влияние окислительного стресса на различные клеточные популяции половозрелых белых крыс

В первой серии экспериментов 3-месячные белые крысы-самцы линии Wistar были подвергнуты пятикратной гипобарической гипоксии. Ежедневно на протяжении 5 суток животных помещали в гипобарическую камеру и «поднимали на высоту 9000 м». «Подъем» и «спуск» осуществляли в течение 60 мин со скоростью 2,5 м/сек, стабильную гипоксию – в течение 120 мин.

Гравиметрические показатели массы тела, массы головного мозга и печени животных после гипоксического воздействия не изменились относительно контрольной группы (таблица 1). Однако, после пятикратной гипобарической гипоксии было выявлено увеличение массы сердца на 15,21% и уменьшение массы тимуса на 25,75% (таблица 1).

Таблица 1 – Гравиметрические показатели 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

Орган	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
Масса тела (г)	236,25±25,6	242,5±8,86
Масса головного мозга (г)	1,257±0,19	1,297±0,17
Масса печени (г)	12,36±1,37	11,99±0,72
Масса сердца (г)	0,894±0,097	1,03±0,075* p=0,007
Масса тимуса (г)	0,501±0,094	0,372±0,094* p=0,016

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

Хемилюминесцентный анализ сыворотки крови подопытных животных, подвергнутых гипоксии, выявил выраженный окислительный стресс на системном уровне: все исследованные параметры ХМЛ достоверно превышали контрольные показатели (таблица 2):  $S_{sp}$  увеличился в 2,55 раза,  $H1$  - в 3,06 раза,  $S1_{ind}$  - в 2,41 раза,  $H2$  - в 2,26 раза,  $S2_{ind}$  - в 2,39 раза.

Таблица 2 - Хемилюминесцентные параметры (отн. ед.) сыворотки крови 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
$S_{sp}$	0,196±0,010	0,500±0,039* p=0,00001
$S1_{ind}$	0,502±0,039	1,210±0,060* p=0,00001
$H1$	0,157±0,008	0,480±0,015* p=0,00002
$S2_{ind}$	2,448±0,129	5,840±0,340* p=0,00002
$H2$	1,886±0,120	4,260±0,370* p=0,0001

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

Анализ нуклеолярного аппарата нейронов белых крыс после воздействия пятикратной гипобарической гипоксии не выявил достоверных отличий между контрольной и подопытной группами по показателю среднего количества ядрышек ни в одной из исследованных зон головного мозга (рисунок 8).

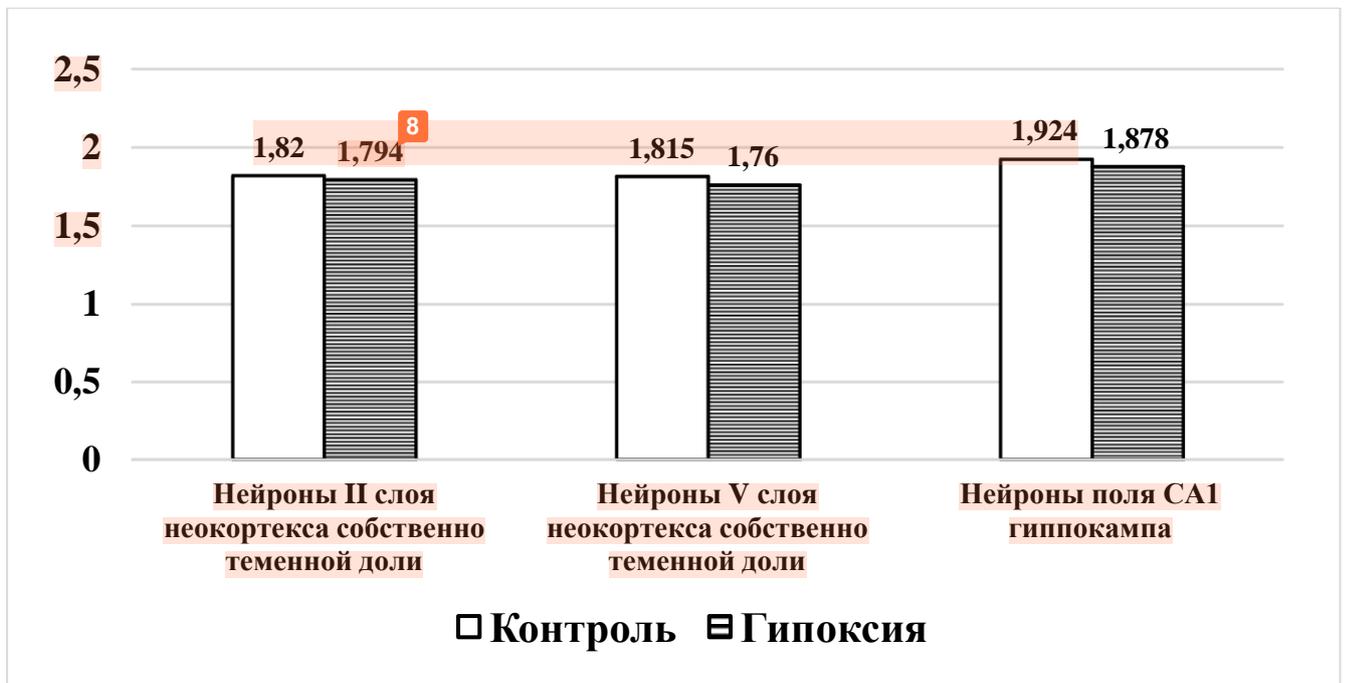
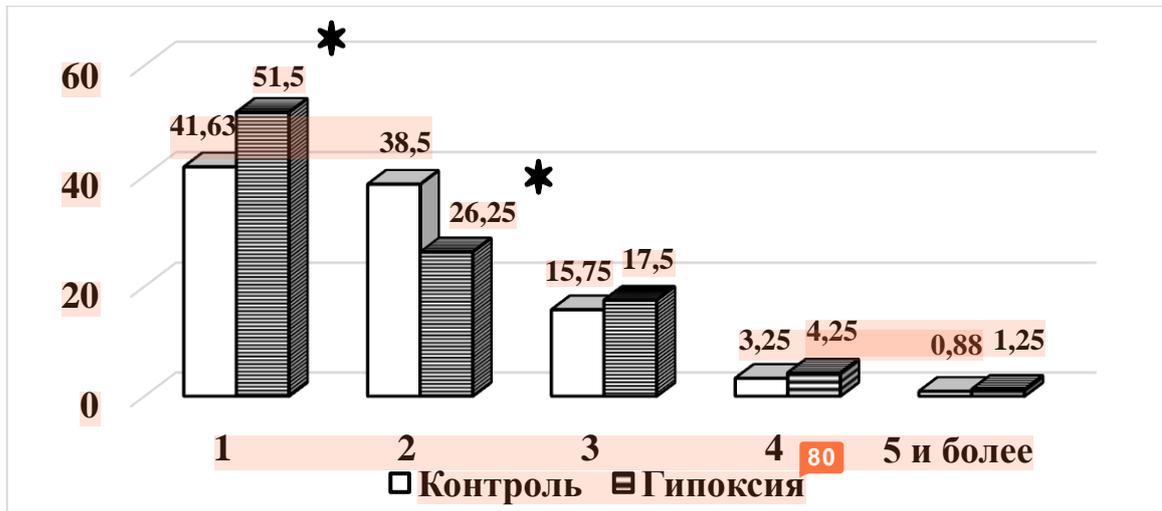


Рисунок 8 - Количество ядрышек в нейронах головного мозга 3-месячных белых крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

Соотношение субпопуляций нейронов по количеству ядрышек в ядрах после гипоксического воздействия претерпевало достоверные изменения относительно контрольной группы (рисунок 9). Во II слое неокортекса собственно теменной доли <sup>13</sup> имело место существенное увеличение (на 23,7%) количества одноядрышковых нейронов и уменьшение (на 31,8%) количества <sup>13</sup> двухядрышковых нейронов. В IV слое неокортекса собственно теменной доли мы также регистрировали достоверное (на 21,5%) увеличение количества одноядрышковых нейронов. Таким образом, гипоксическое воздействие привело к угнетению нуклеолярного аппарата нейронов неокортекса.

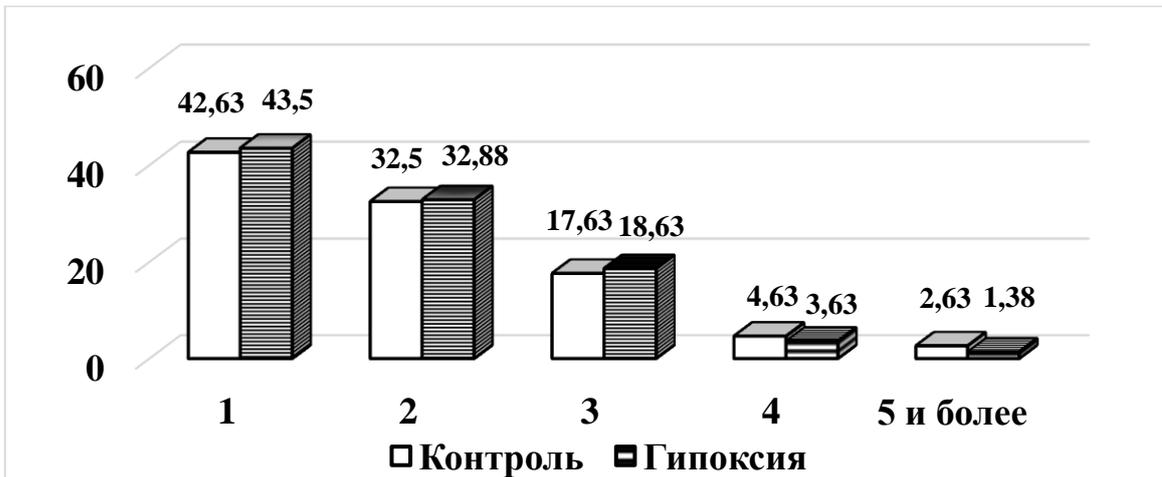
Гипоксическое воздействие вызывало выраженный окислительный стресс в ткани головного мозга подопытных животных. <sup>18</sup> Показатель  $S_{sp}$  повысился на 174%;  $S1_{ind}$  - на 109,5%;  $H1$  - на 82,4%;  $S2_{ind}$  - на 207,8%,  $H2$  - на 217,3% (таблица 3).



А



Б



В

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

Рисунок 9 - Распределение нейронов головного мозга 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых гипобарической гипоксии, по субпопуляциям с разным количеством ядрышек (А – II слой неокортекса собственно теменной доли; Б – V слой неокортекса собственно теменной доли; В – поле CA1 гиппокампа)

Таблица 3 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов головного мозга 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
$S_{sp}$	0,131±0,011	0,359±0,026* p=0,0001
$S1_{ind}$	0,818±0,069	1,714±0,107* p=0,0001
H1	0,784±0,049	1,43±0,069* p=0,0001
$S2_{ind}$	4,198±0,338	12,923±0,859* p=0,0001
H2	3,126±0,283	9,918±0,986* p=0,0001

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

Гипоксическое воздействие индуцировало существенное снижение морфометрических показателей кардиомиоцитов: у 3-месячных белых крыс после воздействия пятикратной гипоксии имело место статистически достоверное снижение площади ядер кардиомиоцитов правого и левого желудочков (на 20,8% и 9,9%, соответственно) и суммарной площади ядрышек в ядрах кардиомиоцитов <sup>15</sup> левого и правого желудочков (на 13,8 и 26,5%, <sup>12</sup> соответственно). При этом изменений количества ядрышек в ядрах кардиомиоцитов выявлено не было (таблица 4). Анализ распределения ядер кардиомиоцитов по субпопуляциям с разным количеством ядрышек также не выявил отличия группы «Гипоксия» от группы «Контроль».

ХМЛ исследование гомогенатов сердца 3-месячных животных, подвергнутых пятикратной гипоксии, показало, по сравнению с контрольными параметрами, достоверное увеличение  $S_{sp}$  более чем в 3 раза,  $S1_{ind}$  - в 1,67 раза, H1 - в 2,83 раза,  $S2_{ind}$  и H2 – в 2,38 раза и 2,63 раза, соответственно (таблица 5).

Таблица 4 - Показатели нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
Левый желудочек		
Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> )	48,80±1,16	43,97±1,23* p=0,0047
Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> )	3,69±0,14	3,18±0,12* p=0,0059
Количество ядрышек	1,97±0,07	2,04±0,14
Правый желудочек		
Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> )	50,45±1,53	39,95±1,21* p=0,00001
Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> )	2,75±0,10	2,02±0,10* p=0,0001
Количество ядрышек	1,93±0,03	2,00±0,05

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

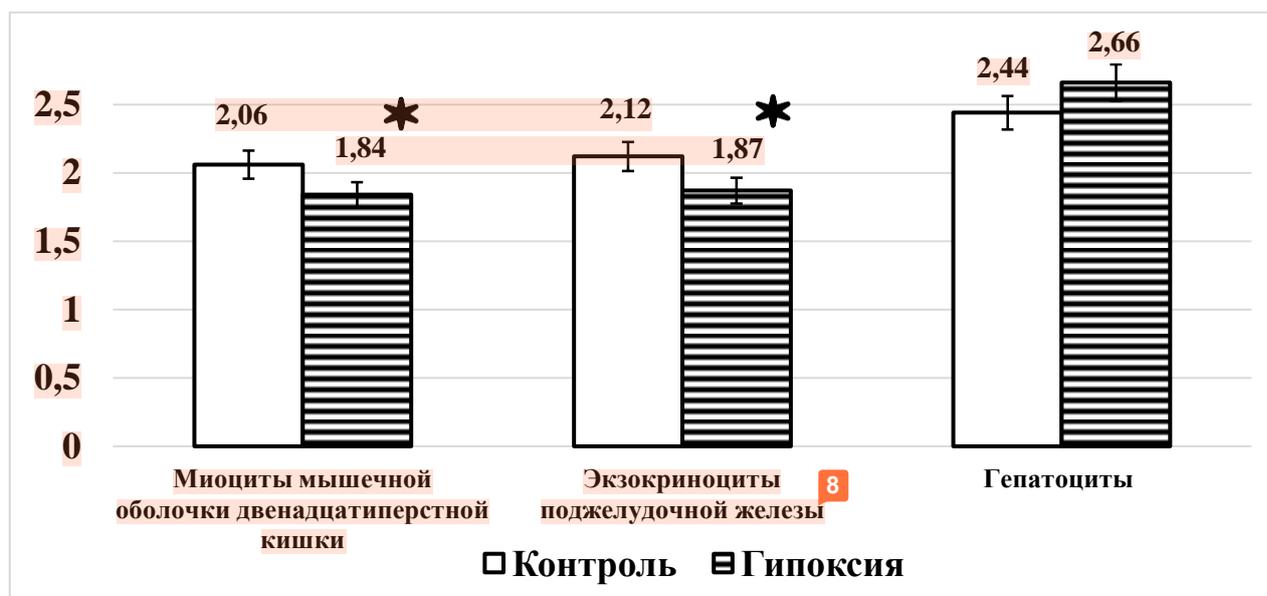
Таблица 5 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов сердца 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипобарической гипоксии

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
S <sub>sp</sub>	0,100±0,009	0,301±0,024* p=0,000001
S1 <sub>ind</sub>	0,699±0,053	1,177±0,091* p=0,0005
H1	0,465±0,038	1,314±0,063* p=0,00001
S2 <sub>ind</sub>	4,288±0,277	10,222±0,828* p=0,000009
H2	3,248±0,248	8,538±0,689* p=0,000012

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

После пятикратного гипоксического воздействия, у 3-месячных животных произошли достоверные изменения в структурах пищеварительной системы: снизилось среднее количество ядрышек в ядрах гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки на 10,4% и в ядрах экзокриноцитов поджелудочной железы на 11,9% (рисунок 10). Эффект подтверждался изменением

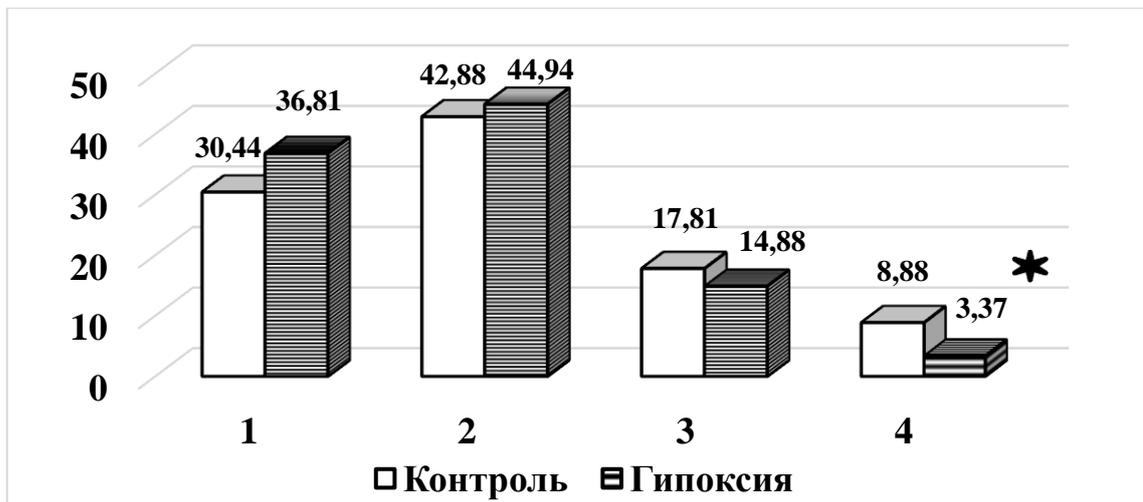
распределения субпопуляций ядер с разным количеством ядрышек (рисунок 11): в кишечнике и в поджелудочной железе существенно уменьшалось количество ядер с 3-4 ядрышками. Достоверных изменений нуклеолярного аппарата гепатоцитов после гипоксического воздействия выявлено не было (рисунок 10, 11).



