

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Дальневосточный государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Пинаева Ольга Геннадьевна



**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ  
КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ, И  
КОРРЕКЦИЯ ВОЗНИКАЮЩИХ НАРУШЕНИЙ АНАЛОГАМИ  
ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

14.03.03 – патологическая физиология

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

Хабаровск, 2017

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Становление структуры печени в ранние периоды онтогенеза. Влияние антенатальной гипоксии на гепатоциты млекопитающих.....	12
1.2 Роль опиоидных пептидов в регуляции пролиферативных и анаболических процессов в организме млекопитающих. Цитопротективные свойства опиоидных пептидов.....	19
1.3 Гепатопротективные свойства опиоидных пептидов.....	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1 Характеристика экспериментальных животных.....	32
2.2 Организация экспериментов. Моделирование антенатальной гипоксии..	33
2.3 Характеристика объекта исследования.....	35
2.4 Характеристика используемых веществ.....	37
2.5 Приготовление гистологических препаратов .....	38
2.6 Приготовление цитологических препаратов изолированных гепатоцитов .....	39
2.7 Морфометрическое исследование гепатоцитов.....	40
2.8 Исследование ДНК-синтетической активности гепатоцитов методом автордиографии .....	42
2.9 Окраска зон ядрышкового организатора методом AgNOR.....	43
2.10 Анализ свободнорадикального окисления методом хемилюминесценции.....	45
2.11 Исследование биохимических показателей сыворотки крови подопытных животных.....	46
2.12 Иммуноферментное исследование активности аргиназы 1.....	48
2.13 Статистическая обработка данных.....	49
3 СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ .....	50

3.1 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии .....	50
3.1.1 Показатели состояния печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.....	50
3.1.2 Показатели состояния печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.....	55
3.2 Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению аналогов лей-энкефалина в раннем периоде постнатального онтогенеза .....	62
3.2.1 Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению пептида даларгин в раннем периоде постнатального онтогенеза .....	63
3.2.2 Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению неопиатного аналога лей-энкефалина в раннем периоде постнатального онтогенеза .....	67
3.3 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению аналогов лей-энкефалина .....	70
3.3.1 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин....	70
3.3.1.1 Влияние неонатального введения пептида даларгин на состояние печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.....	70
3.3.1.2 Показатели состояния печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин.....	74
3.3.2 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению неопиатного аналога лей-энкефалина.....	80

3.3.2.1 Влияние неонатального введения неопиатного аналога лей-энкефалина на состояние печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.....	80
3.3.2.2 Показатели состояния печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению неопиатного аналога лей-энкефалина.....	84
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	90
ВЫВОДЫ.....	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Кислородная недостаточность является основным повреждающим фактором в системе «мать-плацента-плод» (Мешкова Е.М. и соавт., 2014). Большинство осложнений беременности ассоциировано с кислородным дефицитом у плода (Евсеенко Д.А., Ещенко Ю.В., 2002). Частота гипоксии плода и асфиксии в родах, по данным разных авторов, составляет от 4% (Никольская Л.А., 1999) до 46,6% (Шарапова О.В., 2003). Антенатальная гипоксия (АНГ) и асфиксия при рождении занимают первое место в структуре причин перинатальной смертности (Фролова О.Г. и соавт., 2012; Стародубов В.И. и соавт., 2012). АНГ в анамнезе осложняет течение постнатальной адаптации новорожденного ребенка (Евсеенко Д.А., Ещенко Ю.В., 2002; Wang K.C. et al., 2017; Malhotra A. et al., 2017).

Печень обладает высокой чувствительностью к недостатку кислорода, уступая в этом отношении лишь головному мозгу (Подымова С.Д., 2005). Кислородное голодание плода приводит к повреждению печени (Hannam S. et al., 2003; Надеев А.П. и соавт., 2014). Хроническая АНГ является фактором риска длительно персистирующей гипербилирубинемии (Мехрякова И.А., 2008) и коагулопатии новорожденных (Балдина Н.Ю., Спичак И.И., 2014; Hannam S, 2003).

Последствия постгипоксических нарушений могут иметь место не только в перинатальном периоде, но и в более поздние сроки онтогенеза млекопитающих (Кельмансон И.А., 1999; Маслова М.В. и соавт., 2001; Li G et al., 2003; Kappeler L. et al., 2017; Wang K.C. et al., 2017). Это соответствует концепции «фетального программирования» (Hales C. N., Barker D. J., 1992). У детей, перенесших АНГ, в препубертатном и пубертатном возрасте нередко диагностируется неалкогольный гепатоз (Fu J. F. et al., 2011; Gupta R., 2011; Бокова Т. А., Урсова Н. И. 2011). Дети с перенесенной перинатальной гипоксией подлежат

диспансерному учету как больные с функциональными нарушениями гепатобилиарной системы (Вахитова Л.Ф., 2004; Бережанская С.Б. и соавт., 2013).

Вместе с тем, связь отдаленных структурно-функциональных нарушений печени и окислительного стресса, обусловленного АНГ, изучена недостаточно. Данные о возможных путях коррекции патологии печени, связанной с АНГ, немногочисленны (Wesolowski S.R. et. al., 2017). Сведения о возможности использования биологически активных пептидов в постнатальной коррекции патологии печени после АНГ носят единичный и несистематизированный характер.

В связи с этим, **целью** исследования было изучение структурно-функционального состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, а также возможности коррекции вероятных постгипоксических нарушений аналогами лей-энкефалина.

#### **Задачи исследования:**

1. Изучить ДНК-синтетическую активность, количество ядрышек гепатоцитов и показатели свободнорадикального окисления гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.
2. Изучить цитокариометрические параметры гепатоцитов, показатели свободнорадикального окисления и биохимические маркеры повреждения печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.
3. Исследовать ДНК-синтетическую активность, количество ядрышек гепатоцитов 7-суточных белых крыс и цитокариометрические параметры гепатоцитов 60-суточных белых крыс, подвергнутых неонатальному введению аналогов лей-энкефалина.
4. Изучить влияние неонатального введения аналогов лей-энкефалина на ДНК-синтетическую активность, количество ядрышек гепатоцитов и показатели свободнорадикального окисления гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.
5. Изучить влияние неонатального введения аналогов лей-энкефалина на цитокариометрические параметры гепатоцитов и показатели свободноради-

кального окисления гомогенатов печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

6. Провести сравнительный анализ эффектов аналогов лей-энкефалина: агониста  $\delta$ -/ $\mu$ -опиатных рецепторов (пептида даларгин) и неопиатного аналога лей-энкефалина (пептида НАЛЭ).

### **Научная новизна**

Впервые изучены отдаленные эффекты гипоксического воздействия в антенатальном периоде на цитокариометрические показатели гепатоцитов и свободнорадикальные процессы в печени половозрелых белых крыс. Выявлено, что у половозрелых животных, перенесших антенатальную гипоксию, имеет место снижение массы печени, уменьшение размеров гепатоцитов и их ядер, снижение количества и размеров ядрышек. Впервые показано, что структурные нарушения в печени половозрелых животных, перенесших антенатальную гипоксию, сопровождаются окислительным стрессом на органном и организменном уровнях.

Впервые изучены эффекты неонатального введения неселективного агониста  $\delta$ -/ $\mu$ -опиатных рецепторов даларгина и неопиатного аналога лей-энкефалина пептида НАЛЭ на ДНК-синтетическую активность и количество ядрышек гепатоцитов 7-суточных белых крыс, а также на цитокариометрические параметры гепатоцитов половозрелых белых крыс.

Впервые проведен анализ гепатопротективного эффекта неонатального введения неселективного агониста  $\delta$ -/ $\mu$ -опиатных рецепторов даларгина и неопиатного аналога лей-энкефалина пептида НАЛЭ у 7- и 60-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию. Показано, что неонатальное введение аналогов лей-энкефалина оказывает корректирующее влияние на пролиферативную и анаболическую активность гепатоцитов, а также свободнорадикальное окисление в ткани печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Исследование проводилось в рамках государственного задания № 056-00110-16-00 ПР «Роль регуляторных пептидов группы опиоидов в компенсации нарушений структурного гомеостаза организма, индуцированных антенатальным оксидативным стрессом».

Полученные экспериментальные данные дополняют современные представления о патогенезе ранних и отдаленных нарушений в печени млекопитающих, перенесших антенатальную гипоксию; а также о влиянии биологически активных пептидов на морфофункциональное состояние печени в физиологических условиях и при патологии.

Показана возможность коррекции нарушений ядрышкового аппарата гепатоцитов и процессов свободнорадикального окисления после антенатальной гипоксии с помощью неонатального введения аналогов лей-энкефалина, что может быть использовано при определении показаний к применению лекарственных препаратов, созданных на основе исследованных пептидов.

Дано экспериментальное обоснование перспективности применения фармакологических препаратов на основе неопиатного аналога лей-энкефалина при патологических состояниях новорожденных, индуцированных антенатальной гипоксией.

Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для чтения лекций и проведения практических занятий по дисциплинам «Патологическая физиология», «Общая патология», «Фармакология» в ВУЗах медицинского и биологического направления.

## **Методология и методы исследования**

Состояние антенатальной гипоксии моделировали с помощью гипобарической камеры, в которую ежедневно на 4 часа помещали беременных самок белых крыс с 14 до 19 суток гестации и создавали давление 224 мм рт.ст. Аналоги лей-энкефалина (пептиды даларгин и неопиатный аналог лей-энкефалина) вводили потомству с 2 по 6 сутки жизни внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг.

Для оценки состояния печени 7- и 60-суточных подопытных животных использовали гравиметрический, гистохимический, автордиографический, морфометрический, биохимический, иммуноферментный и хемилюминесцентный методы исследования. ДНК-синтетическую активность гепатоцитов 7-суточных животных изучали методом автордиографии с  $^3\text{H}$ -тимидином. Количество ядрышек гепатоцитов исследовали на гистологических препаратах печени 7-суточных животных и цитологических препаратах изолированных гепатоцитов 60-суточных животных, окрашенных по методу AgNOR. С помощью компьютерного анализатора изображений МЕКОС-Ц измеряли площадь гепатоцитов, их ядер и суммарную площадь ядрышек.

Свободнорадикальные процессы в гомогенатах печени и сыворотке крови изучали методом хемилюминесценции. Функциональное состояние печени оценивали с помощью биохимического исследования активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы,  $\gamma$ -глутамилтрансферазы, лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и концентрации общего билирубина в сыворотке крови подопытных животных. Также в сыворотке крови осуществляли иммуноферментное исследование активности аргиназы-I.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Statistica 10.0.

### **Степень достоверности**

Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом выполненных исследований с использованием современных методов, сертифицированного оборудования и реактивов. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета современных статистических компьютерных программ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Антенатальная гипоксия вызывает снижение ДНК-синтетической активности и угнетение ядрышкового аппарата гепатоцитов на фоне активации свободнорадикальных процессов в печени новорожденных белых крыс.

2. У половозрелых белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, имеет место снижение цитокариометрических параметров гепатоцитов и активация процессов свободнорадикального окисления в ткани печени.

3. Неонатальное введение аналогов лей-энкефалина оказывает корректирующее влияние на пролиферативную и анаболическую активность гепатоцитов, а также свободнорадикальное окисление в ткани печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

### **Апробация работы**

Материалы исследования были представлены и обсуждены на Межрегиональной научно-практической конференции по лабораторной диагностике (Хабаровск, 2013); на I Межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины» (Хабаровск, 2013); на II Межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины» (Хабаровск, 2014); на III Межрегиональной научной конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины», посвященной памяти профессора С.С.Тимошина (Хабаровск, 2015); на II Всероссийской научно-практической конференции «Состояние и перспективы медицинской реабилитации» (Санкт-Петербург, 2016), на VI Ежегодной Международной Научно-Практической Конференции «Актуальные вопросы медицины» (Баку, 2017); на международном симпозиуме «Health Sciences University of Hokkaido Symposium» (Sapporo, 2017), на Дальневосточной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы неонатологии и педиатрии» (Хабаровск, 2017).

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах работы в форме планирования экспериментов (85%), их непосредственного выполнения (95%), обработки полученных данных (95%), обсуждения результатов (85%), написания статей и тезисов (85%), написание диссертации и автореферата (85%).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них - 4 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, оформлено 1 рационализаторское предложение.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 151 страницах, содержит 21 таблицу и 12 рисунков. Список литературы включает 389 источников, в том числе 202 отечественных и 187 иностранных. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав собственных данных, заключения, выводов и списка литературы.

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Становление структуры печени в ранние периоды онтогенеза.

#### Влияние антенатальной гипоксии на гепатоциты млекопитающих

Печень является главным органом гомеостазирования у млекопитающих: гепатоциты выполняют более 500 метаболических функций, необходимых для поддержания гомеостаза организма. Морфофункциональной характеристике печени посвящены многочисленные монографии и обзоры (Подымова С.Д., 2005; Усынин И.Ф., Панин Л.Е., 2008; Герок В., Блюм Х.Е., 2009; Надеев А.П. и соавт., 2014; Новикова В.П. и соавт., 2016; Beckingham I.J., 2001; Martin P., 2000).

Печень млекопитающих в антенатальном онтогенезе характеризуется параллелизмом двух взаимосвязанных гистогенетических процессов: формированием популяции гепатоцитов и выполнением функции кроветворения (Паюшина О.В. и соавт., 2012). Фетальные гепатоциты способствуют поддержанию кроветворного микроокружения в печени (Fukumoto T., 1992; Aiuti A. et al., 1998; Паюшина О.В. и соавт., 2012), продуцируют эритропоэтин (Eckardt K., 1996). Сигналом к переключению печени плода на созревание является уменьшение ее гемопоэтической функции, вследствие развития костномозгового кроветворения (Guo Y. et al., 2009).

Структура печени млекопитающих преимущественно формируется в антенатальном и раннем постнатальном периодах (Sasaki K., Sonoda Y., 2000; Захаров В.Б. и соавт., 2005; Guo Y. et al., 2009). Рост печени млекопитающих осуществляется путем пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток (Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н., 1996, 2005; Ельчанинов А.В., 2011). У крыс наибольшая пролиферативная активность с увеличением пула диплоидных гепатоцитов наблюдается примерно до периода прекращения молочного вскармливания. Паренхима печени новорожденной крысы содержит диплоидные клетки (99% всей клеточной популяции), которые интенсивно делятся, увеличивая

свою численность. Уже в первые дни постнатальной жизни появляются двуядерные гепатоциты (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981). Пик пролиферативной активности в печени приходится на 1-2 неделю после рождения, а процессы полиплоидизации гепатоцитов усиливаются после 14 суток постнатального онтогенеза, заметно возрастая к 3 неделе (Шалахметова Т.М. и соавт., 1998). У взрослых млекопитающих пролиферативный индекс гепатоцитов составляет лишь доли процента (Штейн Г.И., 1991). Однако в условиях альтерации, гепатоциты половозрелых млекопитающих обладают чрезвычайно высокой способностью к пролиферации (Allen K.J. et al., 2001; Sandhu J.S. et al., 2001).