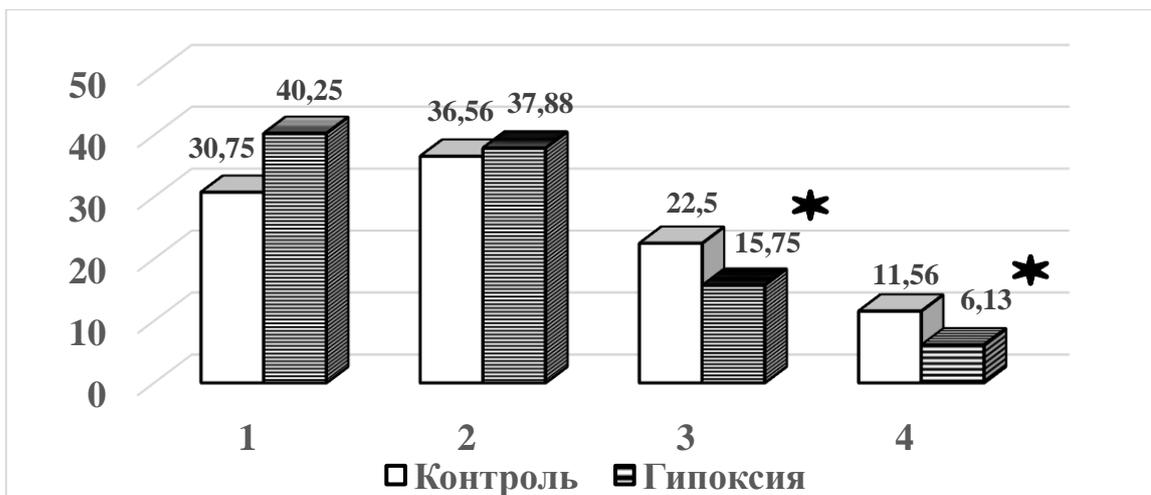
Примечание - \* - отличия достоверны по отношению к группе «Контроль»

Рисунок 10 - Количество ядрышек в ядрах клеток пищеварительной системы 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипоксии

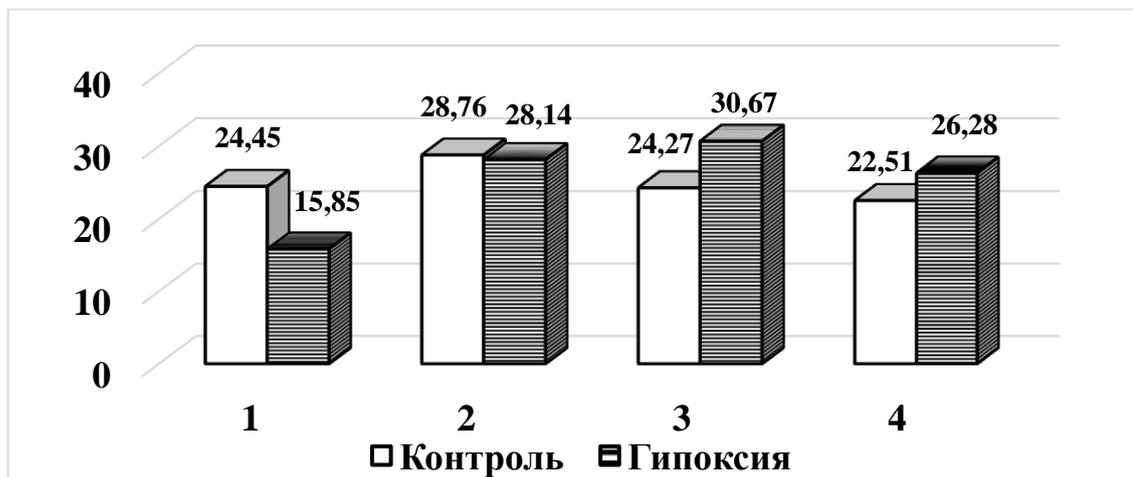
Несмотря на отсутствие зарегистрированных изменений показателей нуклеолярного аппарата гепатоцитов животных, подвергнутых повторному гипоксическому воздействию, хемилюминесцентный анализ выявил существенные изменения свободнорадикальных процессов в ткани печени: в группе «Гипоксия», по сравнению с группой «Контроль», имело место увеличение показателя  $S_{sp}$  – в 3,7 раз,  $S1_{ind}$  – в 2,4 раза,  $H1$  – в 3,2 раза,  $S2_{ind}$  – в 3,15 раз,  $H2$  – в 3,5 раз (таблица 6). Полученные результаты говорят о наличии интенсивного окислительного стресса и снижении антиоксидантной защиты в ткани печени животных, перенесших гипобарическую гипоксию.



А



Б



В

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

Рисунок 11 - Распределение клеток органов пищеварительной системы по субпопуляциям с разным количеством ядрышек (А - миоциты двенадцатиперстной кишки; Б – экзокриноциты поджелудочной железы; В - гепатоциты)

Таблица 6 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов печени 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратной гипоксии

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
S <sub>sp</sub>	0,089±0,006	0,322±0,028* p=0,000002
S1 <sub>ind</sub>	0,611±0,039	1,489±0,095* p=0,00001
H1	0,395±0,024	1,246±0,101* p=0,00001
S2 <sub>ind</sub>	4,008±0,290	12,630±0,450* p=0,000001
H2	3,102±0,270	10,799±0,820* p=0,00001

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

Таким образом, пятикратное гипоксическое воздействие уменьшило количество ядрышек в ядрах миоцитов двенадцатиперстной кишки и экзокриноцитов поджелудочной железы, а также индуцировало состояние окислительного стресса в ткани печени.

Анализ митотической активности в наружном эпителии роговицы после воздействия повторной гипоксии не выявил достоверных изменений относительно контрольной группы: все исследуемые данные оставались на уровне контрольных значений (таблица 7).

Таблица 7 - Показатели митотической активности переднего эпителия роговицы 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых пятикратному воздействию гипобарической гипоксии

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»
Митотический индекс, промилле	4,57±0,30	4,33±0,54
Профазы, %	56,56±2,80	50,38±2,03
Метафазы, %	22,97±3,04	25,68±2,34
Анафазы, %	14,21±1,91	14,97±2,04
Телофазы, %	5,88±0,88	8,41±1,34
Патологический митозы, %	0,38±0,16	0,55±0,26
Профазно-метафазный коэффициент, отн. ед.	2,87±0,47	2,05±0,22

Таким образом, пятикратная гипобарическая гипоксия индуцировала у 3-месячных крыс-самцов состояние стресса, на что указывает уменьшение массы тимуса исследуемых животных. Было также выявлено существенное изменение процессов свободнорадикального окисления: активация генерации АФК и угнетение антиоксидантной защиты регистрировалось как на системном, так и на тканевом уровнях. Подобные изменения редокс-статуса указывают на развитие окислительного стресса [186]. Состояние окислительного стресса сопровождалось снижением показателей нуклео-нуклеолярного аппарата нейронов неокортекса, кардиомиоцитов, миоцитов двенадцатиперстной кишки и экзокриноцитов поджелудочной железы, что может свидетельствовать об угнетении анаболических процессов в этих клеточных популяциях.

### 3.1.2. Пролиферативные и анаболические процессы в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Изучали 7-суточное потомство белых крыс-самок, подвергнутых гипобарической гипоксии с 14 по 19 сутки гестации. Гравиметрические показатели 7-суточных животных после перенесенной антенатальной гипоксии достоверно отличались от показателей контрольной группы: имело место снижение массы тела на 24,8%, абсолютной массы печени на 19,21%, массы сердца на 25,6% (таблица 8).

Таблица 8 - Влияние антенатальной гипоксии на гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс

Показатель	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Антенатальная гипоксия»
Масса тела (г)	14,40±0,36	10,83±0,41* p=0,04
Масса печени (мг)	420,56±20,76	339,78±18,00* p=0,001
Масса сердца (мг)	95,20±6,43	70,86±5,50* p=0,015

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

Эти результаты соответствуют ранее полученным в нашей лаборатории данным о влиянии гипоксического воздействия во время гестации на гравиметрические показатели потомства [17, 18].

Авторадиографическое исследование показало наличие достоверных изменений ДНК-синтетических процессов в головном мозге подопытных животных: было зарегистрировано статистически достоверное уменьшение показателя индекса меченных ядер нейронов неокортекса на 47,9% и нейронов поля СА1 гиппокампа – на 53,71% (таблица 9).

Таблица 9 - Показатели ДНК-синтетических процессов в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Орган	ИМЯ (%)	
	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Антенатальная гипоксия»
Нейроны собственно теменной доли коры больших полушарий	1,096±0,233	0,571±0,049* p=0,003
Нейроны поля СА1 гиппокампа	0,728±0,155	0,337±0,061* p=0,016
Кардиомиоциты левого предсердия	5,76±0,67	3,87±0,29* p=0,03
Кардиомиоциты правого предсердия	5,49±0,67	3,80±0,29* p=0,04
Кардиомиоциты левого желудочка	8,33±0,67	5,60±0,21* p=0,001
Кардиомиоциты правого желудочка	6,56±0,64	4,33±0,17
Гепатоциты	2,37±0,44	1,34±0,26* p=0,04
Эпителиоциты кожи	10,79±1,38	7,58±0,68* p=0,042
Фибробласты дермы кожи	5,59±0,62	4,53±0,29

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

Достоверное угнетение синтеза ДНК после антенатальной гипоксии мы регистрировали в миокарде: снижение доли кардиомиоцитов, находящихся в S-фазе клеточного цикла, в миокарде левого предсердия (на 32,81%), правого

предсердия (на 30,78%) и левого желудочка (на 32,77%). Эти данные можно интерпретировать, как негативное влияние антенатальной гипоксии на миокард новорожденных животных, что подтверждается ранее проведенными исследованиями [18, 38, 283].

Кроме того, было зарегистрировано снижение скорости ДНК-синтетических процессов: достоверное уменьшение показателей интенсивности метки в кардиомиоцитах левого желудочка (контроль –  $21,90 \pm 0,93$ , опыт –  $17,44 \pm 1,70$ ) и правого желудочка (контроль –  $21,54 \pm 0,71$ , опыт –  $16,09 \pm 1,57$ ).

Также, у 7-суточных крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, было выявлено снижение ДНК-синтетической активности гепатоцитов на 43,5%; эпителиоцитов кожи - на 29,7% (таблица 9).

Данные результаты соответствуют ранее полученным в лаборатории сведениям о влиянии антенатальной гипоксии на ДНК-синтетические процессы в тканях 7-суточных экспериментальных животных [17, 38, 106].

Анаболическую активность клеток косвенно оценивали по параметрам нуклеолярного аппарата ядер. Антенатальная гипоксия достоверно снизила количество ядрышек в ядрах нейронов II-го слоя неокортекса на 19,2% (таблица 10). Уменьшение количества ядрышек было выявлено в энамелобластах зубных зачатков нижней челюсти (на 16,1%) и в гепатоцитах (на 6,1%) (таблица 10).

Таблица 10 - Количество ядрышек в ядрах клеток различных клеточных популяций 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Орган	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Антенатальная гипоксия»
Нейроны II слоя неокортекса	$1,98 \pm 0,09$	$1,60 \pm 0,02$ * p=0,001
Нейроны V слоя неокортекса	$1,46 \pm 0,06$	$1,35 \pm 0,05$
Нейроны поля CA1 гиппокампа	$1,92 \pm 0,08$	$1,81 \pm 0,06$
Кардиомиоциты левого желудочка	$2,19 \pm 0,05$	$2,24 \pm 0,07$
Кардиомиоциты правого желудочка	$2,10 \pm 0,05$	$2,25 \pm 0,05$
Энамелобласты	$4,190 \pm 0,156$	$3,520 \pm 0,170$ *, p=0,04
Одонтобласты	$3,065 \pm 0,141$	$3,070 \pm 0,110$
Хондроциты	$2,503 \pm 0,070$	$2,459 \pm 0,062$
Гепатоциты	$2,727 \pm 0,044$	$2,56 \pm 0,04$ *, p=0,01

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

Таким образом, у 7-суточных белых крыс, подвернутых антенатальной гипоксии, было выявлено угнетение пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций.

### 3.1.3. Влияние окислительного стресса на пролиферативные и анаболические процессы в первичной культуре пульмональных фибробластов

Мы исследовали влияние непосредственного воздействия избытка АФК на пролиферативную активность и состояние нуклео-нуклеолярного аппарата клеток первичной культуры пульмональных фибробластов.

Введение  $H_2O_2$  в концентрации 60 мкМ в культуральную среду способствовало достоверному повышению интенсивности люцигенен-зависимой ХМЛ на 78,3% (контроль –  $0,470 \pm 0,021$ ; опыт –  $0,838 \pm 0,022^*$ ;  $p=0,00001$ ) и практически полной остановке пролиферативных процессов: в монослоях клеток, после воздействия перекиси водорода, выявлялись лишь единичные меченные  $^3H$ -тимидином ядра с крайне слабой интенсивностью метки.

Эти изменения сочетались с достоверным уменьшением морфометрических параметров нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов: показателя площади ядер (на 63 %), суммарной площади ядрышек (на 51,6 %) и среднего количества ядрышек в ядрах (Таблица 11).

Таблица 11 - Параметры нуклео-нуклеолярного аппарата в первичной культуре пульмональных фибробластов, подвергнутых воздействию перекиси водорода

Исследуемая серия	Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> )	Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> )	Количество ядрышек
Серия «Контроль»	$218,60 \pm 4,39$	$17,03 \pm 0,39$	$3,95 \pm 0,07$
Серия «Перекись водорода»	$80,83 \pm 3,46^*$ $p=0,00001$	$8,24 \pm 0,46^*$ $p=0,000015$	$3,11 \pm 0,10^*$ $p=0,00001$

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

### 3.2. Влияние дигидрохверцетина на пролиферативную и анаболическую активность различных клеточных популяций в условиях окислительного стресса

#### 3.2.1. Влияние дигидрохверцетина на различные клеточные популяции половозрелых белых крыс в условиях окислительного стресса

В этой серии экспериментов 3-месячные белые крысы-самцы линии Wistar были подвергнуты пятикратной гипобарической гипоксии (ежесуточно на протяжении 5 суток) с предварительным (перед каждым гипоксическим воздействием) внутривентральным введением дигидрохверцетина (50 мг/кг).

Предварительное введение дигидрохверцетина нивелировало негативное влияние гипоксии на массу тимуса и сердца (таблица 12).

Таблица 12 - Гравиметрические показатели 3-месячных белых крыс исследуемых групп

Орган	Группа животных «Контроль» <sup>12</sup>	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
Масса тела (г)	236,25±25,62	242,5±8,86	232,22±13,02
Масса головного мозга (г)	1,26±0,19	1,31±0,17	1,19±0,13
Масса печени (г)	12,36±1,37	11,99±0,72 <sup>15</sup>	11,63±1,24
Масса сердца (г)	0,89±0,11	1,03±0,08* p=0,007	0,93±0,07
Масса тимуса (г)	0,50±0,09	0,372±0,10* p=0,016	0,42±0,15

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

Хемилюминесцентный анализ сыворотки крови половозрелых животных, подвергнутых пятикратному гипоксическому воздействию с предварительным введением дигидрохверцетина (группа «ДГК+гипоксия»), выявил сохранение проявлений окислительного стресса: показатель  $S_{sp}$  превышал контрольный

параметр на 58,2%;  $S_{1_{ind}}$  - на 37,5%;  $H_1$  - на 46,5%;  $S_{2_{ind}}$  - на 58,0%,  $H_2$  - на 29,9% (таблица 13). Вместе с тем, ХМЛ-параметры сыворотки крови животных группы «ДГК+гипоксия» были достоверно меньше, чем показатели животных, подвергнутых гипоксии без предварительного введения дигидрохверцетина: показатель  $S_{sp}$  снизился на 38,0%;  $S_{1_{ind}}$  - на 43,0%;  $H_1$  - на 52,0%;  $S_{2_{ind}}$  - на 33,7%,  $H_2$  - на 42,5% (таблица 13). Это свидетельствует о проявлении системного антиоксидантного эффекта дигидрохверцетина при гипоксическом воздействии.

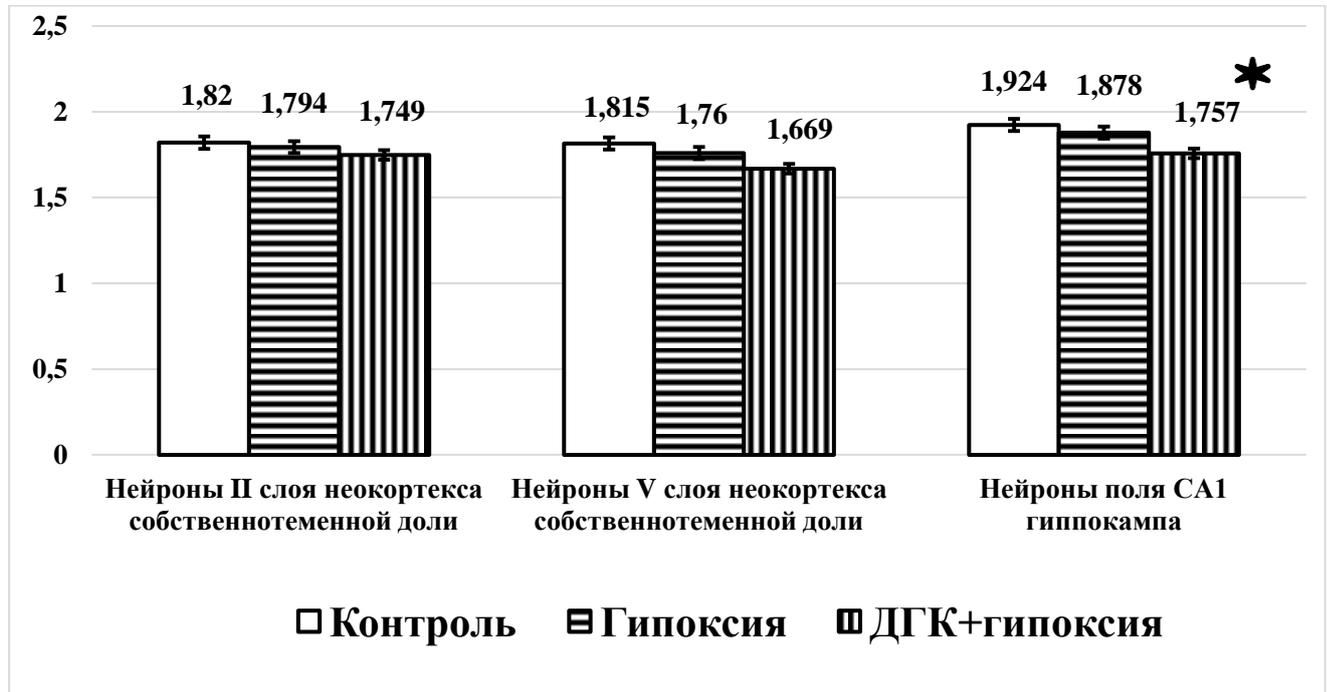
Таблица 13 - Хемилюминесцентные параметры (отн. ед.) сыворотки крови 3-месячных белых крыс исследуемых групп

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
$S_{sp}$	0,196±0,010	0,500±0,039 *p=0,00001	0,310±0,069 *p=0,005 #p=0,005
$S_{1_{ind}}$	0,502±0,039	1,210±0,060 *p=0,00001	0,690±0,011 *p=0,014 #p=0,00001
$H_1$	0,157±0,008	0,480±0,015 *p=0,00001	0,230±0,017 *p=0,007 #p=0,00001
$S_{2_{ind}}$	2,448±0,129	5,840±0,340 *p=0,00001	3,870±0,220 *p=0,002 #p=0,006
$H_2$	1,886±0,120	4,260±0,370 *p=0,0001	2,450±0,170 *p=0,032 #p=0,003

Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра; # - отличие достоверно от показателя группы «Гипоксия» ( $p < 0,05$ )

Введение дигидрохверцетина перед гипоксическим воздействием оказывало дифференцированное влияние на исследованные зоны головного мозга. Предварительное введение дигидрохверцетина нивелировало влияние гипоксии на нуклеолярный аппарат **нейронов II слоя неокортекса собственно теменной доли:** <sup>13</sup> животные группы «ДГК+гипоксия» не имели отличий

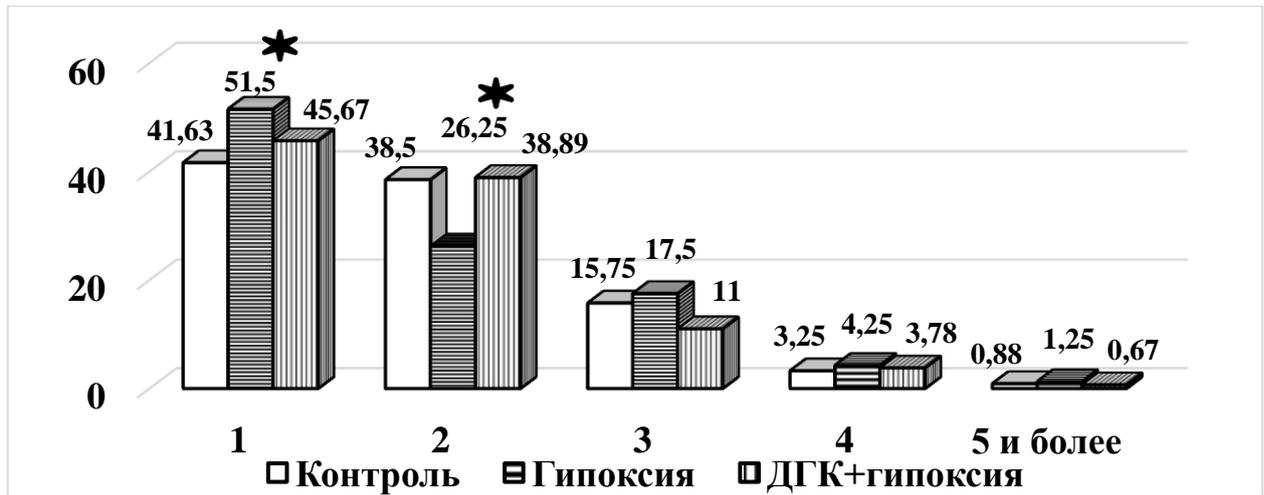
показателей нуклеолярного аппарата от параметров группы «Контроль» (рисунок 12, 13).



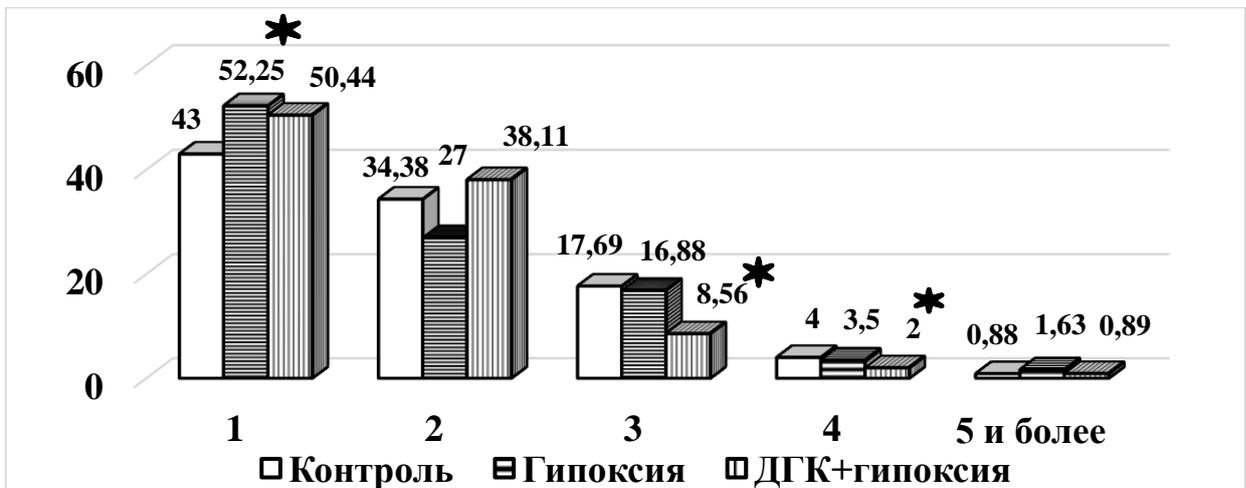
Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра ( $p < 0,05$ )

Рисунок 12 - Количество ядрышек в нейронах головного мозга 3-месячных белых крыс-самцов исследуемых групп

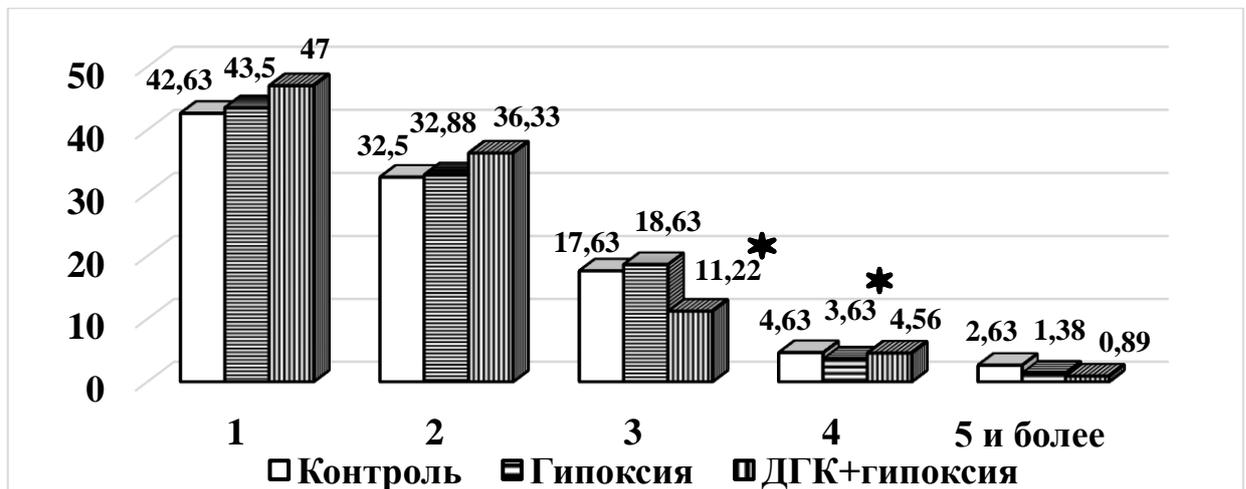
Введение дигидрокверцетина не изменило состояние **нейронов V слоя неокортекса собственно теменной доли** <sup>18</sup> у животных, подвергнутых гипоксическому воздействию: в группе «ДГК+гипоксия» и в группе «Гипоксия» имело место сходное изменение распределения нейронов по субпопуляциям с разным количеством ядрышек. Нейроны поля CA1 гиппокампа животных группы «ДГК+гипоксия» характеризовались достоверным (на 8,67%) уменьшением среднего количества ядрышек (рисунок 10) и перераспределением субпопуляций нейронов с уменьшением количества 3-х и 5-ядрышковых ядер клеток (рисунок 11).



А



Б



В

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

Рисунок 13 - Распределение нейронов 3-месячных белых крыс-самцов исследуемых групп по субпопуляциям с разным количеством ядрышек (А – III слой неокортекса собственно теменной доли; Б – V слой неокортекса собственно теменной доли; В – поле СА1 гиппокампа)

Введение дигидрохверцетина перед воздействием гипоксии достоверно снизило ХМЛ-проявления окислительного стресса в гомогенатах головного мозга 3-месячных животных. У животных группы «ДГК+гипоксия», по сравнению с группой «Гипоксия», показатель  $S_{sp}$  снизился на 53,5%;  $S1_{ind}$  – на 29,6%;  $H1$  – на 31,8%;  $S2_{ind}$  – на 42%;  $H2$  – на 41,4% (таблица 14).

Таблица 14 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов головного мозга 3-месячных крыс-самцов исследуемых групп

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
$S_{sp}$	0,131±0,011	0,359±0,026* p=0,0001	0,167±0,007*, # *p=0,029, #p=0,0001
$S1_{ind}$	0,818±0,069	1,714±0,107* p=0,0001	1,207±0,052*, # *p=0,004; #p=0,002
$H1$	0,784±0,049	1,430±0,069* p=0,0001	0,975±0,040*, # *p=0,020; #p=0,001
$S2_{ind}$	4,198±0,338	12,923±0,859* p=0,0001	7,499±0,643*, # *p=0,004; #p=0,001
$H2$	3,126±0,283	9,918±0,986* p=0,0001	5,815±0,313*, # *p=0,0001; #p=0,006

Примечание - \* - отличия достоверны, по отношению к группе «Контроль»; # - отличия достоверны по отношению к группе «Гипоксия»

Таким образом, в условиях окислительного стресса, индуцированного гипоксическим воздействием, дигидрохверцетин оказывал выраженный антиоксидантный эффект в ткани головного мозга подопытных животных.

При исследовании миокарда подопытных животных было выявлено, что предварительное введение дигидрохверцетина не привело к нормализации индуцированных гипоксией отклонений морфометрических показателей: наблюдалось уменьшение (по сравнению с контролем) размеров ядер кардиомиоцитов на 24,9% в левом желудочке и на 43% в правом желудочке. В отношении размеров ядрышек, эффект значительно отличался в левом и правом желудочках сердца: в левом желудочке сохранялось выраженное снижение

показателя (на 18,7%), в то время как в правом желудочке наблюдалось повышение показателя до уровня контрольного параметра (таблица 15).

Таблица 15 - Показатели нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов 3-месячных крыс-самцов исследуемых групп <sup>12</sup>

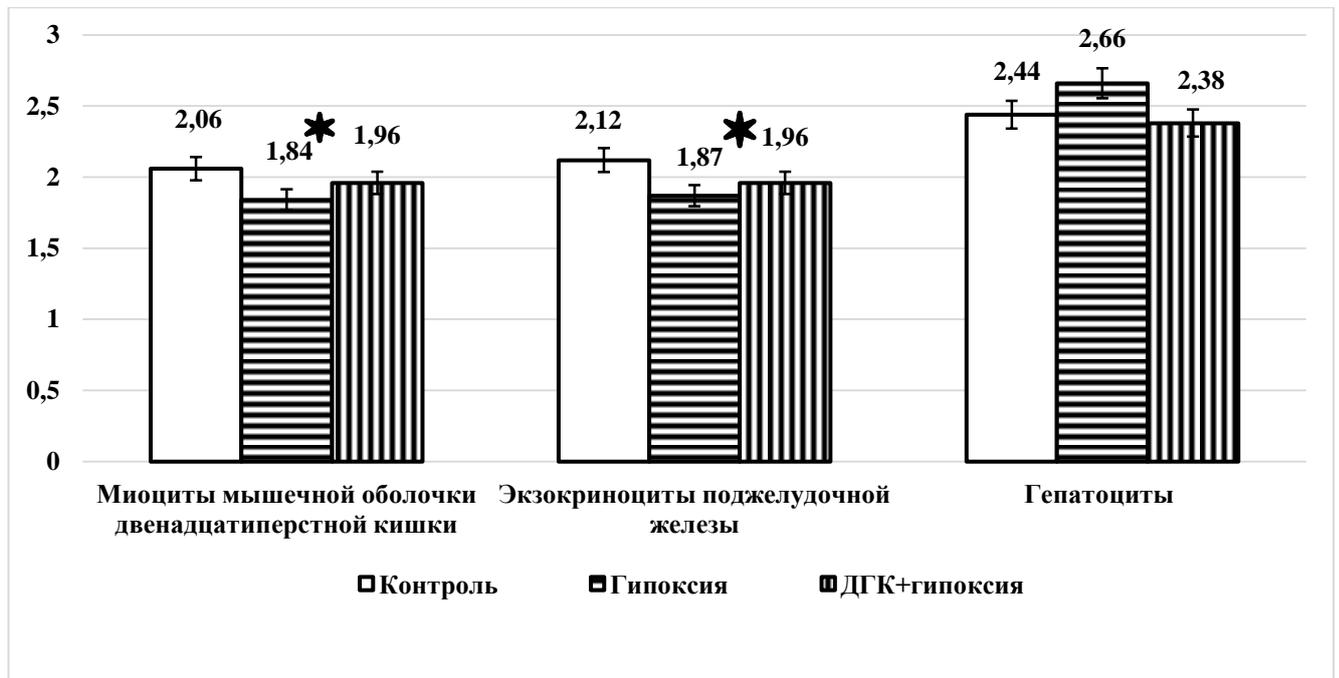
	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
Левый желудочек			
Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> )	48,80±1,16	43,97±1,23* *p=0,0047	36,67±0,92 *, # *p=0,00001 #p=0,03
Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> )	3,69±0,14	3,18±0,12* p=0,0059	3,00±0,11* *p=0,0001
Количество ядрышек	1,97±0,07	2,04±0,14	1,88±0,06
Правый желудочек			
Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> ) <sup>11</sup>	50,45±1,53	39,95±1,21* *p=0,000001	28,74±1,01 *, # *p=0,00001 #p=0,00001
Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> ) <sup>5</sup>	2,75±0,10	2,02±0,10* *p=0,000	2,94±0,12# #p=0,0000
Количество ядрышек <sup>11</sup>	1,93±0,03	2,00±0,05	1,89±0,03

Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра; # - отличия достоверны по отношению к группе «Гипоксия» (p < 0,05) <sup>13</sup>

ХМЛ исследование гомогенатов сердца половозрелых животных группы «ДГК+гипоксия» выявило снижение проявлений окислительного стресса относительно аналогичных значений животных группы «Гипоксия» (таблица 16). Зарегистрирована нормализация 3 из 5 ХМЛ-показателей (S<sub>sp</sub>, S1<sub>ind</sub>, H2). Содержание перекисных радикалов (H1) было достоверно выше, чем в контроле, но достоверно ниже, чем в группе «Гипоксия»; аналогичная ситуация наблюдалась с показателем S2<sub>ind</sub>.