Структуры печени неоднородны по уровню оксигенации. Кислородный градиент является важным фактором зонирования метаболической активности печени (Подымова С.Д., 2005; Усынин И.Ф., Панин Л.Е., 2008; Erinn B. et al., 2009). Гипоксия индуцирует повышение концентрации малонового диальдегида в печени, что свидетельствует об активации липидной пероксидации; при этом уровень ферментов антиоксидантной защиты (Mn-супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталазы) в печени подопытных животных значительно снижается (Hashimoto K. et al., 2012). Подобное изменение в системе «прооксиданты-антиоксиданты» обозначают термином «окислительный стресс» (ОС) (Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006). В настоящее время является общепризнанным мнение о важной роли ОС в патогенезе поражения печени любой этиологии (Буеверов А. О., 2002). Избыточное образование активированных кислородных метаболитов (АКМ), активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) вызывает структурные нарушения мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов с подавлением активности цитохром-Р-450-зависимых микросомальных монооксигеназ печени, ответственных за метаболизм многочисленных эндогенных соединений и ксенобиотиков (Князькова Л.Г. и соавт., 2009). При системном ОС понижение концентрации антиоксидантных ферментов более выражено в печени, чем в других органах, что говорит о большей уязвимости (Farías J.G. et al., 2012).

Результатом ОС в печени являются деструктивные процессы (Субботина Т.И., 1997; Бобков Ю.И. и соавт., 1999; Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д., 2003; Князькова Л.Г. и соавт., 2009). При этом возникает синдром цитолиза, который выражается в повышении активности трансаминаз: аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП) и общего билирубина; снижении концентрации альбуминов, фибриногена в плазме крови (Субботина Т.И., 1997; Arai M. et al., 1984; Siegel E.G. et al., 2000; Дуданова О.П., Белавина И.А., 2014).

Ишемически-реперфузионное воздействие способно привести к апоптозу гепатоцитов (Сао L. et al., 2006). АКМ оказывают цитотоксическое действие на гепатоциты путем активации Fas-зависимого апоптоза (Буеверов А.О., 2002). Ишемическое воздействие вызывает гибель гепатоцитов преимущественно в перивенозной зоне (Kato Y. et al., 2001).

В настоящее время в литературе широко обсуждается вопрос о неоднозначности роли АКМ в организме. АКМ являются не только повреждающими факторами, но и участниками пара- и аутокринной регуляции (Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006; Дубинина Е.Е., 2006). АКМ, по современным представлениям, участвуют в регуляции метаболических процессов в качестве внутриклеточных мессенджеров (Кургалюк Н.Н., 2002; Лебедько О.А., Тимошин С.С., 2004; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006; Дубинина Е.Е., 2006). Доказано участие АКМ в регуляции пролиферации, дифференцировки и гибели клеток (Siwik D.A. et al., 1999; Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю., 2001; Лебедько О.А., Тимошин С.С., 2004; Лю Б.Н., 2001; Рязанцева Н.В. и соавт., 2009, 2012). Показано, что переход клеток из  $G_1$  в S-период клеточного цикла сопровождается повышением внутриклеточного уровня АКМ (Гамалей И.А. и соавт., 2001).

Гипоксия активирует в гепатоцитах экспрессию генов, которые обеспечивают адаптацию клеток и тканей к низкому содержанию кислорода. Например, индуцируемые гипоксией транскрипционные факторы (hypoxia-inducible factors - HIFs) - важные компоненты клеточного ответа на гипоксический стресс. HIF-1 приспособливает клетки к гипоксии, переключая с аэробного на анаэробный

метаболизм (Разоренова О.В. и соавт., 2005; Левина А.А. и соавт., 2009; Semenza G.L., 2006; Erinn B. et al., 2009; Zepeda A.V. et al., 2013). Перемежающаяся гипоксия и реоксигенация вызывает в печени белых крыс возрастание активности транскрипционного фактора NF-κB (Jiang Q.F. et al., 2012), который является важным элементом в передаче пролиферативного и антиапоптотического сигналов (Новицкий В.В. и соавт., 2009; Рязанцева Н.В. и соавт., 2009; Волков М.С., Кобляков В.А., 2011). Аналогичные результаты получены в клинических исследованиях: окислительный стресс, обусловленный ишемией и гипоксией, приводит к увеличению активности фактора NF-κB в печени человека (Tu Q. et al., 2016). АКМ индуцируют в гепатоцитах человека стресс-индуцируемый p38 MAPK/ERK-Akt каскад (Wang X. et al., 2011). Показана роль p38 в регуляции клеточного роста и пролиферации гепатоцитов в ответ на гипоксию и окислительный стресс (Tormos A.M. et al., 2013).

Анализ влияния антенатальной гипоксии (АНГ) на структурно-функциональные характеристики фетальных гепатоцитов включает несколько взаимосвязанных аспектов: 1) повреждающее влияние гипоксии на развивающуюся фетальную печень млекопитающих, 2) компенсаторную реакцию гепатоцитов на повреждающее влияние АНГ и 3) роль печени в функционировании организма плода в условиях АНГ.

При физиологической беременности к плоду поступает относительно небольшое количество кислорода. Однако, на всех этапах развития, оксигенация соответствует потребностям плода, поэтому плод не страдает от гипоксии. Обеспечивается такое соответствие приспособительными механизмами (Измestьева К.А., Шабунина-Басок Н.Р., 2010): высокой скоростью кровотока, наличием фетального гемоглобина, использованием анаэробного гликолиза (Студеникин М.Я., 1984) и наличием перфузионного резерва плаценты (Серов В.Н. и соавт., 1989).

Печень плода, по сравнению со всеми другими органами, получает наиболее оксигенированную кровь, что способствует ее быстрому развитию (Серов В.Н. и соавт., 1989; Ищенко Е.В., 2006). В условиях гипоксии возрастает поток

крови через венозный проток (Протопопова Н.В. и соавт., 2012). Это приводит к централизации кровообращения плода и переносу основного потока оксигенированной крови к мозгу и миокарду и, как следствие, к уменьшению притока оксигенированной крови, притекающей к печени (Цывьян П.Б. и соавт., 2007; Протопопова Н.В. и соавт., 2012; Черкасская Г.В., 2014). Установлено, что при нарушении маточно-плацентарного кровообращения у крыс мозг плодов находится в условиях умеренной гипоксии, в то время как печень плодов испытывает тяжелую гипоксию (Мешкова Е.М. и соавт., 2015). На математической модели внутриутробной гипоксии показано, что потребление кислорода в печени во время гипоксических эпизодов уменьшается больше, чем в других жизненно важных органах (Allen W.W. et al., 1977).

Это неблагоприятное для печени следствие компенсаторно-приспособительного механизма централизации кровообращения влечет за собой морфологические и метаболические изменения. При гипоксии у плодов крыс наблюдается уменьшение массы печени по сравнению с контролем, ее отек (Пятышкина Н.А., 2008). Острая ишемия-гипоксия сопровождается снижением активности синтазы жирных кислот в печени плодов крыс (Binienda Z. et al., 1996). Фетоплацентарная недостаточность повреждает митохондриальное окислительное фосфорилирование в печени (Peterside I.I. et al., 2003). АНГ снижает активность супероксиддисмутазы (СОД) в печени плодов крыс. В результате, чрезмерная активация образования АКМ при гипоксии может привести к повреждению мембран, деструкции ферментов, нарушению синтеза ДНК в печени (Song W. et al., 1999).

Согласно данным Корнеева А.А. и соавт. (1991), переносимость животными гипоксической гипоксии снижается по мере формирования системы "мать-плод". Выживание организма и поддержание функциональной активности печени обеспечивается компенсаторно-приспособительными механизмами. В первую очередь, происходят изменения, направленные на увеличение интенсивности маточно-плацентарного кровотока. В тканях плода увеличивается утилизация глюкозы, снижается содержание гликогена (Лебедева И.М., 1978;

Студеникин М.Я., 1984; Lueder F.L. et al., 1995). Хроническая гипоксия стимулирует синтез и высвобождение эритропоэтина в печени. Усиленный эритропоэз под влиянием эритропоэтина приводит к снижению запасов железа и цитохрома-с в печени плодов овец (Georgieff M.K. et al., 1992). Уровень цитохрома-с в фетальной печени крыс при хронической гипоксии снижается более чем в два раза (Xiao D. et al., 2000).

Печени плода принадлежит важная роль в механизмах задержки внутриутробного развития при АНГ (Gruppuso P.A et al., 2005). Ключевым элементом в эмбриональном росте является инсулиноподобный фактор роста (IGF) и связывающий его белок (IGFBP-1). IGFBP-1 синтезируется в печени и ингибирует IGF на клеточном уровне, ограничивая эмбриональный рост. Эмбриональная печень у плодов человека и животных при АНГ является источником повышенного уровня IGFBP-1. Это повышение настолько специфично, что предлагается использовать уровень IGFBP-1 в пуповинной крови как маркер АНГ (Huang S.T. J. et al., 2004).

Неонатальный период является важным критическим периодом становления структуры печени млекопитающих (Piñeiro-Carrero V.M., Piñeiro E.O., 2004). АНГ – частая причина дисфункции печени у новорожденных. Результаты клинко-биохимического обследования новорожденных, перенесших гипоксию в перинатальном периоде, показывают, что ведущим в патогенезе печеночной дисфункции является повреждение структуры гепатоцитов с последующим нарушением функции, изменением химизма желчи и развитием дискинетических расстройств. Данные Islam M.T. et al. (2011) свидетельствуют о повышении в крови новорожденных детей, перенесших интранатальную гипоксию, уровня АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы. Незрелые новорожденные с АНГ в анамнезе имеют повышенный риск развития печеночной декомпенсации. У таких новорожденных имеет место длительная транзиторная гипербилирубинемия вследствие незрелости печеночных систем конъюгации билирубина (Watchko J.F., Maisels M.J., 2003). У новорожденных детей, отличающихся низкой массой при рождении вследствие перенесенной гипоксии, снижен уровень альбумина. Па-

тологические изменения гепатоцитов могут обусловить снижение свертывания крови в результате уменьшения синтеза протромбина, факторов VII, IX, X и фибриногена (Соловьева Н.Б., 1986; Hannam S. et al., 2003), что может провоцировать геморрагическую болезнь новорожденных (Балдина Н.Ю., Спичак И.И., 2014). По мнению Hannam S. et al. (2003), коагулопатия низковесных новорожденных обусловлена дисфункцией печени, связанной с АНГ.

У детей, рожденных в асфиксии различной степени тяжести и погибших на 1-3 сутки после родов, при гистологическом исследовании печени обнаруживается обилие очагов экстрамедуллярного кроветворения, очаговая липидная дистрофия печени, выраженное расстройство кровообращения в виде полнокровия центральных вен и прилегающих синусоидов, обеднение гепатоцитов гликогеном, повышенная коллагенизация. Нередко отмечается нарушение архитектоники желчных капилляров, их ветвление, неравномерное расширение (Ещенко О.И., Мартыненко Л.Г., 1988). Дети с перенесенной внутриутробной гипоксией подлежат диспансерному учету, как больные с функциональными нарушениями гепатобилиарной системы (Вахитова Л.Ф., 2004; Бережанская С.Б. и соавт., 2013). Постгипоксическая патология печени неонатального периода может иметь последствия в более поздние периоды онтогенеза в виде неалкогольного стеатогепатита (Beath S.V., 2003). АНГ коррелирует с развитием во взрослом возрасте диабета 2 типа с нарушениями метаболизма глюкозы в печени (Thorn S.R. et al. 2009). По-видимому, имеют место долгосрочные изменения печеночных функций, в частности, персистирующее повышение глюко-неогенеза (Peterside I.E. et al., 2003; Martin-Gronert M.S. et al., 2007).

Таким образом, АНГ является значимым повреждающим фактором для развития печени млекопитающих. Патологические изменения и сопутствующие компенсаторные реакции имеют место как в ранние периоды онтогенеза (фетальный и неонатальный), так и в отсроченные периоды. Данные литературы об отдаленных последствиях АНГ для морфофункционального состояния печени, а также о возможностях коррекции постгипоксических повреждений печени

недостаточны, что определяет необходимость дальнейшего изучения этого вопроса.

## **1.2 Роль опиоидных пептидов в регуляции пролиферативных и анаболических процессов в организме млекопитающих.**

### **Цитопротективные свойства опиоидных пептидов**

Опиоидные пептиды (ОП) – это группа физиологически активных пептидов, имеющих сродство к  $\mu$ - (мю-),  $\delta$ - (дельта-),  $\kappa$ - (каппа-) опиатным рецепторам (ОР). Группа ОП многочисленна. В нее входят энкефалины, эндорфины, динорфины, казоморфины, дельторфины, дерморфины и др. Большинство ОП образуется в результате процессинга общих белковых предшественников: про-опиомеланокортина, про-энкефалина и про-динорфина (Ашмарин И.П., 1984).

Разные семейства ОП обладают разной аффинностью к подтипам ОР. Так, эндорфины обладают сродством преимущественно к  $\mu$ -рецепторам, энкефалины – к  $\delta$ -ОР, динорфины – к  $\kappa$ -ОР. В настоящее время показана множественность форм каждого подтипа ОР:  $\mu$ -ОР могут быть классифицированы как MOR1, MOR2 и MOR3 (Wolozin B.L., Pasternak G.W., 1981). Clark J.A. et al., (1989) представили доказательства существования 4 подтипов  $\kappa$ -ОР: KOR1a, KOR1b, KOR2 и KOR3. Было показано, что существует по крайней мере два подтипа  $\delta$ -ОР: DOR1 и DOR2 (Jiang Q. et al., 1991; Sofuoglu M. et al., 1993; Traynor J., Elliot J., 1993; Zaki P.A. et al., 1996). Экспрессия и распределение этих рецепторов значительно варьируют как в разных органах одного биологического вида, так и среди различных видов животных (Barry U., Zuo Z., 2005)

Вместе с тем, как правило, эндогенные ОП не являются высоко селективными для конкретного типа ОР. Это обусловлено следующими факторами: 1) все пептидные лиганды ОР содержат N-концевой остаток Туг, который необходим для взаимодействия с ОР; 2)  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -ОР имеют структурное сходство, а также сходство внутриклеточных сигнальных механизмов; 3) формирование гомомерных и гетеромерных комплексов между опиатными и неопиатными ре-

цепторами позволяет модифицировать их для данного опиоидного лиганда (Law P.Y., Loh H.H., 1999; Pasternak G.W., 2004; Waldhoer M. et al., 2004; Barry U., Zuo Z., 2005; Ananthan S., 2006; Lambert D.G., 2008; Zhang S. et al., 2009).

ОП обладают полифункциональностью. Одним из наименее изученных свойств ОП является их способность влиять на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Сведения о влиянии эндогенных опиоидов на процессы пролиферации неоднозначны и противоречивы. В литературе представлены сведения как о стимулирующем, так и ингибирующем влиянии ОП на процессы пролиферации.

В ряде клеточных популяций показано ингибирующее воздействие агонистов ОР на процессы синтеза ДНК и клеточное деление (Cheng F. et al., 2007; McLaughlin P.J. et al., 2009). Опиоиды угнетают синтез ДНК в культуре клеток мозга крысы, ингибируют пролиферацию астроцитов различных отделов мозга (Barg J. et al., 1993). Агонисты ОР подавляют деление клеток нейробластомы человека (McLaughlin P.J. et al., 1999; Mohan S. et al., 2010). ОП оказывают ингибирующее влияние на пролиферацию эпителиальных и мышечных клеток матки *in vitro* (Kornyei J.L. et al., 2001), кератиноцитов (Nissen J.V. et al., 1999), миоцитов сосудов (Li Y. et al., 1997). Противоопухолевой активностью для клеток рака гортани и слабо дифференцированных клеток метастазов рака прямой кишки обладают модифицированные аналоги мет- и лей-энкефалина. Для этих опиоидов также характерна выраженная антипролиферативная активность в культуре клеток аденокарциномы молочной железы, лимфобластной лейкемии (Horvat S. et al., 2006). В литературе описана способность морфина и аналога лей-энкефалина даларгина ингибировать пролиферацию лимфоцитов (Зозуля А.А., Пшеничкин С.Ф., 1990), спленоцитов (Chuang L.F. et al., 1997). ОП оказывают преимущественно угнетающее влияние на пролиферативную активность кардиомиоцитов новорожденных белых крыс (Сазонова Е.Н., 2004). Угнетение синтеза ДНК в эпителиоцитах и миоцитах респираторного тракта новорожденных белых крыс при введении агонистов ОР показано в исследованиях О.А. Лебедько (2003).

По-видимому, угнетение пролиферативных процессов возможно при активации разных типов ОР. Селективные агонисты  $\mu$ -ОР действуют угнетающе на процессы пролиферации в эпителии роговицы и языка белых крыс (Радивоз М.И., 1991, 1999). Агонист  $\delta$ -ОР DADLE угнетает пролиферативные процессы в культуре мезенцефальных клеток крыс (Tsai S.Y. et al., 2010). Агонист  $\kappa$ -ОР ди-норфин вызывает снижение количества ДНК-синтезирующих кардиомиоцитов новорожденных белых крыс (Гончарова Е.Н. и соавт., 1997).  $\mu/\delta$ -агонист седатин вызывает замедление ДНК-синтетических процессов в миокарде новорожденных белых крыс (Крыжановская С.Ю. и соавт., 2007).

В наибольшей степени ингибирующее влияние на пролиферативные процессы показано для Met-энкефалина, который получил название опиоидный фактор роста (OGF) (McLaughlin P.J. et al., 2009). Влияние OGF на клетки опосредовано специфическим зета-рецептором, находящемся на ядерной мембране (Zagon I.S. et al., 2005). OGF в низких концентрациях подавляет пролиферативные процессы в нормальных тканях, в высоких дозах угнетает прогрессию опухолевых клеток рака поджелудочной железы путем ингибирования синтеза ДНК в S-фазе клеточного цикла (Zagon I.S., McLaughlin P.J., 2014). Сверхэкспрессия рецепторов OGF в эпителиальных тканях трансгенных мышей подавляет пролиферацию клеток эпителия кожи, роговицы, языка и негативно влияет на процесс заживления ран (McLaughlin P.J. et al., 2012). При нейтрализации OGF специфическими антителами, увеличивается число клеток в различных культурах опухолей человека (Zagon I.S. et al., 2009). При взаимодействии морфина с рецепторами OGF подавляется пролиферация клеточной линии рака легкого человека (Kim J.Y. et al., 2016).

Активация пролиферативных процессов *in vitro* и *in vivo* при блокаде ОР специфическими антагонистами является подтверждением вовлеченности эндогенных опиоидов в тоническую негативную регуляцию пролиферации. Так, блокада ОР налтрексоном стимулирует процессы синтеза ДНК в эпителии роговицы кролика *in vitro* (Zagon I.S. et al., 1995). При системном введении налтрексона происходит активация ДНК-синтетических процессов в эпителии

языка мыши (Zagon I.S. et al., 1994), ускоряются процессы восстановления эпителия роговицы после повреждения у крыс (Zagon I.S. et al., 2002), происходит активация репаративной регенерации эпидермиса у мышей (Wilson R.P. et al., 2000). Налтрексон стимулирует синтез ДНК и митотическую активность в культурах опухолевых клеток нейробластомы мышей и человека, сквамозной карциномы головы и шеи (Cheng F. et al., 2007), фибросаркомы человека (Zagon I.S., McLaughlin P.J., 1990), анапластического рака щитовидной железы (McLaughlin P.J. et al., 2009). Блокада ОР в результате системного введения налоксона приводит к повышению ДНК-синтетической активности миокарда новорожденных (McLaughlin P.J., 1996; Сазонова Е.Н., 2004).

Вместе с тем, в литературе широко представлены данные о стимулирующем влиянии активации ОР на процессы пролиферации.  $\beta$ -эндорфин стимулирует пролиферацию пигментного эпителия сетчатки куриного эмбриона (Kishi H. et al., 1996), повышает число митозов и содержание ДНК в культуре клеток глии, стимулирует пролиферативные процессы и увеличивает количество нейронов в гиппокампе (Persson A.I. et al., 2003). Эндоморфины и дельторфин стимулируют процессы пролиферации, миграции и адгезии эндотелиальных клеток пупочной вены человека *in vitro* (Dai X. et al., 2010). Введение агонистов  $\mu$ -ОР пептидов A10 и DAGO приводит к повышению ДНК-синтетической активности в миокарде новорожденных крыс (Гончарова Е.Н., 1997; Мельникова Н.П., 1998). Агонист  $\mu$ -ОР  $\beta$ -казоморфин оказывает стимулирующее влияние на пролиферативные процессы в миокарде новорожденных белых крыс (Масленникова Н.В. и соавт., 2008). Агонисты  $\mu$ -ОР морфин и DAMGO стимулируют рост клеток карциномы легких Льюиса *in vitro* (Mathew B. et al., 2011). В свою очередь, антагонист  $\mu$ -ОР периферического действия метилналтрексон уменьшает активность пролиферативных процессов в первичной опухоли и метастазах карциномы Льюиса (Mathew B. et al., 2011). Антагонист ОР налотрексон снижает пролиферативную активность лимфоцитов (Li Y.F. et al., 1998), вызывает регрессию В-клеточной лимфомы у людей (Berkson B.M. et al., 2007).

В реализацию стимулирующего эффекта опиоидов вовлечены не только  $\mu$ -ОР. Так, активация  $\delta$ -ОР приводит к стимуляции пролиферативных процессов в культуре нейрональных клеток (Zagon I.S. et al., 2009); повышает выживаемость и потенцирует рост неонатальных кардиомиоцитов (Wang D. et al., 2009), уменьшает апоптоз в корковых нейронах и глиальных клетках центральной нервной системы (Kim H. et al., 2012), в неонатальных кардиомиоцитах (Wang D. et al., 2009). Агонист  $\kappa$ -ОР динорфин повышает пролиферативную активность клеток аденокарциномы предстательной железы (Moon T. D., 1988).

Влияние ОП на анаболические и пролиферативные процессы в значительной степени связано с антиоксидантными и цитопротективными свойствами. Это определяет существенную роль ОП при повреждающих воздействиях. По данным Тимошина С.С. и соавт. (1990), синтетический  $\delta$ -/ $\mu$ - агонист ОР пептид даларгин препятствует повышению уровня аберрантных митозов и нарушению синтеза ДНК, индуцируемых стрессом.

Активация эндогенной опиоидной системы и повышение концентрации ОП в крови отмечается в условиях гипоксии (Брагин Е.О., Яснецов В.В., 1991). Это - компенсаторная реакция, направленная на повышение резистентности организма к гипоксии (Слепушкин В.Д. и соавт., 1988). В условиях острой гипоксии ОП реализуют свои эффекты через  $\mu$ -,  $\delta 1$ - и  $\delta 2$ -ОР (Золоев Г.К., 1992,а; Kimberly P. et al. 1994). По мнению ряда авторов, способностью повышать устойчивость животных к гипоксии обладают только агонисты  $\delta$ -ОР. Антиоксидантные свойства  $\delta$ -агонистов связаны с их способностью активировать супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу (Реброва Т. Ю. и соавт., 2005, Донцов А.В., 2015). Вместе с тем, показано участие  $\mu$ -ОР в реализации кардиопротекторных эффектов хронической нормобарической гипоксии (Нарыжная Н.В. и соавт., 2013), в формировании адаптации к аритмогенному действию ишемии-реперфузии (Маслов Л.Н. и соавт., 2001; Лишманов Ю.Б. и соавт., 2003). В качестве основного механизма повышения устойчивости сердца к стрессорным повреждениям при активации  $\mu$ -ОР, рассматривается уменьшение активности симпатической нервной системы (Маслов Л.Н. и соавт., 2001). По данным Яс-

нецова В.В. (1988 a,b), одним из механизмов защитного действия ОП при гипоксии является снижение кислородного запроса тканей и тканевого дыхания. ОП предотвращают массивный выброс катехоламинов в кровь и их гистотоксическое действие (Алекминская Л.А. и соавт., 1986). Антагонисты ОР блокируют антиоксидантные эффекты опиоидов (Wang X. et al., 2016; Estrada J.A. et al., 2016), что свидетельствует о рецептор-опосредованном характере эффекта. Антагонист ОР налоксон укорачивает продолжительность жизни животных в условиях гипоксической гипоксии (Яснецов В.В., 1988a).

Нормальное течение процесса синтеза ДНК и регенерации возможно только в условиях оптимального свободнорадикального статуса (Дас Д. К., Молик Н., 2004; Yang L.Q. et al., 2011). ОП принадлежит особая роль в обеспечении нормального редокс-статуса организма (Лишманов Ю.Б. и соавт., 1992; Лебедько О.А., Тимошин С.С., 1994; Liu D. W. et al., 2008; Singh R., Rai U. 2010; Yang L.Q. et al., 2011; Gao C.J. et al., 2012). Синтетический аналог лей-энкефалина даларгин проявляет значительную антиоксидантную активность: подавляет процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) как в изолированном сердце (Лишманов Ю.Б. и соавт., 1992), так и на уровне организма в целом (Князькова Л.Г. и соавт., 2007) путем активации СОД (Реброва Т. Ю., и соавт., 2005). Даларгин активизирует ферментативное звено антиоксидантной защиты (АОЗ) при острой почечной недостаточности у крыс (Орлова Е.А., Комаревцева И.А., 2004), препятствует повышению уровня малонового диальдегида в слизистой оболочке желудка в условиях иммобилизационного стресса, снижает генерацию АКМ и поддерживает уровень низкомолекулярных антиоксидантов в крови белых крыс при умеренной гипотермии, предотвращая тем самым активацию ПОЛ (Таджибова Л.Т. и соавт., 2010).

Цитопротективный эффект ОП может быть обусловлен несколькими внутриклеточными системами мессенджеров. ОР относятся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белком (Belcheva M.M. et al., 2005). ОР сопряжены с Gi/q-белками, которые ингибируют аденилатциклазу и активируют фосфолипазу С. Фосфолипаза С, в свою очередь, способствует образованию диа-

цилглицерола – активатора протеинкиназы С (Dhawan B.N. et al., 1996). Протеинкиназа С фосфорилирует GSK-3 $\beta$ -киназу (glycogen synthase kinase-3  $\beta$ ), связанную с внешней мембраной митохондрий, что ведет к ее инактивации, закрытию МРТ-пор и подавлению апоптоза (Juhaszova M. et al., 2004). По данным Tang B. et al. (2011), протеинкиназа С вовлечена в антиапоптотические эффекты  $\delta$ -ОР, в большом количестве представленных на мембране гепатоцитов. Кардиопротективный эффект ОП связывают также с митоген-активируемыми протеинкиназами (Маслов Л.Н. и соавт., 2013).

Взаимодействие опиоидов с ОР приводит к активации фосфоинозитид-3-киназы и к образованию фосфатидил-3-фосфатов, которые стимулируют PDR1-киназу (3-phosphinositide-dependent kinase-1 – 3-фосфатидилзависимую киназу-1) (Саватеев А.В., Саватеева-Любимова Т.Н., 2010). В свою очередь, PDR1-киназа фосфорилирует Akt-киназу, обеспечивающую выживание клеток в неблагоприятных условиях (Саватеев А.В., Саватеева-Любимова Т.Н., 2010).

Существуют данные и о другом сигнальном пути, активация которого приводит к цитопротекции. Связывание опиоида со специфическим  $\mu$ - или  $\delta$ -ОР вызывает трансактивацию Src с образованием единого комплекса с рецептором EGF, что приводит к активации Ras (малой ГТФ-азы, локализованной в подмембранной области). Ras обладает свойством активировать каскад киназ, в частности, Raf-1, которая транслоцируется в мембрану и активирует киназы MEK1/2. Киназа MEK фосфорилирует и активирует киназы Erk1/2. Предполагают, что Erk-киназа фосфорилирует белки Bax и Bad, что ведет к блокаде апоптоза (Cao C.M. et al., 2005; Hausenloy D.J., Yellon D.M., 2007; Маслов Л.Н. и соавт., 2014). Показано участие киназы Erk, киназы Jun в гепатопротективных механизмах при патологии печени (Шептулина А.Ф. и соавт., 2013; Kullak-Ublick G.A. et al., 2004). Svegliati-Baroni G. и соавт. (2003), показали вовлеченность этих киназ в процесс регенерации печени.

Предполагают, что существенную роль в механизмах цитопротекции под действием опиоидов играет сигнальный путь с участием NO-синтазы. Синтетический аналог лей-энкефалина даларгин обладает способностью активировать

систему NOS-NO (Животова Е.Ю. и соавт., 2012; Животова Е.Ю., 2014). NO-синтаза вовлечена в кардиопротекторный эффект опиоидов (Маслов Л.Н. и соавт., 2013). Опиоиды, взаимодействуя с ОР, активируют рецепторную тирозинкиназу, что запускает фосфоинозитил-3-киназный каскад с фосфорилированием Akt-киназы. Это приводит к экспрессии эндотелиоцитами eNOS с высвобождением NO, активацией гуанилатциклазы и протеинкиназы G, изменением проницаемости митоK<sub>ATФ</sub>-каналов, образованием АКМ и их взаимодействием с МРТ-порой. Таким образом, NO-синтаза играет важную роль в механизмах кардиопротекторного действия опиоидов (Маслов Л.Н. и соавт., 2013; Zhang H.Y. et al., 2002; Hausenloy D.J., Yellon D.M., 2007).