Введение дигидрокверцетина до гипоксического воздействия нивелировало негативное влияние гипоксии на количество ядрышек в гладких миоцитах кишечника и клетках поджелудочной железы (рисунок 14): эти показатели

животных группы «ДГК+гипоксия» достоверно не отличались от группы «Контроль».



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

Рисунок 14 – Количество ядрышек в ядрах клеток пищеварительной системы 3-месячных белых крыс исследуемых групп.

Таблица 16 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов сердца 3-месячных крыс-самцов исследуемых групп

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
$S_{sp}$	$0,10 \pm 0,009$	$0,301 \pm 0,024^*$ * $p=0,00001$	$0,138 \pm 0,012\#$ # $p=0,000382$
$S1_{ind}$	$0,699 \pm 0,053$	$1,177 \pm 0,091^*$ * $p=0,00001$	$0,857 \pm 0,078$
H1	$0,465 \pm 0,038$	$1,314 \pm 0,063^*$ * $p=0,00001$	$0,731 \pm 0,066^*, \#$ * $p=0,03$ # $p=0,001$
$S2_{ind}$	$4,288 \pm 0,277$	$10,222 \pm 0,828^*$ * $p=0,00001$	$6,115 \pm 0,436^*, \#$ * $p=0,01$ # $p=0,001$
H2	$3,248 \pm 0,248$	$8,538 \pm 0,689^*$ * $p=0,00001$	$4,467 \pm 0,488\#$ # $p=0,001955$

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

В ядрах гепатоцитов мы не зарегистрировали достоверных изменений количества ядрышек как в группе «Гипоксия», так и в группе «ДГК+гипоксия» (рисунок 14). Введение дигидрокверцетина уменьшало ХМЛ-показатели гомогенатов печени 3-месячных животных, подвергнутых гипоксии. У животных группы «ДГК+гипоксия», по сравнению с группой «Гипоксия», показатель  $S_{sp}$  снизился на 38,5%;  $S1_{ind}$  – на 35,86%;  $H1$  – на 33,6%;  $H2$  – на 26,9% (таблица 17).

Таблица 17 – Показатели хемилюминесценции гомогенатов печени 3-месячных крыс-самцов исследуемых групп

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
$S_{sp}$	0,089±0,0063	0,322±0,028* *p=0,00001	0,198±0,017 *, # *p=0,00001 #p=0,0015
$S1_{ind}$	0,611±0,039	1,489±0,095* *p=0,00001	0,955±0,067 *, # *p=0,0006 #p=0,0003
$H1$	0,395±0,024	1,246±0,101* *p=0,00001	0,827±0,057 *, # *p=0,00001 *p=0,002
$S2_{ind}$	4,008±0,29	12,63±0,45* *p=0,000001	9,096±1,15 * *p=0,001
$H2$	3,102±0,27	10,799±0,82* *p=0,00001	7,897±0,33 *, # *p=0,00001 #p=0,004

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

Анализ митотической активности переднего эпителия роговицы животных группы «ДГК + гипоксия» 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. Существенное повышение профазно-метафазного коэффициента может свидетельствовать о замедлении скорости митоза. Также

наблюдалось 4-кратное повышение количества патологических митозов (таблица 18).

Таблица 18 - Показатели митотической активности переднего эпителия роговицы 3-месячных белых крыс исследуемых групп

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Гипоксия»	Группа животных «ДГК+гипоксия»
Митотический индекс, промилле	4,57±0,30	4,33±0,54	5,46±0,40
Профазы (%)	56,56±2,80	50,38±2,03	63,35±2,50# #p=0,017
Метафазы (%)	22,97±3,04	25,68±2,34	14,25±0,77 *, # *p=0,04 #p=0,011
Анафазы (%)	14,21±1,91	14,97±2,04	11,01±1,20
Телофазы (%)	5,88±0,88	8,41±1,34	9,86±0,89* *p=0,03
Патологический митозы (%)	0,380±0,158	0,554±0,258	1,53±0,20* # *p=0,015 #p=0,005
Профазно-метафазный коэффициент	2,87±0,466	2,05±0,22	4,57±0,40*, # *p=0,04 #p=0,0098

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

Таким образом, предварительное введение дигидрокверцетина 3-месячным крысам-самцам уменьшило выраженность окислительного стресса на органном и системном уровнях. У животных группы «ДГК+гипоксия» массы тимуса и сердца не отличались от контрольных значений; корректировались отклонения в нуклеолярном аппарате миоцитов кишечника и экзокриноцитов поджелудочной железы. Вместе с тем, в некоторых клеточных популяциях, введение дигидрокверцетина перед гипоксией снижало активность нуклеолярного аппарата клеток. Подобные изменения в группе «ДГК+гипоксия» мы регистрировали в нейронах головного мозга, кардиомиоцитах, переднем эпителии роговицы. Следовательно, влияние

дигидрохверцетина на постгипоксические изменения пролиферативных и анаболических процессов носит тканеспецифический характер.

### 3.2.2. Влияние дигидрохверцетина на пролиферативные и анаболические процессы в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

На этом этапе исследования, у 7-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, оценивали состояние тканей после введения дигидрохверцетина с 2 по 6 сутки жизни.

При анализе гравиметрических показателей исследуемых групп, было выявлено, что введение дигидрохверцетина в периоде новорожденности не корректирует индуцированные антенатальной гипоксией изменения массы тела и массы печени исследуемых животных (таблица 19). Масса тела 7-суточных крыс группы «Антенатальная гипоксия+ДГК» оставалась на 23,1% ниже контрольного показателя, масса печени – на 19,8% ниже контроля. При этом масса сердца у животных группы «Антенатальная гипоксия+ДГК» не отличалась от параметров группы «Контроль» (таблица 19).

Таблица 19 - Гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс исследуемых групп

Показатель	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Антенатальная гипоксия»	Группа животных «Антенатальная гипоксия+ДГК»
Масса тела (г)	14,40±0,36	10,83±0,41* *p=0,01	11,08±0,45* *p=0,03
Масса печени (мг)	420,56±20,76	339,78±18,00* *p=0,002	337,14±14,80* *p=0,001
Масса сердца (мг)	95,20±6,43	70,86±5,50* *p=0,015	78,64±6,29

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

Воздействие дигидрокверцетина в неонатальном периоде нивелировало вызванные антенатальной гипоксией негативные изменения ДНК-синтетической активности гепатоцитов, эпителиоцитов кожи и нейронов неокортекса. Индекс меченных ядер этих клеточных популяций нормализовался по отношению к контрольному уровню (таблица 20).

Таблица 20 - Показатели доли клеточных популяций, находящейся в S-фазе клеточного цикла (ИМЯ, %), у 7-суточных белых крыс исследуемых групп

Орган	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Антенатальная гипоксия»	Группа животных «Антенатальная гипоксия+ДГК»
Гепатоциты	2,37±0,44	1,34±0,26* *p=0,04	2,98±0,28# #p=0,00001
Эпителиоциты кожи	10,79±1,38	7,58±0,68* *p=0,03	9,72±1,73
Фибробласты дермы	5,59±0,62	4,53±0,29	5,29±0,5
Нейроны собственно-теменной доли коры больших полушарий	1,096±0,233	0,571±0,049* *p=0,003	1,660±0,140 #p=0,04
Нейроны поля СА1 гиппокампа	0,728±0,155	0,337±0,61* *p=0,016	2,020±0,150*, # *p=0,01 #p=0,042
Кардиомиоциты левого предсердия	5,76±0,67	3,87±0,29* *p=0,03	4,65±0,17
Кардиомиоциты правого предсердия	5,49±0,67	3,80±0,29* *p=0,04	4,58±0,33
Кардиомиоциты левого желудочка	8,33±0,67	5,60±0,21* *p=0,001	7,60±0,28# #p=0,00001
Кардиомиоциты правого желудочка	6,56±0,64	4,33±0,17	6,10±0,21# #p=0,00001

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

В нейронах поля СА1 гиппокампа животных, получавших ДГК с 2 по 6 сутки жизни, мы регистрировали не только нивелирование постгипоксического угнетения ДНК-синтетических процессов, но и достоверное увеличение доли

нейронов, находящихся в S-фазе клеточного цикла: возрастание показателя индекса меченных ядер относительно группы «Контроль» в 2,7 раз (таблица 20).

Пятикратное введение дигидрокверцетина в дозировке 50 мг/кг в неонатальном периоде, нивелировало последствия тяжелой гипоксии в миокарде, восстановив ДНК-синтетическую активность кардиомиоцитов до уровня контрольной группы. Об этом свидетельствует нормализация в группе «Аntenатальная гипоксия+ДГК» доли ДНК-синтезирующих кардиомиоцитов (таблица 20).

Введение дигидрокверцетина с 2 по 6 сутки жизни животным, перенесшим антенатальную гипоксию, <sup>12</sup> снизило спровоцированное гипоксией уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов, энамелобластов, нейронов неокортекса 7-суточных животных (таблица 21). Следовательно, можно говорить о нормализации анаболической активности клеток этих клеточных популяций под влиянием растительного биофлавоноида.

Таблица 21 - Количество ядрышек в ядрах клеток различных клеточных популяций <sup>21</sup> 7-суточных белых крыс исследуемых групп

Орган	Группа животных «Контроль»	Группа животных «Аntenатальная гипоксия»	Группа животных «Аntenатальная гипоксия+ДГК»
Гепатоциты	2,727±0,044	2,56±0,04* *p=0,01	2,92±0,09# #p=0,003
Хондроциты	2,503±0,070	2,459±0,062	2,538±0,064
Энамелобласты	4,193±0,157	3,519±0,171* *p=0,03	3,785±0,138
Одонтобласты	3,067±0,140	3,069±0,111	3,104±0,129
Эпителиоциты слюнных желез	2,573±0,103	2,496±0,054	2,743±0,144
Нейроны II слоя неокортекса	1,98±0,09	1,60±0,02* *p=0,02	1,80±0,05# #p=0,008
Нейроны V слоя неокортекса	1,46±0,06	1,35±0,05	1,32±0,02
Нейроны поля CA1 гиппокампа	1,92±0,08	1,81±0,06	1,82±0,05
Кардиомиоциты левого желудочка	2,19±0,05	2,24±0,07	2,97±0,07*,# *p=0,001

			#p=0,0000
Кардиомиоциты правого желудочка	2,10±0,05	2,25±0,05	2,84±0,06*,# *p=0,00001 #p=0,0000

Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра; # - отличия достоверны по отношению к группе «Аntenатальная гипоксия» (p <0,05)

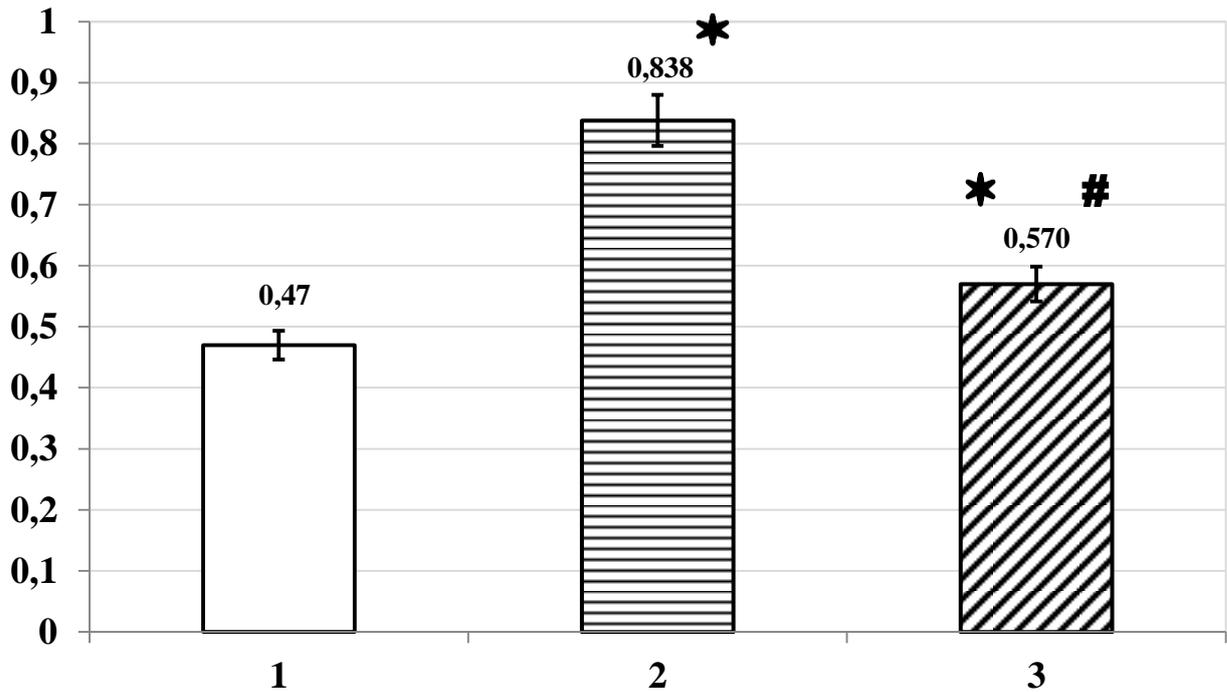
В ядрах кардиомиоцитах желудочков 7-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+ДГК»<sup>17</sup> мы выявили достоверное увеличение количества ядрышек<sup>34</sup> (на 32,59% и на 26,22% в левом и правом желудочке, соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о позитивном влиянии введения дигидрохверцетина на организм новорожденных животных, перенесших антенатальную гипоксию.

### 3.2.3. Влияние дигидрохверцетина на первичную культуру пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса<sup>9</sup>

Введение в культуру пульмональных фибробластов<sup>25</sup> дигидрохверцетина (50 мг/л) перед воздействием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в дозе 60 мкМ существенно уменьшало генерацию супероксид-анион радикала. Интенсивность люцигенин-зависимой ХМЛ в образцах серии «ДГК+перекись водорода» оставалась достоверно выше группы «Контроль» на 21,3%, но оставалась достоверно ниже аналогичного параметра группы «перекись водорода»<sup>14</sup> на 32% (рисунок 15).

Морфометрические показатели первичной культуры пульмональных фибробластов после предварительного воздействия дигидрохверцетином и последующего введения перекиси водорода демонстрируют снижение проявлений окислительного стресса: показатель площади ядер фибробластов и суммарной площади ядрышек клеток серии «ДГК+перекись водорода»<sup>9</sup> был достоверно ниже контрольных параметров,<sup>9 2</sup> но достоверно выше аналогичных показателей серии «перекись водорода»<sup>4</sup> (Таблица 22).<sup>9</sup>



Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к серии «контроль»; # -  $p < 0,05$  по отношению к серии «перекись водорода»

Рисунок 15 - Интенсивность люцигенин-зависимой ХМЛ в суспензированной культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс: 1 – контроль; 2 – воздействие перекиси водорода; 3 – ДГК + перекись водорода

Цитопротективный эффект дигидрохверцетина был выражен в отношении процессов синтеза ДНК в культуре фибробластов. Предварительное воздействие дигидрохверцетина восстанавливало индекс меченных ядер культуры до  $6,56 \pm 1,50$  %, в отличие от практически полной «блокады» ДНК-синтетической активности в группе пульмональных фибробластов, подвергнутых воздействию  $H_2O_2$ .

Исследования показали, что растительный биофлавоноид дигидрохверцетин обладает собственным прямым цитопротективным эффектом, который реализуется в условиях окислительного стресса.