Процесс родов, являясь сильным стрессовым фактором для матери и ребенка, индуцирует развитие физиологического напряжения эндогенной опиоидной системы и увеличение содержания в крови ОП (Golub M.S. et al., 1991; Aurich J.E. et al., 1993; Соколова Н.А. и соавт., 2002). ОП вовлечены в процессы адаптации новорожденных к резко изменившимся внеутробным, условиям существования. Так, повышенный уровень ОП способствует созданию охранительного торможения мозга в раннем постнатальном периоде (Држевецкая И.А., 1994). Работами Aurich J.E. et al., (1993) показано, что у новорожденных телят, родившихся в срок, уровень ОП гораздо выше, чем у телят, рожденных преждевременно. У недоношенных новорожденных животных адаптация к внеутробным условиям существования протекает более сложно и длительно. Это может быть обусловлено сниженным уровнем энкефалинов у недоношенных животных (Aurich J.E. et al., 1993). Эндогенным опиоидам отводится важная роль в патогенезе нейроэндокринных проявлений синдрома пренатального стресса (Резников А.Г. и соавт., 2003).

Опиоидные пептиды могут играть существенную роль в уменьшении последствий антенатальной гипоксии (АНГ). В тканях плода при хронической АНГ изменяется экспрессия  $\mu$ -ОР. По данным ряда исследований, хроническая АНГ снижает число  $\mu$ -ОР в мозге крыс (Kraczkowski J.J., Semczuk M., 2000; Kraczkowski J.J. et al., 1998; 2014). Другие исследователи отмечают повышен-

ную плотность  $\mu$ -ОР в кардиальном и дыхательном центрах ствола мозга у животных с гипоксической задержкой внутриутробного развития (Liu J. et al., 2001). Введение агониста  $\mu$ -ОР  $\beta$ -казоморфина самкам крыс на ранних сроках беременности нивелирует влияние АНГ на некоторые биохимические и поведенческие показатели у потомства (Маслова М.В. и соавт., 2001). Агонисты ОР отменяют негативные последствия перинатальной гипоксии у новорожденных макак-резус (Golub M.C. et al., 1991).

Таким образом, анализ литературы позволяет заключить, что опиоидные пептиды способны оказывать существенное влияние на пролиферативные и анаболические процессы у млекопитающих. Агонисты ОР проявляют выраженные цитопротективное и антиоксидантное действия, что позволяет считать эти вещества перспективными средствами коррекции структурных нарушений при патологии.

### **1.3 Гепатопротективные свойства опиоидных пептидов**

В печени млекопитающих есть собственная опиоидергическая система. Клетки печени имеют сравнимое с клетками мозга количество ОР (Солин А.В., Ляшев Ю.Д., 2012; Khawaja X.Z. et al. 1990). На мембране гепатоцитов в большом количестве выявлены  $\delta$ -ОР (Wittert G. et al., 1996; Zagon I.S. et al., 2000; Tang B. et al., 2011). Гепатоциты мыши и человека экспрессируют мРНК  $\mu$ -ОР (Chakass D. et al., 2007). Селективный периферический агонист  $\kappa$ -ОР [14C]-EMD 61753 связывается в ткани печени крыс, что указывает на присутствие  $\kappa$ -ОР (Barber A. et al., 1994). Кроме того, в печени выявлены участки связывания опиатов, которые отличаются от классических ОР по стереоселективности (Simantov R. et al., 1978). Высказывается предположение, что эти участки связывания опосредуют некоторые эффекты опиатов на гепатоциты, например, описано ингибирование метадоном и налоксоном синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* (Beverley C.L. et al., 1984).

ОП влияют на функционирование печени. Эндогенные ОП принимают участие в регуляции желчеотделительной функции печени (Рудин И.В., Медведев М.А., 1997; Медведев М.А. и соавт., 2006а, 2006б, 2006с). Предполагают, что секреция желчи находится под тоническим контролем опиоидергической регуляции (Рудин И.В., 2006). В экспериментах на изолированной печени крыс показано увеличение скорости желчеоттока и секреции таурохолата при стимуляции  $\delta$ -ОР и снижение этих показателей при активации  $\mu$ -ОР (Медведев М.А. и соавт., 2006а). Выявлено, что неселективный агонист  $\delta/\mu$ -ОР далаггин, селективные агонисты  $\delta$ -ОР (DADLE),  $\mu$ -ОР (DAGO) и  $\kappa$ -ОР (U 50488) оказывают угнетающее влияние на секретин-стимулированное желчеотделение, однонаправлено влияя на показатели скорости желчеотделения и секреции желчных кислот, фосфолипидов и билирубина. Однонаправленность эффектов агонистов  $\delta$ -,  $\mu$ - и  $\kappa$ -ОР на секреторную функцию печени обусловлена влияниями на одни и те же внутриклеточные механизмы, а, именно, угнетение аденилатциклазы и снижение уровня цАМФ в гепатоцитах (Медведев М.А., Рудин И.В., 2006).

По-видимому, опиоидергическая система может оказывать на секреторную функцию печени разнонаправленные влияния в зависимости от исходного уровня секреции (Медведев М.А. и соавт., 2006б) и от локализации стимулируемых ОР (Рудин И.В., 2006). Показан разнонаправленный характер эффектов на желчеотделение при стимуляции периферических и центральных ОР (Рудин И.В., Медведев М.А., 2006). В работе Bergasa N.V. et al. (1999) высказано предположение о том, что в волокнах вегетативной нервной системы, иннервирующих печень, существуют опиоидергические механизмы передачи сигнала, опосредующие эффекты центрального введения опиоидов на желчеотделение. Таким образом, опиоидергическая система оказывает модулирующее воздействие на желчеотделительную функцию печени (Медведев М.А., Рудин И.В., 2006).

Энкефалины стимулируют гликогенолиз и глюконеогенез в изолированных гепатоцитах (Leach P.P. et al., 1985), блокируют гликогенолитическое дей-

ствие различных гормонов, опосредуя этот эффект через снижение цАМФ в гепатоцитах (Matsumura M. et al., 1984; Золоев Г.К. и соавт., 1992b). Усиление гликогенеза гепатоцитами через пути, связанные с фосфолипазой С и протеинкиназой С, выявлено при активации  $\mu$ -ОР бета-эндорфином (Cheng J.T. et al., 2002; Liu I.M. et al., 2003).

ОР вовлечены в нарушения обмена триглицеридов и холестерина в печени. Введение антагониста ОР налтрексона значительно ослабляет стеатоз печени у мышей, индуцированный стрессом эндоплазматического ретикулума (Moslehi A. et al., 2017). Введение агониста  $\mu$ -ОР бупренорфина влияет на фосфолипидный состав плазматических мембран гепатоцитов, нормализует обмен фосфоинозитола (Ласкова Г.Ф., Удовиченко В.И., 1994).

ОР способны влиять на пролиферативные и анаболические процессы в печени. Агонист  $\mu$ -ОР тетрапептид А-10 и агонист  $\kappa$ -ОР динорфин (1-13) оказывают стимулирующее влияние на синтез ДНК в печени 7-суточных крыс (Яценко Т.В., 1997). Агонист  $\delta$  / $\mu$ -ОР даларгин стимулирует синтез белка в печени (Бобков А.И. и соавт., 1989). Введение неселективного  $\mu/\delta$ -агониста ОР пептида седатин приводит к увеличению среднего количества ядрышек в ядрах гепатоцитов (Самарина Е.Ю. и соавт., 2016).

Вместе с тем, активация центральных  $\mu$ -ОР при интрацеребровентрикулярном введении DAGO приводит к снижению синтеза белка в печени (Hashiguchi Y. et al., 1997). Интрацестернальное введение  $\beta$ -эндорфина ингибирует процессы синтеза ДНК в печени новорожденных крысят (Bartolome J.V., Bartolome M.B., 1994).

В печени реализуется цитопротективное действие ОР. Tang B. et al. (2011) установили, что агонист  $\delta$ -ОР DADLE оказывает цитопротективный эффект в клетках печени человека. Выявленный антиапоптозный эффект стимуляции  $\delta$ -ОР опосредован протеинкиназой С; при этом стабилизируется мембранный потенциал митохондрий, уменьшается концентрация цитохрома с в цитозоле (Tang B. et al., 2011).  $\delta$ -ОР оказывают защитное влияние при повреждении печени и при холестатических заболеваниях, путем активации регенера-

тивных процессов в печени (Nicoll J. et al., 2005; Marzioni M. et al., 2006). Активация  $\mu$ -ОР предотвращает гибель печеночных клеток *in vitro* и *in vivo* (Chakass D. et al., 2007).

Синтетический аналог лей-энкефалина даларгин оказывает гепатопротекторное действие в клинике и эксперименте (Короткина Р.И. и соавт., 1991, 1992). Применение даларгина у крыс при экспериментальном холестазах приводит к снижению активности ксантиноксидазы и уровня ПОЛ в печени, возрастанию активности глутатион-S-трансферазы (Короткина Р.И. и соавт., 1991, 1992). Введение даларгина оказывает гепатопротективное действие при отравлении хлорорганическими соединениями, при этом происходит нормализация активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) (Полонский В.М. и соавт., 1989). В условиях острой кровопотери даларгин улучшает кровоснабжение печени, способствует нормализации метаболизма гепатоцитов (Золоев Г.К. и соавт., 1988). По данным Калинина В.Ю. (2000), предварительное введение даларгина при острой гипоксической гипоксии устраняет постгипоксические изменения  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТ), общего билирубина, глюкозы, АСТ, лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Активация  $\mu$ -ОР пептидом DAMGO предотвращает  $CCl_4$ - и ConA-индуцированный гепатит у мышей, при этом выявлено уменьшение площади некроза и снижение показателей АЛТ и ЛДГ. Фармакологическое ингибирование периферических  $\mu$ -ОР налоксоном приводит к более выраженному цитолизу гепатоцитов у мышей с  $CCl_4$ -индуцированным гепатитом (Chakass D. et al., 2007).

Агонист  $\mu$ -ОР ремифентанил оказывает гепатопротективное и противовоспалительное действие при ишемии-реперфузии печени в эксперименте, значительно снижая повреждение ткани печени и уровень печеночных аминотрансфераз. Неселективный антагонист ОР налоксон ослабляет защитное действие ремифентанила при ишемии-реперфузии печени (Liu X. et al., 2015). Предварительное введение морфина оказывает гепатопротективное действие при ишемии-реперфузии в нормальной и цирротически измененной ткани пе-

чени крыс (Wang Y. et al., 2012). Неселективный  $\mu/\delta$ -агонист ОР пептид седатин нормализует показатель количества ядрышек гепатоцитов у крыс после хронической гипоксии (Самарина Е.Ю. и соавт., 2016). Введение даларгина восстанавливает аминокислотный спектр гомогенатов печени у крыс с экспериментальным перитонитом (Бобков А.И. и др., 1989).

Вместе с тем, ОП могут участвовать в развитии патологических процессов в печени. Содержание в плазме некоторых агонистов ОР увеличивается при первичном билиарном циррозе, печеночной энцефалопатии и холестатических болезнях печени (Bergasa N.V. et al., 2002; Owczarek D. et al., 2003). Это может быть результатом как повышенной продукции, так и задержки деградации эндогенных опиоидов. Показана роль эндогенной опиоидной системы в холестазае (Marzioni M. et al., 2006; Ghaffari K. et al., 2004). По данным De Minicis S et al. (2008) эндогенные опиоиды участвуют в фиброгенезе в печени, стимулируя пролиферацию звездчатых клеток и синтез коллагена. Уровень экспрессии  $\delta$ -ОР в клетках и тканях гепатоцеллюлярной карциномы значительно выше, чем в нормальной ткани печени. Ингибирование экспрессии гена  $\delta$ -ОР приводит к снижению пролиферации клеток гепатоцеллюлярной карциномы, апоптозу и блокаде клеточного цикла опухолевых клеток. Таким образом,  $\delta$ -ОР могут быть вовлечены в формирование и прогрессирование опухоли печени (Tang B. et al., 2013).

Антиоксидантное и гепатопротективное действие опиоидных пептидов позволяют предполагать их высокую эффективность при коррекции морфофункциональных нарушений в печени млекопитающих, перенесших антенатальную гипоксию. Вместе с тем, в доступной нам литературе, мы не обнаружили сведений по этому вопросу.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Характеристика экспериментальных животных

Эксперименты по моделированию антенатальной гипоксии проводили на белых рандомбредных крысах и крысах линии Вистар. Использование крыс, в качестве объекта исследования, обусловлено сходным с человеком гемохориальным типом плаценты, что важно для интерпретации экспериментальных данных (Карлсон Б., 1983). Печень эмбрионов крыс по морфологическому строению соответствует печени плода человека (Батанов А.Н. и соавт., 2000); экспериментальная АНГ у крыс имеет черты сходства с фетоплацентарной недостаточностью у человека. Кроме того, по данным Гармашевой Н.Л., Константиновой Н.Н. (1985) гетерохронность роста и развития тканей, органов у крыс при фетоплацентарной недостаточности в эксперименте сходна с гетерохронностью роста и развития у плода человека при нарушении маточно-плацентарного кровообращения.

В экспериментах использовали потомство крыс-самок 3-4 месячного возраста. Перед началом эксперимента, крыс-самок содержали 10 дней в стационарных условиях вивария: при естественном освещении, температуре 20-22°C, в клетках площадью 0,6 кв.м., по 4-5 самок в каждой клетке. Питание и питье животные получали *ad libitum*. Для получения потомства крыс-самок в фазе диэструса эстрального цикла ссаживали с крысами-самцами. Наличие беременности определяли по нахождению во влагалищном мазке сперматозоидов и последующему установившемуся периоду межтечки. За три дня до предполагаемых родов самок помещали в индивидуальные клетки. В исследовании использовали новорожденное и 60-суточное потомство.

Эвтаназию животных для оценки последствий АНГ осуществляли посредством быстрой декапитации под хлороформовым рауш-наркозом на 7 и 60 сутки после рождения. Согласно классификациям Западнюк И.П. и соавт., (1974), Махинько В.И., Никитина В.Н. (1975), возраст с 1 по 7 сутки после рождения

может относиться к периоду новорожденности. 60-ти суточных крыс относят к половозрелым животным.

## **2.2 Организация экспериментов. Моделирование антенатальной гипоксии**

При постановке опытов руководствовались приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Использовали модель гипобарической гипоксии. Выбор данной модели обусловлен несколькими фактами: 1) гипоксия, как типовой патологический процесс, является одним из основных повреждающих факторов в системе «мать-плацента-плод» (Соколова Н.А. и соавт., 2002); 2) в экспериментальных работах для моделирования гипоксических состояний, как правило, используются методики, связанные с уменьшением парциального давления кислорода ( $pO_2$ ) во вдыхаемом воздухе (Лебедько О.А. и соавт., 1994; Савченков Ю.И., Лобынцев К.С., 1980; Журавин и соавт., 2003; Маслова М.В. и соавт., 1999, 2005; Соколова Н.А. и соавт., 2002).

Помещение животных в барокамеру, шум, изменение освещенности являются дополнительными стрессорными воздействиями на экспериментальных животных. Эти воздействия усугубляют антенатальную гипоксию, поскольку, повреждающее действие большинства патологических факторов, в том числе и эмоционального стресса, на систему «мать-плод» реализуется именно через гипоксию (Соколова Н.А. и соавт., 2002). Так, острое стрессорное воздействие во второй половине беременности приводит к развитию циркуляторной гипоксии в фетоплацентарном комплексе (Герелюк И.П., Масляк С.Н., 1991). Кроме того, сама гипоксия является патогенетическим фактором, приводящим к развитию стресс-реакции. Следовательно, выбранная экспериментальная модель гипоксического воздействия оказывает комплексное влияние на развитие плода и может осуществляться как через гипоксию, так и по механизмам «стресс-реакции» (Рыжавский Б.Я., 1999).

Гипоксическое воздействие осуществляли в барокамере СБК-48 объемом 1,5 куб.м. Разрежение воздуха в камере проводили с помощью вакуумного электронасоса, контролируя величину разрежения по манометру, проградуированному в мм.рт.ст. Беременных крыс-самок помещали в барокамеру натошак и «поднимали» на высоту 9000 метров над уровнем моря, что соответствовало давлению 224 мм.рт.ст. и насыщению кислорода 42 мм. рт.ст. Гипоксия при таком воздействии расценивается как тяжелая (Лебедева И.М., 1978; Савченков Ю.И., Лобынцев К.С., 1980).

Гипоксическое воздействие на беременных самок белых крыс проводили с 14 по 19 день беременности. Выбор срока гипоксии был обусловлен тем фактом, что гипоксия плода, как правило, диагностируется во второй половине беременности (Студеникин М.Я., 1984), а переносимость беременными гипоксической гипоксии уменьшается по мере формирования системы «мать-плод» (Корнеев А.А. и соавт., 1991). Гипоксическое воздействие осуществляли ежедневно в течение 6 дней; время воздействия, с учетом циркадных ритмов чувствительности крыс к гипоксии, было с 9 до 13 часов ежедневно (Хачатурьян М.Л., Панченко Л.А., 2002). Продолжительность гипоксической экспозиции составляла 4 часа: компрессия и декомпрессия составляли по одному часу, стационарная гипоксия - два часа. Скорость «подъема» и «спуска» регулировали с помощью механического клапана, лимитирующего поступление воздуха из атмосферы в емкость камеры. Средняя скорость составляла 8-10 мм рт ст/мин, что соответствует допустимым величинам скорости изменения барометрического давления (Лапаев Э.В. и соавт., 1981). С целью поддержания постоянной влажности воздуха и поглощения углекислого газа в барокамеру помещали силикагель. Температура воздуха в барокамере составляла в среднем 18-22°C и соответствовала температуре воздуха в лаборатории.

Использовали потомство подопытных крыс-самок, перенесших гипоксическое воздействие. Контролем служило потомство интактных животных.

В экспериментах с воздействием пептидов, исследуемые пептиды вводили животным (потомству) с 2 по 6 сутки жизни ежедневно в дозе 100 мкг/кг

внутрибрюшинно. Контрольные животные получали эквивалентное количество растворителя - физиологического раствора хлорида натрия. Доза веществ и режим введения были выбраны на основании проводимых ранее в лаборатории экспериментов и с учетом данных литературы. Введение исследуемых веществ осуществляли в одно и то же время, в 10 часов утра, с учетом формирования суточного ритма деления клеток в раннем постнатальном онтогенезе (Захаров В.Б. и соавт., 2005).

Выведение животных из эксперимента в первой части исследования осуществляли через 24 часа после заключительной инъекции в возрасте 7 суток. Во второй части исследования, для анализа отдаленных последствий АНГ, подопытных животных выводили из эксперимента в возрасте 60 суток.

### **2.3 Характеристика объекта исследования**

В качестве объекта исследования использовали ткань печени беспородных белых крыс и крыс линии Вистар. Печень млекопитающих имеет гетерогенное строение. В ней представлены различные клеточные популяции: гепатоциты, холангиоциты, эндотелиоциты, клетки Купфера, перисинусоидальные звездчатые клетки (клетки Ито), печеночные НК-клетки (Pit-клетки), печеночные стволовые клетки и стволовые клетки костномозгового происхождения, овальные клетки (*Terminologia Histologica* под ред. Банина В.В., Быкова В.Л., 2009; Люндуп А.В. и соавт., 2010; Гумерова А.А. и соавт., 2007). Все типы клеток взаимодействуют между собой при посредничестве экстрацеллюлярного матрикса и являются составляющими единой структурно-функциональной системы, обеспечивающей выполнение специализированных функций гепатоцитов (Люндуп А.В. и соавт., 2010).

Гепатоциты являются наиболее многочисленной клеточной популяцией, на их долю приходится 60% всех клеток печени. В эмбриогенезе гепатоциты происходят из энтодермы кишечной трубки, во взрослом организме они могут образовываться из стволовых кроветворных клеток (Theise N.D. et al., 2000; Гу-

мерова А.А. и соавт., 2007). Гепатоциты имеют неправильную полигональную форму, их диаметр 20-25 мкм и более. Ядра гепатоцитов круглой формы, величиной от 7-16 мкм и более. Разница в величине объясняется наличием в печеночных клетках наряду с обычными ядрами (диплоидными) более крупных полиплоидных ядер (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981; Подымова С.Д., 2005). Гепатоциты морфологически и функционально неоднородны в пределах долики. Гепатоциты центральных отделов долики более крупные, чем в периферических отделах, ядра их меньше, окраска цитоплазмы светлее, имеются различия в содержании и распределении основных клеточных органелл и включений. Структурная гетерогенность гепатоцитов отражает различия в их функциональной активности, которая зависит от условий внутридолевой микроциркуляции (Усынин И.Ф., Панин Л.Е., 2008). Малые перипортальные гепатоциты в большей степени выполняют функции глюконеогенеза, образования мочевины и желчи. В крупных перивенозных гепатоцитах осуществляется метаболизм ксенобиотиков, синтез глутамина и кетогенез (Jungerman K., Katz N., 1989).

Являясь неоднородной клеточной популяцией, гепатоциты различаются не только по размеру, местоположению в долике печени и своей специфической функциональной активности, но также по степени пloidности и активности ДНК-синтетических процессов (Урываева И.В., 1988; Кудрявцев Б.Н. и соавт., 1991; Усынин И.Ф., Панин Л.Е., 2008). Несмотря на то, что существуют межвидовые различия в уровне полиплоидизации паренхимы печени у млекопитающих (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981), имеется выраженное морфофункциональное сходство печени крыс и человека (Kiassov A.P. et al., 1995; Nitou M. et al., 2000; Kawai S. et al., 2003; Villeneuve J. et al., 2009; Смахтин М.Ю., 2004; Паюшина О.В и соавт., 2012; Гумерова А.А., 2012; Зиматкин С.М., Марковец Н.И., 2016). Процесс полиплоидизации гепатоцитов в печени человека сходен с аналогичным процессом в печени грызунов, хотя и отличается существенно меньшими скоростями образования полиплоидных клеток (Штейн Г.И., 1991).

Учитывая морфофункциональное сходство печени крысы и человека, печень крысы является адекватной экспериментальной моделью для изучения влияния АНГ на тканевой гомеостаз печени и проведения клинко-экспериментальных параллелей.

## 2.4 Характеристика используемых веществ

Исследовали два пептида, являющихся структурными аналогами эндогенных опиоидных пептидов:

1. Даларгин [Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg] – синтетический аналог лей-энкефалина, неселективный  $\delta$ -/ $\mu$ -агонист ОР с преимущественной  $\delta$ -опиоидной активностью (Смагин В.Г. и соавт., 1983; Wollemann M. et al., 1990; Зайцев С.В. и соавт., 1993). В молекуле пептида произведена замена аминокислоты Gly на D-Ala, что значительно увеличило стабильность молекулы и обеспечило ее энзимостойчивость (Смагин В.Г. и соавт., 1983; Зайцев С.В. и соавт., 1993). В обычных дозировках (до 1 мг/кг) даларгин не проникает через гематоэнцефалический барьер, благодаря наличию в С-положении аминокислоты аргинин (Виноградов В.А., Полонский В.М., 1986). Поэтому даларгин считают опиоидом периферического действия. Даларгин имеет широкое клиническое применение как противоязвенное средство, как компонент комплексной терапии в лечении облитерирующих заболеваний сосудов нижних конечностей, онкологических заболеваний (Слепушкин В.Д., Николаев А.А. 2004). Многочисленные показания к назначению даларгина обусловлены его антиоксидантными, антистрессорными, иммуномодулирующими, регенераторными свойствами (Бебякова Н.А. и соавт., 2011; Щепилова О.В. и соавт., 2008). Даларгин, являясь универсальным стресс-протектором (Шмаков А.Н. и соавт., 2012), представляет интерес для педиатров и неонатологов. Однако применение даларгина в педиатрической практике ограничено отсутствием экспериментальных подтверждений

безопасности применения пептида в ранние периоды онтогенеза (Шмаков А.Н. и соавт., 2012).

2. Неопиатный аналог лей-энкефалина гексапептид НАЛЭ [Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg]. НАЛЭ, как и даларгин, является аналогом лей-энкефалина, но не имеет аффинности к ОР из-за замены аминокислоты Tyr в N-концевом положении на аминокислоту Phe (Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., 1987; Ласукова Т.В. и соавт., 2004).

Оба исследуемых пептида характеризуются фланговым положением аминокислоты аргинин, что может способствовать ее высвобождению в процессе метаболизма пептидов (Исакова О.Л. и соавт., 1986) и повышению уровня оксида азота (Флейшман М.Ю. и соавт., 2004).

Пептиды для исследования были синтезированы лабораторией «Алмабион» (Россия). Среднее содержание пептидов в образцах составляло 98,6-98,8%.

## **2.5 Приготовление гистологических препаратов**

Сразу после эвтаназии у крыс извлекали печень, осушали с помощью фильтровальной бумаги, взвешивали на электронных весах. От левой боковой доли печени выделяли фрагмент ткани 0,5 x 0,5 x 0,5 см<sup>3</sup>. Фиксировали в жидкости Карнуа, которую считают одним из лучших фиксаторов для ядер клеток (Коржевский Д.Э., 2010), в течение 3-4 часов, затем промывали в двух порциях 96 % спирта, оставляли на хранение в 70% спирте при температуре 4°C. Обезжиривание в батарее восходящих спиртов и растворителей, заключение в парафин осуществляли по общепринятой методике. С помощью микротомы «Leica» готовили срезы толщиной 5-6 мкм. Срезы монтировали на обезжиренные предметные стекла.

## 2.6 Приготовление цитологических препаратов изолированных гепатоцитов

Цитологические препараты изолированных гепатоцитов готовили по методу щелочной диссоциации (Коган М.Е. и соавт., 1976) и по собственной методике (рац. предлож. № 2780). После извлечения печени производили выделение из ее левой боковой доли фрагмента размером  $1 \times 1 \times 0,5 \text{ см}^3$ .

Для приготовления суспензии изолированных гепатоцитов по методу щелочной диссоциации фиксировали фрагмент печени в течение 10 суток 10% формалином (рН 7,0). Затем промывали водным раствором КОН при комнатной температуре 16 часов и осторожно гомогенизировали стеклянной палочкой. Полученную густую суспензию промывали в избытке 0,1 М фосфатного буфера Зеренсена (рН 7,0) и центрифугировали 15 мин при  $t = 4^\circ \text{C}$  со скоростью 4000 оборотов/мин. После центрифугирования сливали надосадочную жидкость, а из полученного осадка готовили мазки. Мазки высушивали на воздухе при комнатной температуре не менее 20-30 минут, фиксировали 96% этанолом и производили окраску гематоксилином и эозином (рисунок 1).

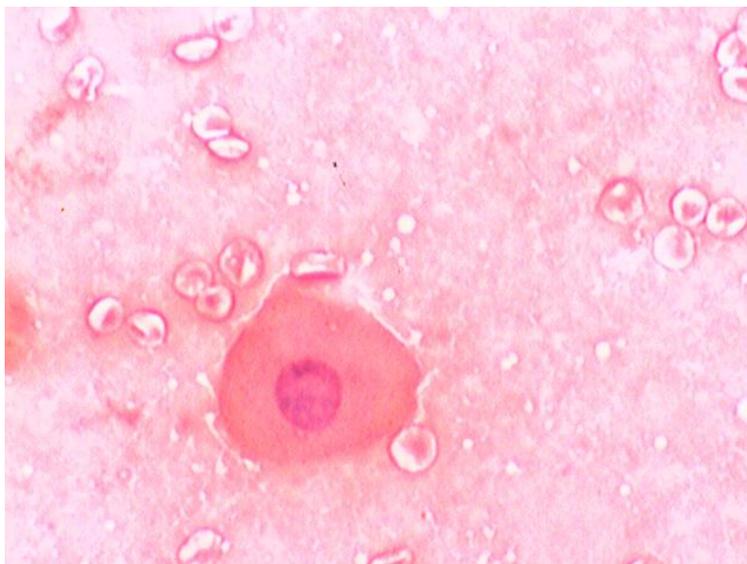


Рисунок 1 - Цитологический препарат изолированного гепатоцита 60 – суточной крысы, изготовленный по методу щелочной диссоциации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $100 \times 6,3$

Для приготовления суспензии изолированных гепатоцитов по собственной методике осуществляли имбибицию полученного фрагмента печени раствором Хенкса («Биолот», Россия) в объёме 1-2 мл с помощью шприца для вымывания эритроцитов из ткани печени. Проводили механическую дезагрегацию биоптата до кашицеобразного состояния. Смешивали полученную массу в количестве 1 мл с 2 мл раствора «Трипсин-Версена» («Биолот», Россия) и инкубировали на водяной бане в течение 15 мин при  $t = 38-39^{\circ} \text{C}$ , периодически встряхивая. Далее проводили инактивацию трипсина с помощью 0,5 мл сыворотки крупного рогатого скота. Полученную клеточную суспензию центрифугировали 15 мин при  $t = 4^{\circ} \text{C}$  со скоростью 4000 оборотов/мин. После центрифугирования сливали надосадочную жидкость, а из полученного осадка делали мазки. Мазки высушивали на воздухе при комнатной температуре не менее 20-30 минут, фиксировали 96% этанолом и производили окраску  $\text{AgNO}_3$  и гематоксилином и эозином (рисунок 2).