Таблица 22 - Параметры нуклео-нуклеолярного аппарата в первичной культуре пульмональных фибробластов исследуемых экспериментальных серий

Исследуемая серия	Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> )	Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> )	Количество ядрышек
Серия «Контроль»	218,60±4,39	17,03±0,39	3,95±0,07
Серия «Перекись водорода»	80,83±3,46*	8,24±0,46*	3,11±0,10*
Серия «ДГК + перекись водорода»	126,07±5,91*, #	12,99±0,47*, #	3,35±0,10*

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к серии «контроль»; # -  $p < 0,05$  по отношению к серии «перекись водорода»

### 3.3. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции белых крыс

#### 3.3.1. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции половозрелых белых крыс

Пятикратное внутрибрюшинное введение дигидрокверцетина (ДГК) в дозе 50 мг/кг 3-месячным белым крысам-самцам Wistar не привело к изменению гравиметрических показателей животных (таблица 23).

Таблица 23 - Гравиметрические показатели 3-месячных белых крыс-самцов, подвергнутых введению дигидрокверцетина

Орган	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
Масса тела (г)	236,25±25,6	241,88±20,34
Масса мозга (г)	1,257±0,19	1,274±0,08
Масса печени (г)	12,36±1,37	11,35±1,08
Масса сердца (г)	0,894±0,097	0,919±0,084
Масса тимуса (г)	0,501±0,094	0,484±0,094

ХМЛ анализ сыворотки крови белых крыс показал выраженный антиоксидантный эффект после 5-кратного введения дигидрохверцетина: все исследованные параметры ХМЛ были достоверно ниже контрольных показателей:  $S_{sp}$  снизился на 37,76%,  $S1_{ind}$  - на 36,85%,  $H1$  - на 17,83%;  $S2_{ind}$  - на 17%,  $H2$  - на 33,3% (таблица 24).

Таблица 24 - Хемилюминесцентные параметры (отн. ед.) сыворотки крови 3-месячных белых крыс-самцов, подвергнутых воздействию дигидрохверцетина

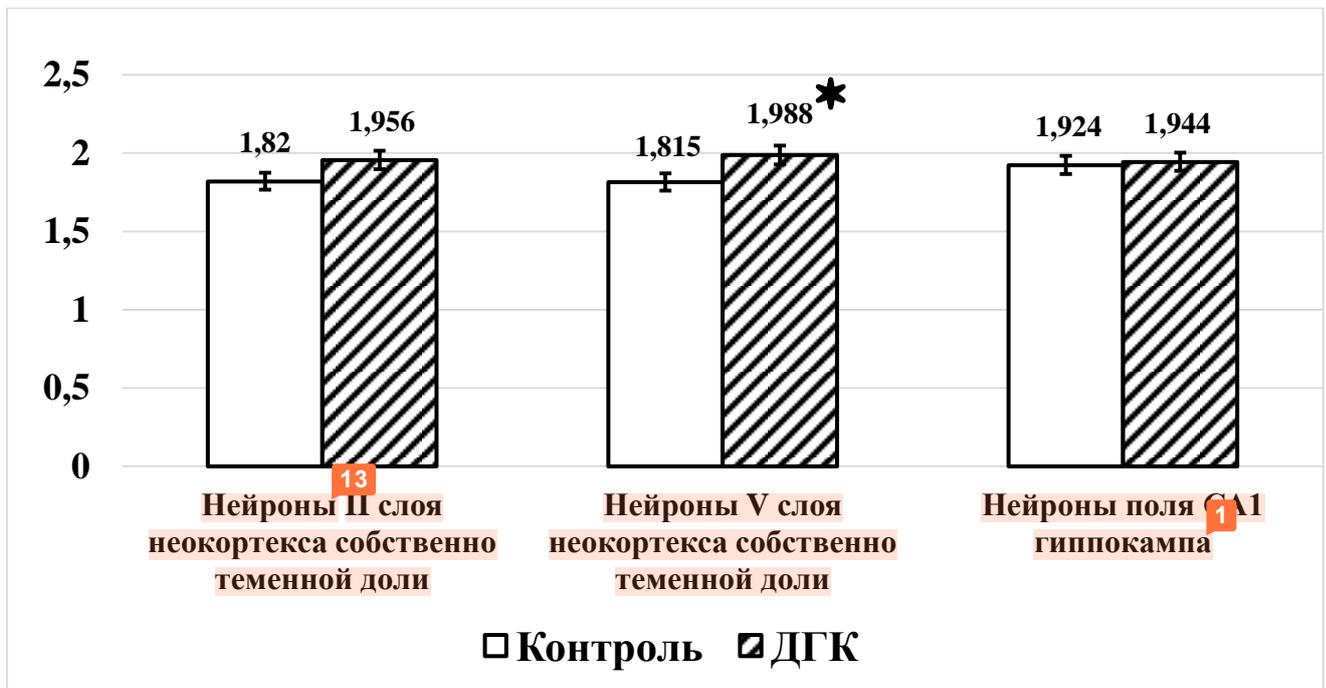
	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
$S_{sp}$	0,196±0,010	0,122±0,010* p=0,0015
$S1_{ind}$	0,502±0,039	0,317±0,030* p=0,0088
$H1$	0,157±0,008	0,129±0,005* p=0,031
$S2_{ind}$	2,448±0,129	2,030±0,131
$H2$	1,886±0,120	1,258±0,084* p=0,007

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

Таким образом, было подтверждено выраженное антиоксидантное влияние дигидрохверцетина в избранной дозе на организм подопытных животных.

При анализе состояния нейронов у животных, подвергнутых воздействию дигидрохверцетином, было выявлено стимулирующее влияние антиоксиданта на нуклеолярный аппарат нейронов головного мозга (рисунок 16).

Было зарегистрировано достоверное увеличение среднего показателя количества ядрышек в ядрах нейронов V слоя неокортекса собственно теменной доли на 9,5%. Во II слое неокортекса собственно теменной доли было выявлено достоверное возрастание доли ядер с 4 ядрышками (рисунок 17).

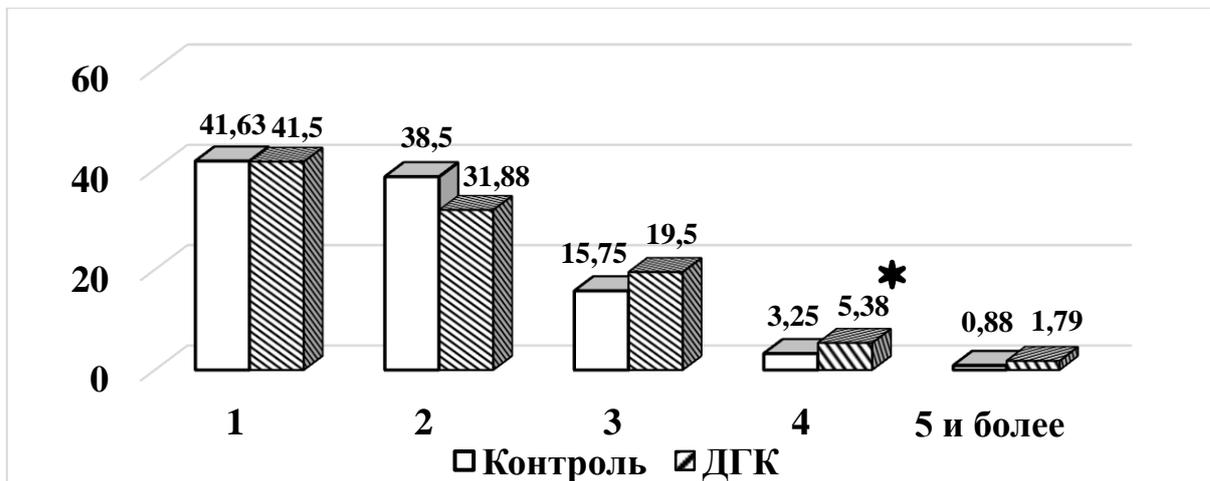


Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра ( $p < 0,05$ )

Рисунок 16 - Количество ядрышек в нейронах головного мозга 3-месячных белых крыс-самцов, подвергнутых воздействию дигидрокверцетина

Стимулирующее влияние дигидрокверцетина на анаболическую активность нейронов у 3-месячных белых крыс сопровождалось антиоксидантным эффектом на тканевом уровне. Результаты ХМЛ-исследования гомогенатов головного мозга, после 5-кратного введения дигидрокверцетина, показали достоверное снижение, относительно контрольной группы, всех исследуемых показателей:  $S_{sp}$  – на 32,06%,  $S_{ind}$  – на 23,45%,  $H1$  – на 45,54%,  $S_{2ind}$  – на 25,42%,  $H2$  – на 29,17% (таблица 25).

Иммуноферментное исследование сыворотки крови выявило достоверное возрастание уровня нейротрофического фактора – фактора роста нервов – 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;  $*p = 0,01$ ).



А



Б



В

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

Рисунок 17 - Распределение нейронов 3-месячных белых крыс-самцов по субпопуляциям с разным количеством ядрышек (А – II слой неокортекса собственно теменной доли; Б – V слой неокортекса собственно теменной доли; В – поле CA1 гиппокампа)

Таблица 25 - Хемилюминесцентные параметры (отн. ед.) гомогенатов <sup>18</sup> головного мозга 3-месячных белых крыс-самцов, подвергнутых воздействию дигидрокверцетина

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
$S_{sp}$	0,131±0,011	0,089±0,008* p= 0,019
$S1_{ind}$	0,818±0,070	0,623±0,035* p= 0,016
H1	0,784±0,049	0,427±0,043* p= 0,001
$S2_{ind}$	4,198±0,338	3,131±0,299* p= 0,034
H2	3,126±0,283	2,214±0,207* p= 0,028

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

В миокарде 3-месячных белых крыс, подвергнутых воздействию дигидрокверцетином, мы не выявили достоверных отличий среднего количества ядрышек в ядрах кардиомиоцитов как левого, так и правого желудочков от аналогичных контрольных параметров (таблица 26). Однако, проведенные морфометрические исследования показали, что воздействия биофлавоноида <sup>12</sup> достоверно снижает показатели нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов. 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% (таблица 26).

Зарегистрированные изменения могут свидетельствовать в пользу снижения анаболической активности кардиомиоцитов белых крыс, подвергнутых воздействию дигидрокверцетина. Эффект сопровождался выраженным уменьшением генерации активных форм кислорода и повышением антиоксидантной активности на тканевом уровне. В гомогенатах сердца животных подопытной группы было выявлено уменьшение показателей  $S_{sp}$  – на 29%;  $S1_{ind}$  – на 24%; H1 – на 25,5%;  $S2_{ind}$  – на 21,2%; H2 – на <sup>15</sup> 38,7% (таблица 27).

Таблица 26 - Показатели нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов 3-месячных белых крыс, подвергнутых воздействию дигидрохверцетина

Показатель	Кардиомиоциты левого желудочка		Кардиомиоциты правого желудочка	
	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
Площадь ядра (мкм <sup>2</sup> )	48,80±1,16	41,99±1,44* p=0,0003	50,45±1,53	33,67±1,29* p=0,00001
Суммарная площадь ядрышек (мкм <sup>2</sup> )	3,69±0,14	2,54±0,12* p=0,0001	2,75±0,1	2,38±0,094* p=0,007
Количество ядрышек	1,97±0,07	1,91±0,05	1,93±0,03	2,01±0,07

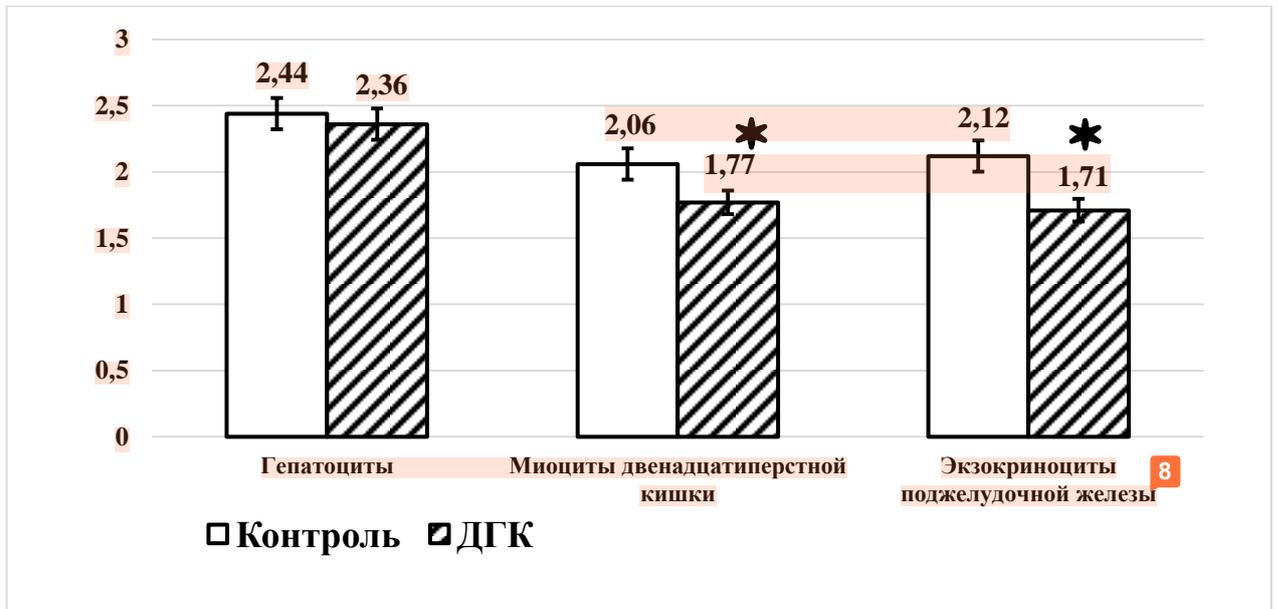
Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра (p < 0,05)

Таблица 27 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов сердца 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых введению дигидрохверцетина

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
S <sub>sp</sub>	0,100±0,009	0,071±0,007* p=0,025
S1 <sub>ind</sub>	0,699±0,053	0,527±0,047* p=0,033
H1	0,465±0,038	0,350±0,024* p=0,023
S2 <sub>ind</sub>	4,288±0,277	3,377±0,250* p=0,024
H2	3,248±0,248	2,017±0,131* p=0,002

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

Пятикратное введение дигидрохверцетина индуцировало существенные изменения в нуклеолярном аппарате клеток органов пищеварения (рисунок 18).

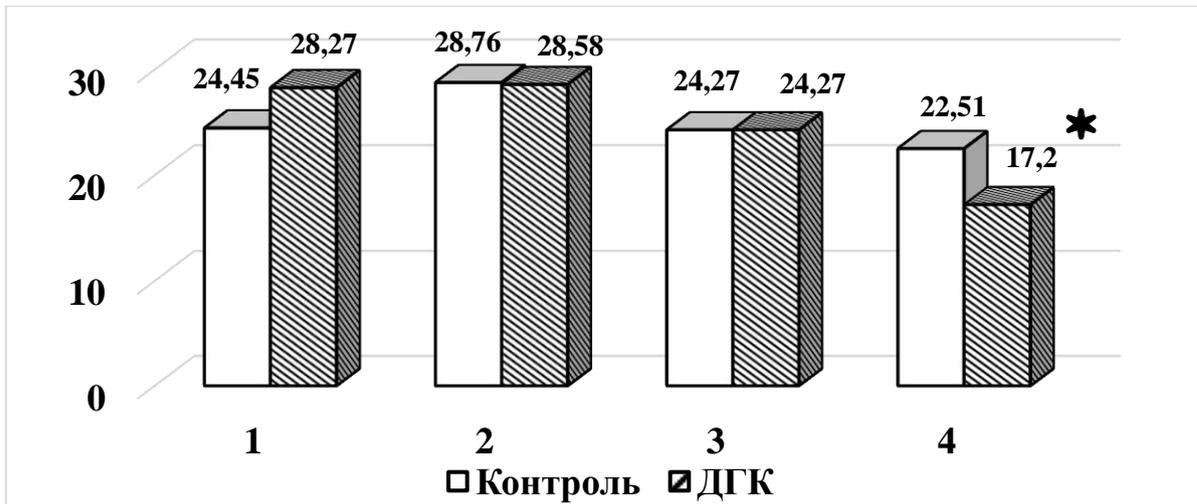


Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра ( $p < 0,05$ )

Рисунок 18 - Количество ядрышек в клетках органов пищеварительной системы 3-месячных белых крыс-самцов, подвергнутых воздействию дигидрокверцетина

После пятикратного введения дигидрокверцетина регистрировалось достоверное уменьшение на 14% среднего количества ядрышек в миоцитах двенадцатиперстной кишки и на 19,3% во внешнесекреторных клетках поджелудочной железы.