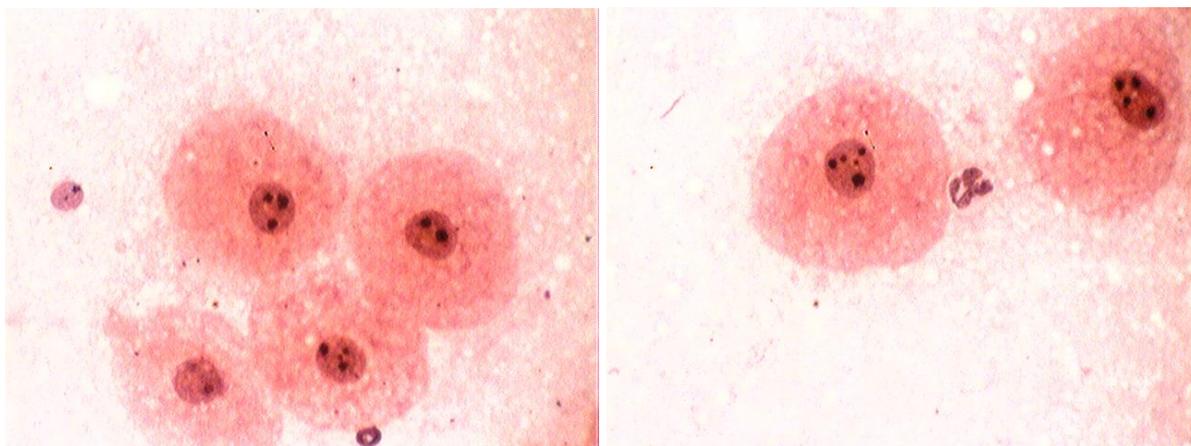


Рисунок 2 - Цитологические препараты изолированных гепатоцитов 60 – суточной крысы, изготовленные с помощью трипсинизации ткани. Окраска гематоксилином и эозином и методом  $\text{AgNORs}$ . Увеличение  $100 \times 6,3$

## 2.7 Морфометрическое исследование гепатоцитов

На препаратах мазков гепатоцитов оценивали морфометрические показатели клеток с помощью анализатора изображения МЕКОС-Ц в

полуавтоматическом режиме при увеличении 100х6,3. Измеряли площадь клетки, площадь ядра и суммарную площадь ядрышек гепатоцитов, оценивали ядерно-цитоплазматическое соотношение путем просмотра не менее 50 клеток, а также рассчитывали процентное соотношение одноядерных и многоядерных гепатоцитов.

Кариометрия и цитометрия позволяют косвенно оценить уровень полиплидизации гепатоцитов по размеру клеток и их ядер (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981; Завадская Е.Э., 1989). По данным В.Я. Бродского, И.В. Урываевой (1981) печень млекопитающих является примером адекватной оценки полиплоидии по размеру ядра. При этом объем, сухой вес и содержание белка в клетке возрастают пропорционально увеличению ее плоидности как в условиях нормы, так и при патологии (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981; Завадская Е.Э., 1989). Диаметр ядер гепатоцитов указывает на активность внутриядерного метаболизма (Автандилов Г.Г., 1990). Число и средняя суммарная площадь ядрышек отражают уровень белок-синтетической активности в интерфазных клетках (Коржевский Д.Э., 2010). По данным О.Е. Фроловой (1998) количество и размер ядрышек морфологически отражают процессы транскрипции рибосомальных генов в клетке. Установлено, что суммарная площадь ядрышек хорошо коррелирует с числом и суммарной площадью гранул, а также с активностью РНК-полимеразы I и с количеством аргентофильных белков в ядрышках (Derenzini et al., 1992; 2000; Коржевский Д.Э., 2010).

Доля двуядерных гепатоцитов отражает выраженность ацитокинетической активности гепатоцитов, как формы внутриклеточной регенерации и резерва полиплоидизации (Саркисов Д.С., 1987; Margall-Ducos G. et al., 2007). Долю двуядерных гепатоцитов в популяции клеток подсчитывали с помощью микроскопа «Биолам» при увеличении объектив х 40, окуляр х 6,3 и выражали в процентах. Просматривали не менее 200 клеток.

## 2.8 Исследование ДНК-синтетической активности гепатоцитов методом автордиографии

ДНК-синтетическую активность гепатоцитов анализировали с помощью метода автордиографии с  $^3\text{H}$ -тимидином. Этот метод является одним из наиболее объективных и точных способов оценки процессов регенерации в тканях (Епифанова О.И., 1969; Андреева Л.Ф., 1983; Scholzen T., Gerdes J., 2000). Выявляются ядра клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла.

7-суточным животным за 1 ч до эвтаназии вводили  $^3\text{H}$ -тимидин в дозе 1 мкКи/г массы тела (удельная активность 84 Ки/моль). Обработанные с помощью стандартной гистологической процедуры срезы ткани помещали на предметные стекла, депарафинировали и покрывали ядерной фотоэмульсией Ilford (Великобритания). После инкубации в течение 28 суток, радиоавтографы проявляли рентгеновским проявителем, фиксировали в 33% растворе гипосульфита натрия и окрашивали гематоксилином и эозином.

ДНК-синтетическую активность оценивали путем подсчета индекса меченых ядер (ИМЯ) и интенсивности метки (ИМ). Мечеными считали ядра, над которыми выявлялось пять или более треков (рисунок 3). ИМЯ определяли, как отношение количества ядер, меченных  $^3\text{H}$ -тимидином, к общему количеству ядер, выраженное в процентах. Подсчитывали ИМЯ путем просмотра 10 000 ядер гепатоцитов.

ИМ оценивали, как среднее число треков над ДНК-синтезирующим ядром, рассчитывая на основании подсчета треков серебра над 50 ядрами. По величине ИМ можно косвенно судить о скорости ДНК-синтетических процессов (Саркисов Д.С. и соавт., 1983).

Подсчет меченных  $^3\text{H}$ -тимидином ядер осуществляли на микроскопе Jenalumar: объектив 100x, окуляры x 6,3.

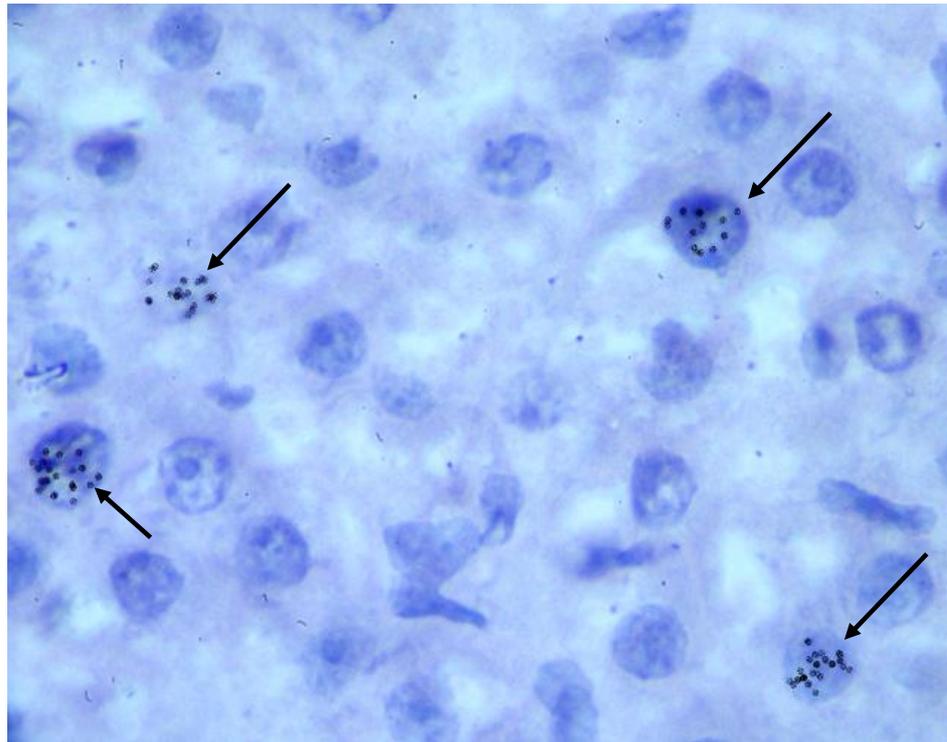


Рисунок 3 - Радиоавтограф печени 7-суточной белой крысы. Стрелками отмечены ядра гепатоцитов в S-фазе клеточного цикла. Увеличение 100х6,3

## 2.9 Окраска зон ядрышкового организатора методом AgNOR

Метод AgNOR применяют для селективного выявления ядрышек путем импрегнации серебром белков, ассоциированных с ядрышкообразующими районами хромосом (ЯОР). По данным Н.Н. Мамаева, С.Е. Мамаевой (1992), ЯОР – это специализированные участки генома, кодирующие рибосомную РНК. В ядрышках интерфазных клеток серебрению подвергаются несколько ассоциированных с ЯОР кислых белков, таких как нуклеолин, полимеразы-1, топоизомеразы-1, P80, P105, C23, B23, P100 (Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е., 1992; Коржевский Д.Э., 2010; Derenzini M., 2000). Специфичность связывания ионов серебра с кислыми негистоновыми фосфопротеинами позволяет отнести методику AgNOR к разряду гистохимических.

Изучение зон ЯОР, выявляемых методом AgNOR, дает возможность оценить готовность клеток к синтезу 18S и 28S-классов рибосомальной РНК,

имеющих непосредственное отношение к синтезу белка (Derenzini M., 2000). Аргентофильность ядрышек относится к легко воспроизводимой, высокочувствительной и точной количественной характеристике клетки, которая быстро реагирует на изменения ее функционального состояния (Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е., 1992). Параметры ядрышкового аппарата могут быть показателем гипертрофических изменений в клетке, происходящих в норме и при патологии (Штейн Г.И. и соавт., 1999). Число ядрышек в ядре и суммарный объем ядрышек коррелирует с изменением содержания общего белка в гепатоцитах (Штейн Г.И. и соавт., 1999).

В работе использовали методику импрегнации срезов  $\text{AgNO}_3$ , описанную в работах Н.Н. Мамаева и соавт. (1989) и Д.Э. Коржевского (2010). Гистологические срезы печени 7-суточных животных депарафинировали, выдерживали в 1% растворе муравьиной кислоты 20 минут, затем в бидистиллированной воде 10 мин. Готовили гель из смеси 1 части желатины, приготовленной на 1% водном растворе муравьиной кислоты, и 2 частей 50% водного раствора нитрата серебра. Сразу же наносили готовый гель на окрашиваемые препараты и покрывали их покровным стеклом. Выдерживали 20 мин в термостате при  $37^\circ\text{C}$ , промывали в двух порциях дистиллированной воды, обезвоживали в спиртах восходящей крепости, просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам. Аналогичным образом проводили окрашивание  $\text{AgNO}_3$  цитологических препаратов изолированных гепатоцитов.

С помощью микроскопа Jenalumar при увеличении объектив  $\times 100$ , окуляр  $\times 6,3$  подсчитывали среднее количество аргентофильных зон ЯОР на основании просмотра не менее 200 ядер (рисунок 4). Также измеряли суммарную площадь ядрышек на анализаторе изображения МЕКОС-Ц путем просмотра 50 клеток.

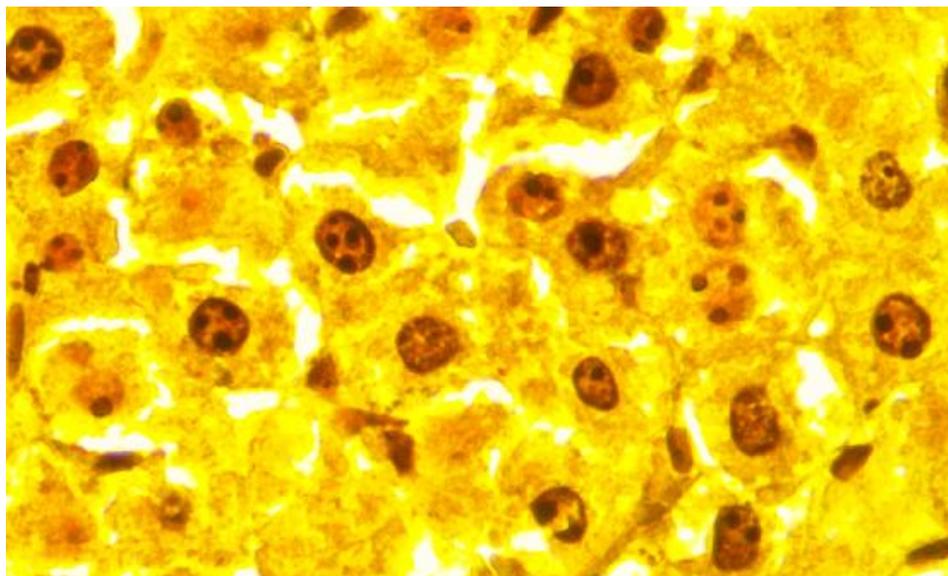


Рисунок 4 - Гистологический препарат печени 7-суточной белой крысы, окрашенный по методу AgNOR. Увеличение 100х6,3

## **2.10 Анализ свободнорадикального окисления методом хемилюминесценции**

Для оценки процессов свободнорадикального окисления использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ). Исследованию подвергали гомогенаты печени 7-суточных и 60-суточных животных, а также сыворотку крови 60-суточных животных. Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER». Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы "Finlab". ХМЛ-исследование свободнорадикального статуса включало определение параметров интенсивности спонтанного и активированного свечения (Арутюнян А.В., 2000; Владимиров Ю.А., 1991): S<sub>сп</sub> - светосумма за 1 минуту спонтанной ХМЛ, величина которой прямо коррелирует с интенсивностью процессинга свободных радикалов; H1 - максимум амплитуды быстрой вспышки Fe<sup>2+</sup>-индуцированного свечения, свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов; Синд-1 - светосумма за 2 минуты Fe<sup>2+</sup>-индуцированной ХМЛ, отражающую скорость образования перекисных радикалов; H2 - максимум

амплитуды  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного люминол-зависимого свечения, величина которого обратно коррелирует с перекисной резистентностью субстрата; Синд-2 – светосумма за 2 минуты  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированной люминол-зависимой ХМЛ, величина которой обратно коррелирует с активностью антиоксидантной системы защиты. Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольтках, выражали в относительных единицах.

Хемилюминесцентный анализ был проведен при консультативном участии ведущего научного сотрудника Центральной научно-исследовательской лаборатории ДВГМУ, д.м.н. О.А. Лебедько.