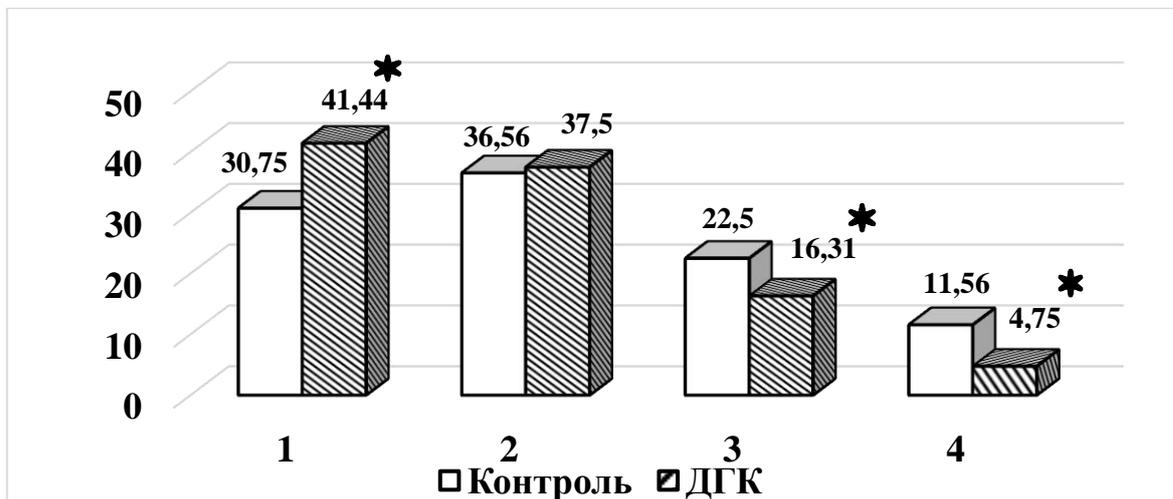
В гепатоцитах уменьшение среднего показателя среднего количества ядрышек у животных группы «ДГК» было статистически недостоверно. Анализ распределения субпопуляций гепатоцитов по количеству ядрышек зарегистрировал достоверное (на 23,6%) уменьшение доли гепатоцитов с 4 ядрышками. Аналогичные изменения субпопуляций ядер - увеличение количества ядер с 1 ядрышком и уменьшение доли ядер с 4 ядрышками - также наблюдались в мышечной оболочке кишечника и поджелудочной железе (рисунок 19). Эти данные можно интерпретировать, как снижение анаболической активности клеток пищеварительной системы под воздействием биофлавоноида.



А



Б



В

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

Рисунок 19 - Распределение исследуемых клеточных популяций пищеварительной системы по субпопуляциям с разным количеством ядрышек (А – гепатоциты; Б – миоциты двенадцатиперстной кишки; В – экзокриноциты поджелудочной железы)

В гомогенатах печени животных, подвергнутых воздействию дигидрохверцетина, зарегистрировано уменьшение хемилюминесцентных показателей, что отражает снижение активности свободнорадикального окисления и повышение антиоксидантной активности ткани:  $S_{sp}$  уменьшался на 34,8%,  $S1_{ind}$  – на 29,5%,  $S2_{ind}$  – на 24,8%,  $H2$  – на 34,9% (таблица 28).

Таблица 28 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов печени 3-месячных крыс-самцов, подвергнутых введению дигидрохверцетина

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
$S_{sp}$	0,089±0,006	0,058±0,004* p=0,0001
$S1_{ind}$	0,611±0,039	0,431±0,029* p=0,0025
$H1$	0,395±0,024	0,385±0,026
$S2_{ind}$	4,009±0,286	3,014±0,18* p=0,011
$H2$	3,103±0,273	2,02±0,19* p=0,005

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

Мы оценили митотическую активность переднего эпителия роговицы подопытных животных после воздействия дигидрохверцетина. Было выявлено, что у половозрелых белых крыс-самцов группы «ДГК» существенно (на 45,7%) снизился митотический индекс эпителия роговицы (таблица 29), наблюдалось изменение соотношения фаз митоза (уменьшение количества метафаз на 38,6%, увеличение количества телофаз на 134,4%) и значительное (в 2,97 раза) возрастание числа патологических митозов.

В целом, введение половозрелым животным дигидрохверцетина индуцирует выраженный антиоксидантный эффект на системном и тканевом уровнях; угнетение анаболических процессов в эпителиальной ткани (эпителий роговицы, экзокриноциты поджелудочной железы, гепатоциты) и мышечной ткани (кардиомиоциты и миоциты кишечника).

Таблица 29 - Показатели митотической активности переднего эпителия роговицы у половозрелых белых крыс-самцов, подвергнутых воздействию дигидрокверцетина

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
Митотический индекс (промилле)	4,57±0,30	2,48±0,37* p=0,004
Профазы (%)	56,56±2,80	58,57±6,02
Метафазы (%)	22,97±3,04	14,11±2,67* p=0,02
Анафазы (%)	14,21±1,91	12,41±2,14
Телофазы (%)	5,88±0,88	13,78±3,44* p=0,01
Патологические митозы, %	0,38±0,16	1,13±0,32* p=0,008

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

Следует отметить, отличие реакции нейронов головного мозга подопытных животных на воздействие дигидрокверцетина. После введения биофлавоноида, при отчетливом антиоксидантном эффекте на тканевом уровне, мы наблюдали увеличение количества ядрышек в нейронах коры собственно теменной доли переднего мозга.

### 3.3.2. Влияние дигидрокверцетина на различные клеточные популяции новорожденных белых крыс

Пятикратное внутрибрюшинное введение дигидрокверцетина (ДГК) с 2 по 6 сутки жизни в дозе 50 мг/кг не приводило к визуально регистрируемым изменениям состояния животных. Масса тела подопытных 7-суточных животных через сутки после заключительного введения исследуемого антиоксиданта не имела достоверных отличий от контроля, получавшего внутрибрюшинное введение эквивалентного количества растворителя (контроль - 14,40±0,36 г; опыт - 14,26±0,47 г).

При анализе ДНК-синтетических процессов установлено, что пятикратное введение дигидрокверцетина не индуцировало достоверных изменений синтеза ДНК в печени, эпидермисе и дерме кожи (таблица 30).

Угнетение ДНК-синтетических процессов после введения дигидрокверцетина мы регистрировали в миокарде новорожденных белых крыс: зарегистрировано достоверное уменьшение индекса меченных ядер кардиомиоцитов левого предсердия на 31,4%, кардиомиоцитов правого предсердия – на 35,1% (таблица 30).

Другую направленность эффектов дигидрокверцетина мы выявили при исследовании нейронов головного мозга 7-суточных животных, подвергнутых воздействию антиоксиданта. Введение дигидрокверцетина способствовало достоверному и значительному (в 2,4 раза) увеличению ДНК-синтетической активности нейронов поля СА1 гиппокампа (таблица 30).

Таблица 30 - Активность ДНК-синтетических процессов в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс, подвергнутых 5-кратному введению дигидрокверцетина

	ИМЯ, %	
	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
Гепатоциты	2,37±0,44	2,34±0,46
Эпителиоциты кожи	10,79±1,38	10,06±0,98
Фибробласты дермы	5,59±0,62	9,42±1,88
Нейроны собственно-теменной доли коры больших полушарий	1,09±0,23	1,38±0,08
Нейроны поля СА1 гиппокампа	0,73±0,16	1,78±0,16*
Кардиомиоциты левого предсердия	5,76±0,67	3,95±0,25* p=0,02
Кардиомиоциты правого предсердия	5,49±0,67	3,56±0,21* p=0,01
Кардиомиоциты левого желудочка	8,33±0,67	7,78±0,035
Кардиомиоциты правого желудочка	6,56±0,64	5,97±0,26

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

Введение дигидрохверцетина с 2 по 6 сутки жизни не приводило к изменению количества ядрышек в ядрах хондроцитов нижней челюсти, энамелобластов и одонтобластов зубных зачатков 7-суточных животных. Также, мы не зарегистрировали изменений количества ядрышек в ядрах нейронов неокортекса и гиппокампа (таблица 31).

В гепатоцитах подопытных животных обнаружено достоверное увеличение количества ядрышек на 8,8% (таблица 31).

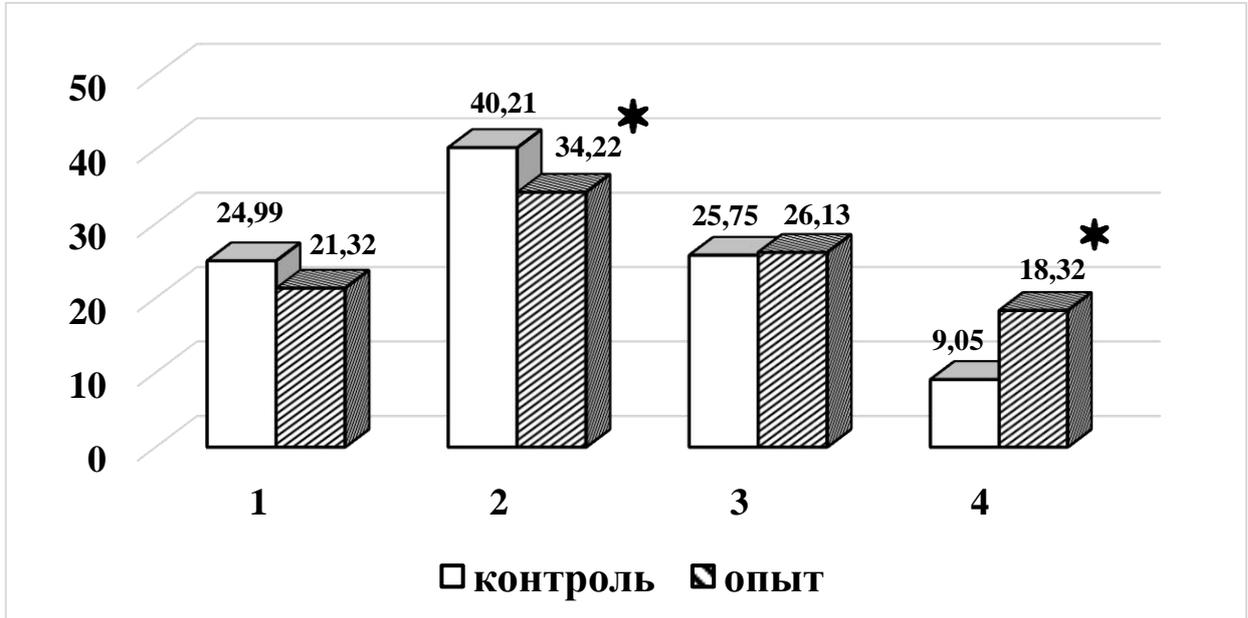
Таблица 31 - Количество ядрышек в ядрах клеток у 7-суточных белых крыс, подвергнутых введению дигидрохверцетина с 2 по 6 сутки жизни

	Группа животных «Контроль»	Группа животных «ДГК»
Гепатоциты	2,73±0,04	2,97±0,07* p=0,01
Хондроциты	2,50±0,07	2,52±0,088
Энамелобласты	4,19±0,16	3,86±0,15
Одонтобласты	3,07±0,14	3,05±0,06
Кардиомиоциты левого желудочка	2,19±0,05	2,41±0,11
Кардиомиоциты правого желудочка	2,10±0,05	2,30±0,07* p=0,02
Нейроны II слоя неокортекса собственнотемной доли	1,98±0,09	1,86±0,03
Нейроны V слоя неокортекса собственнотемной доли	1,46±0,06	1,42±0,04
Нейроны поля СА1 гиппокампа	1,92±0,08	1,97±0,03

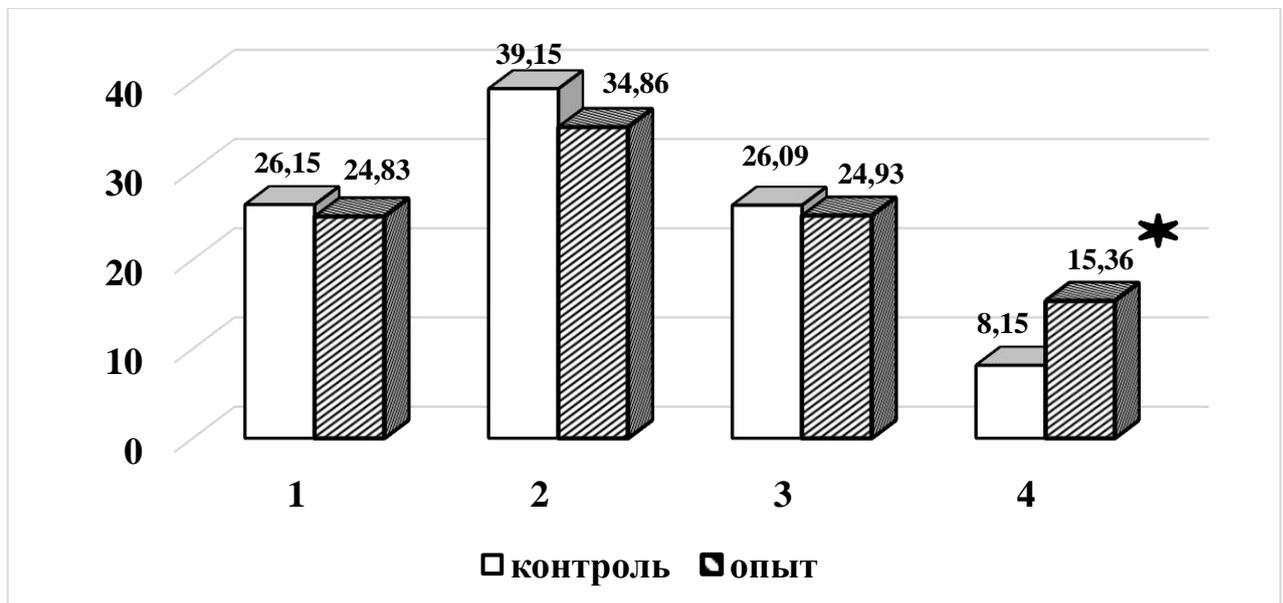
Примечание -\* - достоверное отличие показателя от контрольного параметра (p < 0,05)

Сходные изменения среднего количества ядрышек регистрировались в кардиомиоцитах: в миокарде правого желудочка имело место достоверное увеличение на 9,5%. В кардиомиоцитах левого желудочка возрастание показателя количества ядрышек на 10% было статистически недостоверно. В кардиомиоцитах обоих желудочков нами было определено достоверное изменение распределения ядер по субпопуляциям с увеличением доли «многоядрышковых» кардиомиоцитов (рисунок 20): в миокарде левого желудочка

достоверно уменьшилось количество двуядрышковых и возросло количество четырехядрышковых кардиомиоцитов; в миокарде правого желудочка увеличилось количество четырехядрышковых кардиомиоцитов.



А



Б

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

Рисунок 20 - Распределение кардиомиоцитов 7-суточных белых крыс по субпопуляциям с разным количеством ядрышек (А – левый желудочек; Б – правый желудочек)

В целом, введение дигидрохлоркверцетина новорожденным животным индуцировало разнонаправленные изменения пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций. Наибольшие изменения были зарегистрированы в миокарде животных: при этом ингибирование синтеза ДНК сочеталось с активацией нуклеолярного аппарата. Гепатоциты «реагировали» на воздействие дигидрохлоркверцетина активацией белок-синтетических процессов, что характеризуется стимуляцией нуклеолярного аппарата [137]. В гиппокампе подопытных 7-суточных животных было выявлено значительное увеличение количества ДНК-синтезирующих нейронов, что может свидетельствовать об усиленном нейрогенезе.

Следовательно, можно говорить о некоторых онтогенетических особенностях влияния дигидрохлоркверцетина. У новорожденных белых крыс введение дигидрохлоркверцетина индуцировало повышение активности нуклеолярного аппарата гепатоцитов и кардиомиоцитов, в то время как у половозрелых животных мы регистрировали, преимущественно, угнетающее влияние дигидрохлоркверцетина. Вместе с тем, дигидрохлоркверцетин оказывал сходное стимулирующее влияние на нуклеолярный аппарат нейронов головного мозга новорожденных и половозрелых животных.

### 3.3.3. Влияние дигидрохлоркверцетина на первичную культуру пульмональных фибробластов

Введение дигидрохлоркверцетина в первичную культуру пульмональных фибробластов способствовало угнетению образования супероксид-анион радикала: имело место достоверное снижение интенсивности люцигенен-зависимой ХМЛ на 35,5% (контроль -  $0,470 \pm 0,021$  отн. ед.; ДГК -  $0,303 \pm 0,010^*$  отн. ед.;  $p=0,00015$ ).

Показатель индекса меченных  $^3\text{H}$ -тимидином ядер (характеризующий количество фибробластов в S-фазе клеточного цикла) после воздействия

дигидрокверцетина достоверно не отличался группы «Контроль» (ИМЯ серии «Контроль» –  $30,69 \pm 3,70$  %; ИМЯ серии «ДГК» –  $26,33 \pm 2,90$  %).

При анализе морфометрических показателей нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов, было зарегистрировано достоверное уменьшение размеров ядер на 9,5 % и суммарной площади ядрышек на 7,8 %, с сохранением на уровне контрольной группы среднего количество ядрышек в ядрах (таблица 32).

Таблица 32 - Параметры нуклео-нуклеолярного аппарата клеток в первичной культуре пульмональных фибробластов при воздействии дигидрокверцетина

Исследуемая серия	Площадь ядра ( $\text{мкм}^2$ )	Суммарная площадь ядрышек ( $\text{мкм}^2$ )	Количество ядрышек
Серия «Контроль»	$218,60 \pm 4,39$	$17,03 \pm 0,39$	$3,95 \pm 0,07$
Серия «ДГК»	$197,94 \pm 3,04^*$ $p=0,03$	$15,70 \pm 0,37^*$ $p=0,01$	$3,98 \pm 0,08$

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

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование влияния избыточных концентраций АФК на состояние клеток, а также анализ роли физиологических концентраций АФК в базовых процессах жизнедеятельности клетки [214, 359], не теряет своей актуальности, вследствие многочисленности патологических процессов, сопровождающихся выраженным окислительным стрессом, и широким использованием экзогенных антиоксидантов в медицине и пищевой промышленности.

Мы изучали влияние окислительного стресса, индуцированного гипоксией *in vivo* и воздействием прооксиданта (перекиси водорода) *in vitro*, на показатели состояния клетки (активность пролиферативных процессов и параметры нуклео-нуклеолярного аппарата). Биофлавоноидный эталонный антиоксидант дигидрокверцетин использовали для ингибиторного анализа, позволяющего оценить вклад АФК в течение анаболических процессов в клетке.

У половозрелых белых крыс после пятикратного гипоксического воздействия на системном уровне (в сыворотке крови) и во всех исследованных тканях зарегистрированы изменения показателей хемилюминесценции, свидетельствующие о формировании окислительного стресса. Гипобарическая гипоксия вызывала стрессовую реакцию у половозрелых животных, о чем говорит достоверное уменьшение массы тимуса - неотъемлемая часть стрессовой триады [364]. Увеличение массы сердца у животных этой экспериментальной группы может быть обусловлено гипертрофией миокарда левого желудочка при стрессовом повышении артериального давления [298]. Кроме того, выраженная гипоксия индуцирует спазм сосудов малого круга кровообращения [383] и гипертрофические изменения правого желудочка сердца [384].

В исследованных клеточных популяциях половозрелых белых крыс на фоне окислительного стресса было зарегистрировано снижение показателей нуклеолярного аппарата, что говорит об угнетении белок-синтетической и метаболической активности клеток. В неокортексе собственно теменной доли выявлено увеличение количества нейронов с одним ядрышком. Уменьшение

количества ядрышек было зарегистрировано в ядрах гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки и экзокриноцитов поджелудочной железы.<sup>8</sup> В миокарде подопытных животных мы наблюдали снижение размеров ядер и ядрышек кардиомиоцитов. Интересно, что, при этом, масса сердца была достоверно выше контрольного показателя. Гравиметрический эффект, таким образом, вряд ли мог быть обусловлен гипертрофией кардиомиоцитов, которая требует активации нуклеолярного аппарата и интенсивного синтеза белка. Также маловероятно, учитывая короткий срок воздействия (5 суток), разрастание соединительной ткани, фиброз миокарда. По данным литературы, значительный рост популяции фибробластов и накопление коллагена в миокарде крыс требует не менее 10-14-дневного срока [297]. Возможно, увеличение массы сердца обусловлено отеком тканей при выраженной активации свободнорадикальных процессов на тканевом уровне.

Известно, что стрессовое и гипоксическое влияние снижает пролиферативную активность клеток эпителия [27]. Однако, нами не были зарегистрированы изменения митотического режима переднего эпителия роговицы после гипоксического воздействия. Отсутствие угнетения митотической активности в нашем исследовании, по-видимому, обусловлено повторным характером гипоксического стресса с развивающейся адаптацией [122].

Мы сопоставили состояние клеточных популяций половозрелых белых крыс, подвергнутых гипобарической гипоксии, с реакцией на окислительный стресс тканей новорожденных крыс. Для анализа влияния окислительного стресса на ДНК-синтетические и анаболические процессы в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс была использована модель антенатальной гипоксии. В ранее проведенных нами исследованиях [17, 18] показано, что 7-суточные животные, подвергнутые антенатальной гипоксии, имеют выраженные проявления окислительного стресса на тканевом уровне.<sup>37</sup>

У подопытных 7-суточных животных<sup>80</sup> мы выявили изменения гравиметрических показателей: имело место достоверное снижение массы тела,

массы печени и массы сердца после антенатальной гипоксии. Также было зарегистрировано достоверное угнетение процессов синтеза ДНК в неокортексе и гиппокампе головного мозга, в миокарде всех отделов сердца, в печени и в эпидермисе. Уменьшение количества ядрышек, косвенно отражающее снижение активности белок-синтетических процессов, было зарегистрировано в ядрах нейронов неокортекса, в ядрах гепатоцитов и энамелобластов зубных зачатков. Подобные эффекты в раннем постнатальном периоде онтогенеза, когда закладывается структурный резерв элементов жизненно важных органов, безусловно, должны иметь негативные отдаленные последствия. Уменьшение пролиферации кардиомиоцитов в неонатальном возрасте может обусловить усиление уязвимости сердца к ишемическим-реперфузионным повреждениям в последующие периоды жизни [14]. Снижение анаболических процессов в энамелобластах в период активного формирования эмали способно привести к нарушению базовых белков матрикса эмали (амелобластина [157] и туфтелина [402]) и к значительному дефекту формирования эмали.

Таким образом, реакция клеток организма на окислительный стресс в периоде новорожденности и у взрослых белых крыс была принципиально сходной и выражалась в угнетении анаболических процессов в различных тканях.

Сходный эффект мы наблюдали и при воздействии окислительного стресса на культуру клеток. В первичной культуре пульмональных фибробластов гиперпродукция супероксид-анион радикала, индуцированная воздействием перекиси водорода, сопровождалась снижением размеров ядер и ядрышек фибробластов и практически полным угнетением пролиферативной активности клеток. В клеточной культуре, после воздействия перекиси водорода, выявлялись лишь единичные ДНК-синтезирующие клетки. Davies K.J. [206] предположил, что блокада синтеза ДНК при окислительном стрессе является фактором защиты генетического материала клетки от повреждения АФК [418]. Mayer C. et al. [284] и Wnuk M. et al. [309] указывали, что окислительный стресс тормозит синтез рибосомальной РНК, и, как следствие, изменяет параметры ядрышкового

аппарата.<sup>4</sup> Угнетение анаболической активности клеток в условиях окислительного стресса описано в литературе [58, 242, 270, 351] и отражает защитную реакцию организма, направленную на минимизацию окислительного повреждения ДНК и белков.

Введение биофлавоноидного антиоксиданта дигидрокверцетина, перед воздействием на половозрелых крыс гипобарической гипоксии, нормализовало массу сердца и тимуса подопытных животных, что сопровождалось значительным снижением выраженности окислительного стресса на системном и тканевом уровне. Вместе с тем, постгипоксическая реакция нуклео-нуклеолярного аппарата клеток у подопытных животных этой экспериментальной группы, носила выраженный тканеспецифический характер. Дигидрокверцетин нивелировал индуцированное гипоксией уменьшение количества ядрышек в ядрах миоцитов кишечника и экзокриноцитов поджелудочной железы. Антиоксидантный эффект биофлавоноидов на поджелудочную железу в виде нормализации тканевого уровня малонового диальдегида и глутатиона описан в литературе [410]. В нейронах гиппокампа взрослых крыс, подвергнутых гипоксии после введения дигидрокверцетина, напротив, имело место статистически значимое снижение среднего количества ядрышек. Сходная реакция на воздействие антиоксиданта перед индукцией окислительного стресса наблюдалась и в сердце: в миокарде левого и правого желудочков дигидрокверцетин потенцировал постгипоксическое уменьшение размеров ядер кардиомиоцитов. В кардиомиоцитах левого желудочка, при воздействии дигидрокверцетина, усиливались постгипоксическое снижение площади ядрышек.

При исследовании митотической активности переднего эпителия роговицы<sup>21</sup> было выявлено, что у животных, получавших дигидрокверцетин перед каждым сеансом гипобарической гипоксии, имело место достоверное изменение соотношения фаз митоза, косвенно свидетельствующее о замедлении процессов митоза, и четырехкратное увеличение доли патологических митозов.

Таким образом, у взрослых животных введение антиоксиданта перед воздействием гипоксии улучшало состояние некоторых клеточных популяций, в то время как в других клетках, патологическое постгипоксическое состояние нуклео-нуклеолярного аппарата усугублялось. Причина ухудшения анаболических процессов в некоторых видах клеток при воздействии антиоксиданта перед окислительным стрессом может быть обусловлена значимой ролью АФК в запуске компенсаторно-адаптационных реакций клетки на гипоксию [103, 263].

Введение дигидрокверцетина новорожденным животным, находящимся в состоянии окислительного стресса после перенесенной антенатальной гипоксии, устраняло постгипоксическое снижение массы сердца и полностью нивелировало угнетение ДНК-синтетической активности клеток эпидермиса, печени, головного мозга и сердца. Петрук Н.С. и соавт. [90] отмечали, что у 7-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, на 3-и сутки постнатального развития возникала острая ишемия миокарда в результате комбинирования постгипоксических изменений и воздействия окислительного стресса [90]. Введение дигидрокверцетина на фоне окислительного стресса снижает выраженность этих изменений и нормализует состояние миокарда.

Также в этой экспериментальной группе мы не регистрировали уменьшения количества ядрышек, выявленного после антенатальной гипоксии, в гепатоцитах, энамелобластах зубных зачатков и нейронах. Более того, в группе «Антенатальная гипоксия+ДГК» популяция нейронов гиппокампа характеризовалась большей, чем в контроле, ДНК-синтетической активностью, а в ядрах кардиомиоцитов левого и правого желудочков имело место возрастание количества ядрышек. Таким образом, в отличие от половозрелых животных, реакция новорожденных животных на воздействие антиоксиданта была более однонаправленной: во всех исследованных клеточных популяциях дигидрокверцетин корректировал неблагоприятные последствия антенатального гипоксического воздействия.

Эффект, по-видимому, обусловлен способностью дигидрокверцетина быть сквенджером активированных кислородных метаболитов [392].

Выявленные различия могут быть обусловлены онтогенетическими особенностями: неонатальный период развития млекопитающих характеризуется явлениями окислительного стресса [76, 98, 144], ещё более выраженными у организма, родившегося после состояния хронической антенатальной гипоксии [50]. В условиях генерации столь избыточных концентраций АФК, использование антиоксиданта может существенно улучшить состояние клеточных популяций.

Кроме того, следует отметить отличие экспериментальных подходов, примененных у новорожденных и половозрелых животных. У новорожденных животных, дигидрокверцетин вводился на фоне уже действующего выраженного окислительного стресса, в то время как у 3-месячных белых крыс введение антиоксиданта предворяло гипоксическое воздействие.

В эксперименте *in vitro* дигидрокверцетин уменьшал индуцированное перекисью водорода возрастание **продукции супероксид-анион радикала** **первичной культурой пульмональных фибробластов** <sup>5</sup> и частично нивелировал угнетение пролиферативной активности и **снижение показателей нуклео-** <sup>12</sup> **нуклеолярного аппарата** клеток. Частичное восстановление ДНК-синтетической активности клеток можно связать с уменьшением биофлавоноидом хромосомной нестабильности после воздействия  $H_2O_2$  *in vitro* [187]. Сходный эффект был описан Braganhol E. et al <sup>9</sup> [171] при анализе **влияния кверцетина на культуру** **нейронов гиппокампа.** <sup>9</sup>

Таким образом, влияние дигидрокверцетина на анаболическую активность клеток в условиях окислительного стресса было неоднозначным: имел место широкий спектр типов реакций – от полного или частичного нивелирования негативных изменений до потенцирования негативных влияний окислительного стресса. Более того, ряд клеточных популяций даже в условиях окислительного стресса реагировал на воздействие дигидрокверцетина стимуляцией анаболических процессов (таблица 33).

Причина выявленных отличий может быть в дозозависимом участии АФК в жизнедеятельности клетки. По мнению Лю Б.Н. и соавт. [69], «в ходе эволюции в клетках, в порядке адаптации к постепенно возрастающему в земной атмосфере содержанию кислорода, могла закрепиться последовательность «специализированных» диапазонов дисбалансов»<sup>38</sup> между прооксидантами и антиоксидантами: от окислительного митогенеза до цитолиза через явления ускоренного старения, канцерогенеза и апоптоза.

Таблица 33 - Сводная таблица влияния окислительного стресса и биофлавоноидного антиоксиданта дигидрокверцетина на состояние клеток исследованных клеточных популяций

Клеточные популяции	Новорожденные животные		Половозрелые животные	
	Аntenатальная гипоксия	Аntenатальная гипоксия+ДКГ	Гипоксия	ДКГ+ гипоксия
Нейроны неокортекса	↓	N	↓	↓
Нейроны гиппокампа	↓	↑	N	↓
Кардиомиоциты	↓	N ↑	↓	↓↓
Миоциты кишечника	-	-	↓	N
Гепатоциты	↓	N	N	N
Экзокриноциты поджелудочной железы	-	-	↓	N
Эктодермальный эпителий (роговицы и кожи) <sup>8</sup>	↓	N	N	↓
Фибробласты дермы	N	N	-	-
Энамелобласты	↓	N	-	-
Одонтобласты	N	N	-	-
Хондроциты	N	N	-	-

Пульмональные фибробласты in vitro	↓	тенденция к N	
------------------------------------	---	---------------	--

Примечание: N – отсутствие изменений; ↓ - угнетение анаболических процессов; ↓↓ - выраженное угнетение анаболических процессов; ↑ - активация анаболических процессов

Выраженный окислительный стресс, который имел место в наших экспериментальных моделях, индуцировал нарушение базовых процессов в клетках (пролиферация клеток, функционирование нуклео-нуклеолярного аппарата). Уменьшение выраженности окислительного стресса антиоксидантом способно нормализовать анаболические процессы в клетке при гипоксическом повреждении. Вместе с тем, избыточное удаление АФК из клетки способно ухудшить ее состояние при клеточном стрессе, так как АФК является важнейшим мессенджером запуска компенсаторных реакций клетки [54].

Таким образом, в соответствии с концепцией «диапазона дисбалансов», по реакции клеток в условиях окислительного стресса на действие антиоксиданта, можно предположить «рейтинг» исследованных клеточных популяций по собственной антиоксидантной активности и, соответственно, устойчивости к окислительному стрессу (таблица 34).

Таблица 34 - Анализ типа реакций исследованных клеточных популяций на окислительный стресс и воздействие антиоксиданта

№	Эффект	Клеточная популяция
I.	Отсутствие изменений регистрируемых параметров на фоне окислительного стресса при воздействии антиоксиданта	Гепатоциты взрослых животных; хондроциты нижней челюсти, одонтобласты зубных зачатков, фибробласты дермы кожи новорожденных животных
II.	Ухудшение состояния клеток на фоне окислительного стресса при воздействии антиоксиданта	Нейроны гиппокампа взрослых животных, кардиомиоциты и эпителий роговицы взрослых животных
III.	Нормализация показателей анаболических процессов после окислительного стресса при действии антиоксиданта	Миоциты кишечника, glanduloциты поджелудочной железы взрослых животных; гепатоциты, эпителиоциты кожи, нейроны неокортекса новорожденных животных
IV.	Стимуляция анаболических процессов после окислительного стресса при	Нейроны гиппокампа и кардиомиоциты новорожденных

	действия антиоксиданта	животных
V.	Сохранение (при уменьшении выраженности) негативных эффектов окислительного стресса на анаболические процессы при воздействии антиоксиданта	Первичная культура пульмональных фибробластов

Группа I клеточных популяций, по-видимому, характеризуется низкой чувствительностью анаболических процессов к регуляторному влиянию редокс-сигнализации.

Группа II клеточных популяций, вероятно, характеризуется исходно высокой антиоксидантной активностью. В этих условиях воздействие антиоксиданта приводит к «нефизиологически низкой» концентрации АФК в клетках, что обуславливает снижение ростовых и анаболических процессов в клетке. Например, эпителий роговицы – эта ткань обладает высокой устойчивостью к действию прооксидантов, учитывая постоянное воздействие гипероксии ( $pO_2$  атмосферного воздуха = 159 мм. рт. ст) на эпителиоциты. Гипобарическая гипоксия не индуцировала регистрируемых изменений пролиферативной активности эпителия. Воздействие антиоксиданта «аннулировало» физиологические концентрации АФК, участвующие в запуске компенсаторных реакций, что и привело к искажению хода митоза, накоплению патологических митозов. Блокирование антиоксидантом компенсаторных функций умеренных доз АФК имело место и в миокарде половозрелых животных. Известно, что миокард характеризуется исключительно кислородным типом метаболизма и поэтому обладает высокой собственной антиоксидантной защитой [129]. Подобный тип ответа мы регистрировали только у половозрелых животных. Возможно, в половозрелом возрасте ткани имеют достаточно мощные защитные антиоксидантные механизмы для нивелирования последствий окислительного стресса, и дополнительное воздействие экзогенного антиоксиданта ухудшает анаболическую активность этих клеточных популяций.