### **2.11 Исследование биохимических показателей сыворотки крови подопытных животных**

Функциональное состояние печени оценивали по показателям активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ),  $\gamma$  - глутамилтрансферазы (ГГТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), а также определения концентрации общего билирубина сыворотки крови.

Сразу же после декапитации животных производили забор крови и путем центрифугирования отделяли сыворотку для дальнейшего исследования. Биохимические исследования проводили по общепринятым методикам (Меньшиков В.В., 1987) с помощью полуавтоматического анализатора отечественного производства «Виталон-400+» с использованием биохимических наборов «Витал» (Россия).

Аминотрансферазы катализируют обратимый перенос аминогруппы на  $\alpha$ -кетогутаровую кислоту. АЛТ и АСТ являются маркерами цитолиза гепатоцитов (Подымова С.Д., 2005). Активность трансфераз повышается при дисфункции печени, вызванной различными причинами, в том числе вирусным поражением и гепатотоксическими веществами. АЛТ и АСТ определяли кинетическим УФ-методом, показатели выражали в Е/л.

Фосфатазы – ферменты, отщепляющие фосфорную кислоту от органических эфирных соединений. Щелочная фосфатаза - ЩФ (фосфогидролаза моноэфиров фосфорной кислоты) содержится практически во всех тканях. Основной ее фракцией в сыворотке крови является фермент печеночного происхождения (Суринов Б.П. и соавт., 1974). Повышение активности фермента в сыворотке крови при заболеваниях печени и желчных путей связано с высвобождением ЩФ из поврежденных печеночных клеток и задержкой экскреции ЩФ с желчью, в результате чего фермент вновь поступает в кровоток (Подымова С.Д., 2005). Для определения ЩФ в сыворотке крови использовали кинетический метод, показатели выражали в Е/л.

Гамма-глутамилтрансфераза ( $\gamma$ -ГТФ) катализирует реакцию переноса  $\gamma$  - глутамилового остатка глутаминовой кислоты на акцепторный пептид или на L-аминокислоту. Фермент содержится во всех органах и изменение его активности используется для оценки нарушений белкового обмена. Несмотря на высокую активность  $\gamma$ -ГТФ в почках, определение активности в сыворотке крови проводят преимущественно для диагностики заболеваний печени. Повышение активности  $\gamma$ -ГТФ выявляется при гепатитах, при обтурации желчевыводящих путей, опухолях и метастазах в печень. Повышение активности  $\gamma$ -ГТФ происходит параллельно с повышением активности ЩФ, однако активность  $\gamma$ -ГТФ увеличивается раньше и держится на более высоких цифрах, чем ЩФ (Меньшиков В.В., 1987). Для определения  $\gamma$ -ГТФ использовали кинетический метод Зейца, показатели выражали в Е/л.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) - гликолитический фермент, катализирующий обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную. ЛДГ состоит из пяти изоферментов, которые представляют собой различные комбинации полипептидных цепей М- и Н- типов. Активность ЛДГ в сыворотке крови повышается при различных заболеваниях, в том числе и при повреждениях паренхимы печени. Наиболее специфичным для патологии печени является повышение активности четвертого и пятого изоферментов ЛДГ (Меньши-

ков В.В., 1987). ЛДГ сыворотки крови определяли кинетическим методом, показатели выражали в МЕ/л.

Общий билирубин - пигмент желто-красного цвета; представляет собой линейный тетрапиррол. Его большая часть в организме образуется в ретикулоэндотелиальной системе печени и селезенке в результате распада гемоглобина, миоглобина и цитохромов (Хазанов А.И., 1989). В числе причин гипербилирубинемии выделяют цирроз, опухоли печени, метастазы в печень, жировую дистрофию печени, гемолитические желтухи новорожденных и т.д. (Меньшиков В.В., 1987). Для определения билирубина использовали фотометрический тест с 2,4- дихлоранилином. Показатели выражали в мкмоль/л.

## **2.12 Иммуноферментное исследование активности аргиназы**

Аргиназа – фермент орнитинового цикла Кребса-Гензелейта, обладает абсолютной субстратной специфичностью, является важным сегментом цикла мочевины (Scibior D., Czczot H., 2004). Аргиназа в организме представлена в виде двух изоформ: аргиназа-I является печеночной формой и аргиназа-II является внепеченочной формой (Durante W. et al., 2007; Lahiri A. et al., 2010; Ryoo S. et al., 2011). Аргиназа-I характеризует детоксикационную функцию печени (Гречанина Е.Я., 2003; Висмонт А.Ф., Лобанок Л.М., 2011). Уровень аргиназы-I в сыворотке крови используют в качестве маркера ранних стадий повреждения печени. Причем аргиназа-I является более ранним и чувствительным маркером по сравнению с аминотрансферазами (Chrzanowska A. et al., 2009).

Материалом для исследования служила сыворотка крови белых крыс в объеме 0,5 мл. Определение содержания аргиназы-I проводили с помощью твердофазного иммуноферментного метода (набор Rat Arginase-I (ARG 1) ELISA kit), согласно протоколу фирмы-производителя реагентов «CUSABIO» (Япония). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на микропланшетном ридере BIO-RAD (Model 550, производства Японии) при длине волны 450 нм. Расчет проводился по программе Microplate Manager™,

версия 4,0. Программа разработана BIO-RAD laboratories. Результаты выражали в нг/мл.

### **2.13 Статистическая обработка данных**

Проводили проверку выборок на нормальность распределения. Затем, для каждой экспериментальной группы определяли среднее арифметическое значение показателя и стандартную ошибку средней ( $M \pm m$ ). Сравнение показателей контрольной и подопытной группы проводили по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными при  $p < 0,05$ . Для определения и исключения «выскакивающих» вариант в выборке использовали критерий Шовене и правило «трех сигм» (Сепетлиев Д.А., 1968). В случае, когда распределение значений переменных отличалось от нормального, использовали непараметрический критерий Манни-Уитни, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Для оценки характера распределения параметра использовали стандартный пакет программ Microsoft Office. Обработку результатов экспериментов проводили с помощью стандартной программы Statistica 10.0.

Всего в работе было использовано 587 животных.

### 3 СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

##### 3.1.1 Показатели состояния печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Воздействие антенатальной гипоксии (АНГ) приводило к статистически значимому снижению средней массы тела 7-суточных животных на 24,79% по сравнению с группой контроля: масса животных группы «Контроль» составила  $14,40 \pm 0,36$  г; показатель группы «Антенатальная гипоксия» -  $10,83 \pm 0,41^*$  г;  $p < 0,05$ . В литературе показано снижение массы тела у новорожденных крыс, перенесших острую гипоксию на 13,5 сутки антенатального онтогенеза, а также отставание этих животных в ежесуточной прибавке массы тела в постнатальный период (Журавин И.А. и соавт., 2003). Ряд авторов (Савченков Ю.И., Лобынцев К.С., 1980; Gross J. et al., 1999; Li G. et al., 2003; Iqbal W., Ciriello J., 2013; Марковский В.Д. и соавт., 2015) отмечают снижение массы тела новорожденных крыс, подвергнутых внутриутробной гипоксии. Работами сотрудников нашей лаборатории также было показано, что хроническая АНГ индуцирует снижение массы тела у новорожденных крыс на протяжении всего периода новорожденности: в 1, 2, 5 и 7 сутки после рождения (Уткина Л.И., Тимошин С.С., 1990, 1991; Крыжановская С.Ю., 2008).

При анализе абсолютной массы печени у подопытных 7-суточных животных нами было зарегистрировано достоверное снижение показателя на 19,21% (таблица 1). При этом мы не выявили достоверного изменения относительной массы печени у этих животных. По данным W. Iqbal., J. Ciriello (2013) хроническая перемежающаяся гипоксия на протяжении всего периода беременности приводит к снижению относительной массы печени у 1-суточного потомства

крыс. У 2-суточных крыс, перенесших АНГ, Л.И. Уткина, С.С.Тимошин (1990, 1991), выявили увеличение абсолютной и относительной массы печени, обусловленное возрастанием объема кроветворных очагов на фоне уменьшения количества паренхиматозных элементов. Отличия в полученных экспериментальных данных, возможно, обусловлены различиями в организации экспериментов, а именно, сроков и длительности гипоксического воздействия, возраста экспериментальных животных.

Таблица 1 - Морфологические показатели печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Показатель	Контроль (n=15)	Антенатальная гипоксия (n=15)
Абсолютная масса печени, мг	420,56±20,76	339,78±18,00*
Относительная масса печени, % от массы тела	2,89±0,11	3,15±0,13
Индекс меченных <sup>3</sup> Н-тимидином ядер (ИМЯ), %	2,37±0,44	1,34±0,26*
Интенсивность метки (ИМ)	10,78±0,50	10,39±0,57
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,07±0,04	1,86±0,06*

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

В литературе описан структурный дефицит жизненно важных органов крыс, перенесших АНГ. J.E. Schwartz et al. (1998) показали снижение массы сердца, почек, легких, кишечника, мозга и печени у плодов крыс, подвергнутых внутриутробной гипоксии. В.Д. Марковский и соавт. (2015) обнаружили, что хроническая внутриутробная гипоксия приводит к снижению массы почек у плодов и новорожденных крыс. Е.Н. Сазоновой и соавт. (2011а), А.А. Симанковой и соавт. (2014) показано снижение массы мозга у 1- и 7-суточных крыс, перенесших АНГ с 15 по 19 сутки гестации. В исследованиях С.И. Зубенко и соавт. (2014) у 1-суточных крыс, подвергнутых антенатальному гипоксическому

воздействию, выявлено достоверное уменьшение абсолютной и относительной массы сердца. Таким образом, АНГ оказывает негативное влияние на гравиметрические показатели жизненно важных органов новорожденных животных.

Для анализа механизмов снижения массы печени у подопытных 7-суточных животных, мы изучали показатели пролиферативной активности гепатоцитов. О пролиферативной активности гепатоцитов новорожденных крыс судили при помощи автордиографии с  $^3\text{H}$ -тимидином. Было зарегистрировано значительное, в 1,77 раза, снижение показателя ИМЯ (таблица 1), что свидетельствует о существенном уменьшении пула ДНК-синтезирующих гепатоцитов. При этом ИМ, косвенно характеризующая скорость ДНК-синтетических процессов, оставалась без изменений. Таким образом, АНГ снижает пролиферативную активность гепатоцитов подопытных животных в раннем постнатальном периоде.

В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории ранее, было зарегистрировано достоверное уменьшение митотического индекса гепатоцитов, снижение числа гепатоцитов, переходящих из  $G_1$ -фазы в S-период и снижение показателей ИМЯ и ИМ у новорожденных крыс, перенесших АНГ на 5-6 сутки внутриутробного развития (Уткина Л.И., Тимошин С.С., 1990, 1991). Кроме того, в печени новорожденных крыс, перенесших АНГ, авторы отмечали трехкратное увеличение количества патологических митозов, появление грубых стойких форм такой патологии, как «мосты», многополюсные митозы (Уткина Л.И., Тимошин С.С. 1991).

Следовательно, можно говорить о выраженном негативном влиянии АНГ на пролиферативную активность гепатоцитов. Нарушение гиперпластического роста печени в раннем постнатальном периоде у млекопитающих, по видимому, может быть причиной некомпенсируемого структурного дефицита, поскольку базовое становление структуры печени происходит именно в ранние возрастные периоды (Шалахметова Т.М. и соавт., 1998).

Ткань печени способна не только к гиперпластическому, но и гипертрофическому росту. Полиплоидизация и гипертрофия гепатоцитов являются важ-

ными компонентами формирования структурного резерва органа (Саркисов Д.С. и соавт., 1987; Кудрявцев и соавт., 1993; Melchiorri et al., 1993). Мы выявили снижение на 10,1% среднего показателя количества ядрышек в ядрах гепатоцитов 7-суточных животных (таблица 1), перенесших АНГ, что может свидетельствовать об уменьшении активности белок-синтетических процессов.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о подавлении пролиферативной и анаболической активности гепатоцитов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию.

Структурные нарушения в печени новорожденных белых крыс, подвергнутых АНГ, сопровождались выраженными изменениями процессов свободно-радикального окисления (СРО) на органном уровне (таблица 2).

Анализ ХМЛ-показателей гомогенатов печени 7-суточных животных продемонстрировал, что антенатальная гипоксия интенсифицировала СРО в исследуемой ткани. Светосумма за 1 минуту спонтанной ХМЛ (величина  $S_{sp}$ ) возросла в 1,89 раза по сравнению с контролем. Повышение показателя  $S_{sp}$  свидетельствует об интенсификации образования АКМ. Значительный вклад в этот процесс вносит активация перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует увеличение концентрации гидроперекисей в 1,79 раза (амплитуда  $H1$ ) и ускорение образования перекисных радикалов в 2,22 раза (величина  $S_{ind}$  1). Выявленные нарушения свободнорадикального статуса обусловлены ослаблением антиоксидантной защиты и снижением резистентности к перекисному окислению. Об этом свидетельствует возрастание в 2,35 раза светосуммы за 2 минуты ХМЛ, инициированной  $H_2O_2$  в присутствии люминола ( $S_{ind}$  2) и увеличение в 2,47 раза максимума быстрой вспышки ХМЛ, индуцированной перекисью водорода в присутствии люминола (амплитуда  $H2$ ). Подобные изменения свободнорадикального статуса расцениваются как наличие окислительного стресса на органном уровне.

Таблица 2 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Параметр		Контроль (n=15)	Антенатальная гипоксия (n=15)
Ссп (отн. ед)		1,14±0,09	2,16±0,20*
Инд. ХМЛ (Fe <sup>2+</sup> )	Н1 (отн.ед)	1,05±0,07	1,88±0,14*
	Синд 1 (отн.ед)	2,34±0,13	5,19±0,46*
Инд. ХМЛ (люминол-Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> )	Н2 (отн.ед)	1,95±0,15	4,82±0,42*
	Синд 2 (отн.ед)	2,12±0,20	5,00±0,46*

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю

Ранее Л.И. Уткина, С.С. Тимошин (1991) зарегистрировали интенсификацию процессов ПОЛ в печени 2-суточных крыс, перенесших АНГ на ранних сроках онтогенеза. У животных экспериментальной группы было выявлено увеличение концентрации малонового диальдегида (Уткина Л.И., Тимошин С.С., 1991). АНГ уменьшает активность супероксиддисмутазы (СОД) в печени плодов крыс. В результате, чрезмерная активация образования АКМ при гипоксии может привести к повреждению мембран, деструкции ферментов, нарушению синтеза ДНК и клеточного деления (Уткина Л.И., Тимошин С.С., 1991; Song W. et al., 1999).