В III группе клеточных популяций за счет воздействия антиоксиданта достигается оптимальный баланс АФК и антиоксидантной защиты, за счет чего

происходит нормализация анаболических процессов, нарушенных окислительным стрессом.

IV группа клеточных популяций, по-видимому, характеризуется, на фоне окислительного стресса и воздействия антиоксиданта, умеренным избытком АФК, что соответствует уровню «окислительного митогенеза» и активации анаболической активности клетки.

В V группе клеточных популяций воздействие антиоксиданта частично нивелирует избыток АФК и снижает выраженность негативных изменений состояния клеток, но угнетение нуклео-нуклеолярного аппарата сохраняется. В наших исследованиях к этой группе клеточных популяций относилась культура фибробластов, инкубируемая с перекисью водорода при атмосферном содержании кислорода в газовой среде, что определяет высокий уровень окислительного стресса в клеточной популяции.

Другой важный аспект, способный определить характер реакции анаболических процессов, это динамика изменений редокс-статуса при анализируемых воздействиях. Окислительный стресс, индуцированный гипоксией или прямым действием прооксиданта, приводит к угнетению пролиферативных процессов, нарушению состояния нуклео-нуклеолярного аппарата клеток. Воздействие антиоксиданта дигидрокверцетина на фоне уже имеющегося окислительного стресса дает однозначно позитивный нормализующий эффект (рисунок 21).

Экзогенный антиоксидант способен нивелировать индуцированные окислительным стрессом негативные процессы через уменьшение свободного  $Fe^{2+}$  [224], ингибирование образования АФК, снижению цитозольного уровня цитохрома С [394], а также активации mTORC1 [155], что, в конечном итоге, приводит к поддержанию анаболической активности клетки.

Однако, другие закономерности можно наблюдать, если воздействие антиоксиданта происходит на исходно интактном фоне. Мы проанализировали тканеспецифические и возрастные особенности анаболических процессов при

ингибировании исследуемым антиоксидантом продукции АФК на интактном фоне (без окислительного стресса) (таблица 35).



Рисунок 21 - Концептуальная схема обоснования применения антиоксиданта дигидрокверцетина для коррекции вызванных окислительным стрессом нарушений анаболических процессов

Таблица 35 – Сводная таблица влияния биофлавоноидного антиоксиданта дигидрокверцетина на состояние клеток исследованных клеточных популяций

Клеточные популяции	Новорожденные животные	Половозрелые животные
Нейроны головного мозга	↑	↑
Кардиомиоциты	↓↑	↓
Миоциты кишечника	-	↓
Гепатоциты	↑	N
Экзокриноциты поджелудочной железы	-	↓
Эпителий роговицы и кожи	N	↓
Энамелобласты	N	-
Пульмональные фибробласты in vitro	↓	

Примечание – N - отсутствие изменений; ↓ - угнетение анаболических процессов; ↑ - активация анаболических процессов; ↓↑ - неоднозначные изменения

В миокарде половозрелых белых крыс, после 5-кратного введения дигидрокверцетина, мы наблюдали **снижение показателей нуклео-<sup>12</sup>нуклеолярного аппарата** клеток. Уменьшение количества ядрышек под влиянием антиоксиданта мы также выявили в ядрах миоцитов кишечника и экзокриноцитов поджелудочной железы. При анализе пролиферативной активности эпителиоцитов **переднего эпителия роговицы животных,<sup>21</sup> подвергнутых пятикратному введению** дигидрокверцетина, регистрировалось значительное снижение митотического индекса, изменение соотношения фаз митоза и возрастание количества патологических митозов. У новорожденных животных пятикратное введение дигидрокверцетина с 2 по 6 сутки жизни уменьшало ДНК-синтетическую активность в миокарде, причем угнетение синтеза ДНК сопровождалось возрастанием количества ядрышек в ядрах кардиомиоцитов. Это может быть отражением ускорения дифференцировки кардиомиоцитов 7-суточных белых крыс под влиянием биофлавоноида дигидрокверцетина [213]. Воздействие дигидрокверцетина in vitro снижало показатели **нуклео-нуклеолярного аппарата культивируемых фибробластов.<sup>31</sup>**

37  
Таким образом, можно отметить, что антиоксидант дигидрокверцетин при воздействии на интактном фоне способен угнетать пролиферативную и анаболическую активность некоторых клеточных популяций. Выявленные изменения могут быть обусловлены свойством биофлавоноидных антиоксидантов блокировать активность мембранной тирозинкиназы, которая необходима для реализации эффектов факторов роста [366, 381].<sup>4</sup>

Исключение составляли клетки головного мозга, где антиоксидант, напротив, оказывал стимулирующий эффект. В неокортексе половозрелых белых крыс, подвергнутых пятикратному введению дигидрокверцетина,<sup>21</sup> была выявлена достоверная активация нуклеолярного аппарата ядер нейронов. Интересно, что у этих животных наблюдалось значительное увеличение содержания нейротрофического фактора – фактора роста нервов – в сыворотке крови. Следовательно, дигидрокверцетин способен оказывать нейротрофическое действие на структуры головного мозга. Это можно объяснить липофильностью молекулы дигидрокверцетина [121] и способностью флавоноидов проникать через гематоэнцефалический барьер [127, 290]. Выявленные нами особенности реакции нервной ткани могут быть обусловлены как прямым действием дигидрокверцетина на клетки головного мозга, так и быть опосредованы<sup>2</sup> эффектом вазодилатирующего влияния биофлавоноидов в мозговом кровотоке [304]. Полученный нами эффект биофлавоноидного антиоксиданта соответствует данным литературы. Воздействие изофлавоноидов повышает пролиферативную активность и улучшает «выживание» нейронов гиппокампа [146, 203]. Дигидрокверцетин способен нивелировать чрезмерное образование АФК, предотвращать гибель нейронов и снижать перевозбуждение в нейронной сети [120]. Многие растительные полифенолы (кверцетин, генистеин, ликвиритин, ресвератрол) могут потенцировать действие нейротрофных факторов (NGF, BDNF) на рост аксонов нейронов [290]. В литературе описана способность некоторых растительных полифенолов (скутелларина, алпинетина, лютеолина, гинестеина)

увеличивать продукцию NGF [290, 363]. Гептаметоксифлавоноид повышает продукцию BDNF астроцитами и индуцирует нейрогенез в гиппокампе после ишемии мозга через активацию ERK  $\frac{1}{2}$  и CREB (цАМФ-связанный путь) пути [290]. Показано, что применение растительных полифенолов может помочь в профилактике и лечении нейродегенеративных заболеваний [290]. Растительные полифенолы показали свою эффективность в улучшении состояния пациентов с синдромом Дауна [222, 320].

Профилактическое введение экзогенного антиоксиданта до воздействия повреждающего фактора, индуцирующего окислительный стресс, оказалось не всегда эффективно для нормализации состояния клеток. Более того, в некоторых клеточных популяциях мы зарегистрировали потенцирование негативных эффектов гипоксического воздействия (рисунок 22).

Вероятно, если воздействие повреждающего фактора наступает на фоне «заблокированной» генерации АФК, то затрудняется развертывание компенсаторных процессов, способствующих адаптации клетки. В этом случае, мы, фактически, наблюдаем эффект, обратный явлению ишемического прекондиционирования.

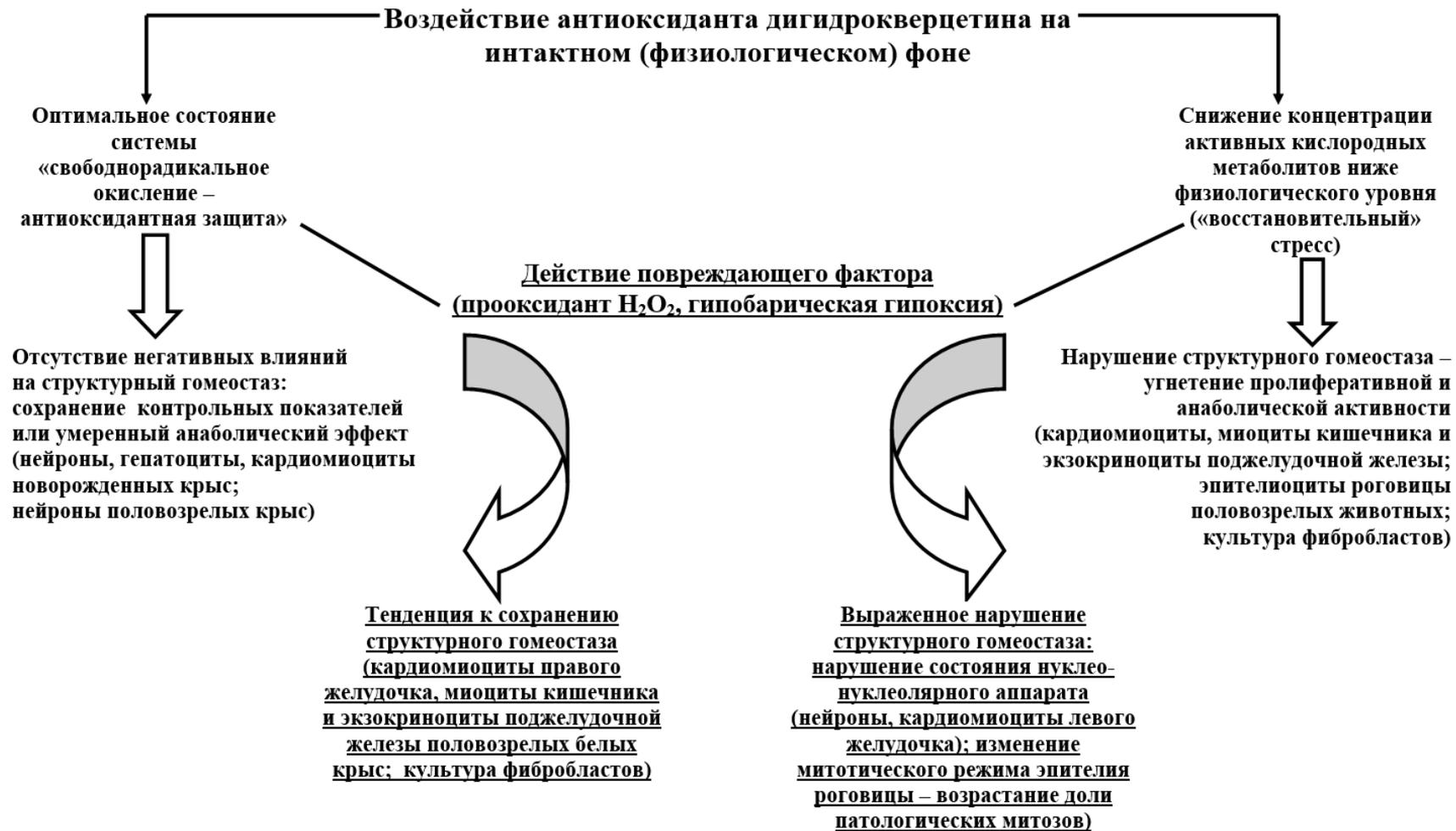


Рисунок 22 - Концептуальная схема обоснования нарушений анаболической активности клеточных популяций при использовании антиоксидантов на интактном фоне

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакция организма на окислительный стресс в периоде новорожденности и у взрослых млекопитающих была принципиально сходной и выражалась в нарушении базовых процессов в клетках (пролиферация клеток, функционирование нуклео-нуклеолярного аппарата). Сходный эффект мы наблюдали и при воздействии окислительного стресса на первичную культуру пульмональных фибробластов.<sup>9</sup> Это свидетельствует о повреждающем влиянии избытка активных форм кислорода на клетки *in vitro* и *in vivo*.

Уменьшение выраженности окислительного стресса антиоксидантом может нормализовать анаболические процессы в клетке при гипоксическом повреждении. Вместе с тем, избыточное удаление АФК из клетки при клеточном стрессе способно ухудшить ее состояние, так как АФК является важнейшим мессенджером запуска компенсаторных реакций клетки.

Таким образом, можно отметить, что<sup>37</sup> уменьшение концентрации АФК ниже физиологических значений, при воздействии антиоксиданта дигидрохверцетина, угнетало пролиферативную и анаболическую активность некоторых клеточных популяций. Исключение составляли клетки головного мозга, где антиоксидант, напротив, оказывал, преимущественно, стимулирующий эффект на нуклеолярный аппарат ядер нейронов, сопровождающийся значительным увеличением содержанием нейротрофического фактора (NGF) в сыворотке крови.

Анализируя, в-целом, результаты проведенного исследования, можно заключить, что ингибирование свободнорадикального окисления введением биофлавоноидного антиоксиданта дигидрохверцетина в условиях окислительного стресса приводит к разнонаправленным изменениям анаболических процессов в клетках организма. Характер эффекта, по-видимому, зависит от функционирования собственной антиоксидантной защиты клетки. Введение антиоксиданта на интактном фоне, преимущественно, уменьшает исследуемые показатели. Применение антиоксиданта для нормализации базовых

физиологических процессов в клетке оправдано при выраженном окислительном стрессе в условиях недостаточности эндогенной антиоксидантной системы.

## 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.<sup>5</sup> 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;<sup>12</sup> происходит нормализация количества ядрышек в ядрах миоцитов кишечника и экзокриноцитов поджелудочной железы.<sup>40</sup>

3. Введением биофлавоноидного антиоксиданта дигидрокверцетина 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. 13

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. 12

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 нуклео-нуклеолярного аппарата клеток. Подавление антиоксидантом базальной генерации супероксид-анион радикала сопровождается уменьшением размера ядер и ядрышек клеток. 31

8. Снижение выраженности окислительного стресса при введении антиоксиданта дегидрохверцетин 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 СОКРАЩЕНИЙ

- AMPK – AMP-activated protein kinase
- ARE – antioxidant respons(iv)e element
- ASK1 – Apoptosis signal-regulating kinase 1
- ATM – serine/threonine kinase
- ATR – Serine/threonine-protein kinase
- BDNF – brain-derived neurotrophic factor
- CaMKK2 (CaMK2) - Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
- Cat – catalase
- Cdk4 – Cyclin-dependent kinase 4
- CREB – cAMP response element-binding protein
- eNOS – Endothelial NOS
- ERK – extracellular-regulated kinase – mitogen-activated protein (MAP) kinase 5
- GPxS – Glutathione peroxidase
- HIF-1 $\alpha$  – Hypoxia-inducible factor 1-alpha
- HMG-CoA-редуктаза – 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
- HSP – heat shock proteins
- ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule 1
- IRP2/IRE – Iron regulatory proteins/ iron responsive elements
- JNK – c-Jun-N-terminal kinase
- Keap1 – Kelch Like ECH Associated Protein 1
- Mac-1 – Macrophage-1 antigen
- MAP-киназа (MAPKs) – mitogen-activated protein kinase
- mPTP (MPT-поры) – mitochondrial permeability transition pore
- mTOR (mTORC) - mechanistic target of rapamycin
- NADPH-оксидаза (NOX) – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
- NF- $\kappa$ B – nuclear factor kappa B
- NGF – nerve growth factor
- Nkrf – NF-kappa-B-repressing factor

NT – 3 - нейротрофин – 3

NT – 4 - нейротрофин – 4

p38 – mitogen-activated protein kinases

p53 – cellular tumor antigen

p66ShC – isoform of Src homology 2 domains containing) transforming protein 1

PI3K – Phosphoinositide 3-kinases

PLC $\gamma$ 1 – Phospholipase C, gamma 1

ROS – Reactive oxygen species

SHP2 – Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2

Sir2 – Sirtuin 2, Silent Information Regulator 2 proteins

Smac – митохондриальный активатор каспазы

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3

TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor

Trx – Thioredoxin

ULK1 – autophagy activating kinase

АКМ – активные кислородные метаболиты

АОС – антиоксидантные системы

АФК – активные формы кислорода

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДГК – дигидрокверцетин

ИМ – интенсивность метки

ИМЯ – индекс меченых ядер

КБП – кора больших полушарий

КМЦ – кардиомиоциты

ЛЖ – левый желудочек сердца

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

МДА (MDA) – малоновый диальдегид

МИ – митотический индекс

ПЖ – правый желудочек сердца

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД (СОD) - супероксиддисмутаза

ФР – фактор роста

ХМЛ – хемилюминесценция

ЭФР – эпидермальный фактор роста