В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, было показано наличие выраженного окислительного стресса у новорожденных крыс, перенесших АНГ, на различных уровнях: клеточном, тканевом и на уровне организма в целом. Например, работами Е.Н. Сазоновой и соавт., (2012) продемонстрировано повышение генерации супероксид-аниона на 80% в культуре пульмональных фибробластов, полученных от 2-суточных крыс, подвергнутых АНГ.

Таким образом, морфологические изменения печени новорожденных белых крыс, перенесших АНГ, сопровождаются интенсификацией процессов СРО. Необходимо отметить, что изменения показателей ХМЛ были выявлены нами у 7-суточных животных, то есть спустя 10 суток после последнего гипоксического воздействия. Это свидетельствует о том, что повреждающее действие АНГ не заканчивается после прекращения кислородной депривации, а продолжает разворачиваться еще длительный период.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном повреждающем влиянии АНГ на печень в раннем постнатальном периоде. Зарегистрированное у подопытных животных снижение абсолютной массы органа, подавление ДНК-синтетической активности гепатоцитов, уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов отражает развитие структурного дефицита печени. Наряду с выраженным окислительным стрессом на органном уровне, это может привести к ухудшению функционирования органа, истощению компенсаторных механизмов в печени новорожденных млекопитающих, перенесших АНГ.

### **3.1.2 Показатели состояния печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии**

Структура печени млекопитающих преимущественно формируется в раннем постнатальном периоде. После перехода на дефинитивное питание ДНК-синтетические процессы в печени крыс практически прекращаются (Guidotti J.E. et al., 2003). Поэтому окислительный стресс, нарушение анаболической и пролиферативной активности гепатоцитов в ранние периоды онтогенеза могут иметь долгосрочные последствия для состояния печени.

Мы анализировали соматометрические показатели 60-суточных крыс-самцов, перенесших АНГ в период с 14 по 19 сутки гестации. Измеряли массу

тела, абсолютную и относительную массу печени. Контролем служили 60-суточные крысы-самцы, не подвергавшиеся антенатальной гипоксии.

У 60-суточных животных, перенесших АНГ, мы зарегистрировали снижение массы тела, по сравнению с контролем: контрольный показатель составил  $147,14 \pm 5,54$  г; показатель подопытной группы -  $132,89 \pm 3,96^*$ ;  $p < 0,05$ . По данным литературы снижение массы тела белых крыс, подвергнутых гипоксическому воздействию в антенатальном периоде, регистрируется преимущественно в течение первого месяца жизни, а в последующие возрастные периоды происходит нивелирование отличий между контрольными и подопытными животными по показателю массы тела (Журавин И.А. и соавт., 2003). В работах А.С. Ивановой (2014) зарегистрировано выраженное снижение массы тела 15-суточных крыс, развивавшихся в условиях хронического нарушения маточно-плацентарного кровообращения; на 30-й день постнатального развития животных отличия по массе между группой контроля и подопытной группой нивелировались.

Однако, в ранее проведенных в нашей лаборатории исследованиях (Сазонова Е.Н. и соавт., 2011b) было зарегистрировано снижение массы тела 60-суточных белых крыс, подвергнутых АНГ. Причем эти изменения были выявлены не только в подгруппе самцов, но и в подгруппе самок.

Полученные нами результаты указывают на длительное (до периода полового созревания) нарушение соматометрических показателей у экспериментальных животных, подвергнутых антенатальной гипоксии.

При анализе абсолютной и относительной массы печени 60-суточных крыс-самцов, перенесших АНГ, мы зарегистрировали уменьшение средних показателей по отношению к контрольным параметрам на 15,39% и 4,7%, соответственно (таблица 3).

Таблица 3 - Морфологические показатели печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Показатель	Контроль (n=21)	Антенатальная гипоксия (n=19)
Абсолютная масса печени, мг	5682,86±278,21	4808,42±139,41*
Относительная масса печени, % от массы тела	3,82±0,07	3,65±0,03*
Площадь гепатоцитов, кв. мкм	1394,84±82,41	1109,63±66,70*
Площадь ядер гепатоцитов, кв. мкм	192,58±13,62	161,51±5,88*
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	3,27±0,08	2,88±0,13*
Суммарная площадь ядрышек гепатоцитов, кв. мкм	7,42±0,34	5,95±0,29*
Доля двуядерных гепатоцитов в популяции клеток, %	23,13±1,85	34,44±3,76*

Примечания - 1) \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; 2) в этой серии экспериментов использовали рандомбредных белых крыс, приготовление суспензии изолированных гепатоцитов осуществляли по методу щелочной диссоциации.

Данные литературы об отдаленных влияниях АНГ на показатели массы жизненно важных органов белых крыс немногочисленны. Ю.И. Савченков, К.С. Лобынцев (1980) выявили снижение массы почек у 30-суточных животных подвергнутых внутриутробной гипоксии. Работами сотрудников нашей лаборатории были показаны существенные изменения массы мозга и сердца у половозрелых животных, перенесших хроническую АНГ. Е.Н. Сазонова и соавт., (2011а) зарегистрировали достоверное снижение абсолютной массы мозга у 60-суточных крыс по сравнению с контролем. С.И. Зубенко и соавт., (2014) выявили достоверное снижение абсолютной и относительной массы сердца у 60-суточных самцов крыс, перенесших АНГ.

Для анализа белок-синтетических процессов в гепатоцитах подопытных животных, мы оценивали состояние ядрышкового аппарата клеток на гистологических препаратах печени, окрашенных азотнокислым серебром. Мы выявили снижение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов на 11,9% и уменьшение средней суммарной площади ядрышек на 19,85% у 60-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию (таблица 3). Это свидетельствует в пользу снижения белок-синтетической активности гепатоцитов подопытных животных (Штейн Г.И. и соавт., 1999). Кроме того, возможно, уменьшение числа ядрышек в ядре отражает снижение плоидности гепатоцитов (Штейн Г.И. и соавт., 1999).

При морфометрическом анализе изолированных гепатоцитов 60-суточных животных, перенесших АНГ, мы выявили уменьшение среднего показателя площади клеток на 20,45% и снижение среднего показателя площади ядер гепатоцитов на 16,13% , по сравнению с контролем (таблица 3). Площадь гепатоцитов и размер их ядер, являются косвенными показателями уровня полиплоидизации гепатоцитов (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981; Завадская Е.Э., 1989). Кроме того, наблюдается четкая корреляция между размерами гепатоцитов и содержанием в них гликогена (Безбородкина Н.Н. и соавт., 2009). По-видимому, полученные нами данные можно трактовать, как низкий уровень полиплоидизации гепатоцитов подопытных животных, перенесших антенатальную гипоксию.

В мазках изолированных гепатоцитов 60-суточных белых крыс, перенесших АНГ, мы зарегистрировали достоверно большее количество двуядерных клеток. Показатель доли двуядерных гепатоцитов у половозрелых животных подопытной группы был существенно (на 48,9%) выше показателей группы контроля. Необходимо отметить, что доля двуядерных гепатоцитов в контрольной группе соответствовала данным литературы (Безбородкина Н.Н. и соавт. 2009). Полученные нами данные об увеличении количества двуядерных гепатоцитов у 60-суточных животных, перенесших АНГ, возможно, свидетельствуют о нарушении процесса цитокинеза. Вместе с тем, возрастание количества дву-

ядерных гепатоцитов у 60-суточных животных, перенесших АНГ, может быть компенсаторной реакцией, направленной на сохранение функционирования органа в условиях структурного дефицита. По данным Д.С. Саркисова (1987), индекс двуядерных гепатоцитов показывает выраженность ацитокинетической активности гепатоцитов, как формы внутриклеточной регенерации и резерва полиплоидизации.

Выявленное нами снижение абсолютной и относительной массы органа, уменьшение размеров гепатоцитов и их ядер, снижение количества ядрышек, уменьшение суммарной площади ядрышек, увеличение показателя доли двуядерных гепатоцитов в популяции клеток печени подопытной группы свидетельствуют о существенных структурных нарушениях в печени 60-суточных крыс-самцов, перенесших АНГ. По-видимому, можно говорить о нарушении динамики программированного онтогенетического процесса полиплоидизации гепатоцитов (Guidotti J.E. et al., 2003).

Морфологические изменения в печени у 60-суточных животных, перенесших АНГ, сопровождались выраженным окислительным стрессом, как на органном уровне, так и на уровне организма в целом. Анализ ХМЛ-показателей гомогенатов печени 60-суточных животных (таблица 4) продемонстрировал, что АНГ интенсифицировала СРО в исследуемой ткани. Светосумма за 1 минуту спонтанной ХМЛ (величина  $S_{sp}$ ) возросла в 2,69 раза по сравнению с контролем. Повышение показателя  $S_{sp}$  свидетельствует об интенсификации образования АКМ. Значительный вклад в этот процесс вносит активация ПОЛ, о чем свидетельствует увеличение концентрации гидроперекисей в 2,78 раза (амплитуда  $H_1$ ) и ускорение образования перекисных радикалов в 2,03 раза (величина  $S_{инд 1}$ ). Выявленные нарушения свободнорадикального статуса обусловлены ослаблением антиоксидантной защиты и снижением резистентности к перекисному окислению. Об этом свидетельствует возрастание в 2,43 раза светосуммы за 2 минуты ХМЛ, инициированной  $H_2O_2$  в присутствии люминола ( $S_{инд 2}$ ) и увеличение в 2,88 раза максимума быстрой вспышки ХМЛ, индуци-

рованной перекисью водорода в присутствии люминола (амплитуда H2). Подобные изменения свободнорадикального статуса расцениваются как наличие окислительного стресса на органном уровне.

Таблица 4 - Показатели хемилюминесценции гомогенатов печени 60-суточных самцов крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Параметр		Контроль (n=11)	Антенатальная гипоксия (n=9)
Scп (отн. ед)		1,84±0,29	4,94±0,48 *
Инд. ХМЛ (Fe <sup>2+</sup> )	Синд 1 (отн.ед.)	5,20±0,86	10,55±1,16*
	H1 (отн. ед.)	1,93±0,26	5,37±0,61*
Инд. ХМЛ (люминол H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Синд 2 (отн.ед.)	10,26±1,87	24,94±3,71*
	H2 (отн. ед.)	5,88±0,97	16,90±1,83*

Примечание - \* - p < 0,05 по отношению к группе «Контроль»

При ХМЛ-анализе сыворотки крови 60-суточных животных, перенесших АНГ, мы зарегистрировали достоверную активацию процессов ПОЛ и ослабление антиоксидантной защиты (таблица 5): об этом свидетельствовало возрастание величины спонтанной ХМЛ (Scп) в 2,58 раза, увеличение концентрации гидроперекисей липидов (амплитуда H1 возросла в 3,43 раза) и ускорение образования перекисных радикалов (величина Синд 1 возросла в 2,47 раза). Данные нарушения свободнорадикального статуса обусловлены ослаблением АОЗ (величина Синд 2 возросла в 2,84 раза) и снижением резистентности к перекисно-му окислению (амплитуда H2 увеличилась в 2,27 раза).

Таблица 5 - Показатели хемилюминесценции сыворотки крови 60-суточных самцов крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Параметр		Контроль (n=11)	Антенатальная гипоксия (n=11)
Scп (отн. ед)		0,19±0,02	0,49±0,03*
Инд. ХМЛ (Fe <sup>2+</sup> )	Синд 1 (отн.ед.)	0,47±0,03	1,16±0,07*
	Н1 (отн. ед.)	0,14±0,01	0,48±0,02*
Инд. ХМЛ (люминол Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> )	Синд 2 (отн.ед.)	2,01±0,15	5,70±0,39*
	Н2 (отн. ед.)	1,75±0,09	3,93±0,28 *

Примечание - \* - p < 0,05 по отношению к группе «Контроль»

Мы провели анализ биохимических параметров, косвенно характеризующих функцию печени у подопытных животных. Функциональное состояние гепатоцитов оценивали с помощью следующих показателей сыворотки крови: активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ),  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), а также определения концентрации общего билирубина. Мы не выявили статистически значимых изменений биохимических показателей в сыворотке крови 60-суточных животных, перенесших АНГ (таблица 6).

Таблица 6 - Биохимические показатели сыворотки крови 60 суточных крыс-самцов, перенесших антенатальную гипоксию

Показатель	Контроль (n=10)	Антенатальная гипоксия (n=8)
АЛТ, Е/л.	58,19±6,74	66,49±15,1
АСТ, Е/л.	194,48±25,78	226,62±46,86
ГГТ, Е/л.	2,66±0,68	2,92±1,08
ЛДГ, МЕ/л	831,27±105,53	870,07±127,84
ЩФ, Е/л	234,48±62,98	219,81±70,71
Билирубин, мкмоль/л	0,62±0,05	0,48±0,06

Кроме того, мы провели иммуноферментное исследование активности аргиназы-I с помощью иммуноферментного анализа. Уровень аргиназы-I в сыворотке крови используют в качестве маркера ранних стадий повреждения печени (Chrzanowska A. et al., 2009). Однако мы не выявили изменений активности аргиназы-I у подопытных животных. Так, в сыворотке крови животных группы «Контроль» уровень аргиназы-I составил  $0,667 \pm 0,35$  нг/мл, а группы «Аntenатальная гипоксия» средний показатель активности фермента был  $0,658 \pm 0,22$  нг/мл.

Таким образом, гипоксическое воздействие в антенатальном периоде имеет отдаленные структурные последствия для печени крыс и индуцирует развитие окислительного стресса, как на органном уровне, так и на уровне организма в целом. Эти отклонения способны привести к нарушению функциональной активности печени. Хотя мы не зарегистрировали выраженных изменений биохимических маркеров состояния печени у взрослых подопытных животных, перенесших АНГ, нельзя исключить возможность возникновения функциональной недостаточности гепатоцитов при патологических состояниях. Данный вопрос требует дальнейшего изучения.

### **3.2 Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению пептидов семейства опиоидов в раннем периоде постнатального онтогенеза**

На пролиферативную активность гепатоцитов оказывают влияние многие биологически активные вещества: эпидермальный фактор роста (Захаров В.Б. и соавт., 2005), NO (Mei Y., Thevananther S., 2011), интерлейкин-10 (Dinant S. et al., 2007), тиреоидные гормоны (Gujabidze N., Rukhadze R., 2006), трипептид Gly-His-Lys, АКТГ<sub>4-10</sub> (Смахтин М.Ю., 2004) и другие. В перинатальном периоде имеет место активация эндогенных стресс-лимитирующих пептидных систем организма и, в первую очередь, опиоидной системы (Набухотный Т.К. и соавт., 1992). Следовательно, можно предполагать существенное влияние

лигандов ОР на структурно-функциональные характеристики печени в раннем постнатальном периоде, когда пролиферативные процессы в печени млекопитающих протекают наиболее интенсивно.

Мы исследовали эффекты двух пептидов, отличающихся по аффинности к ОР. Оба пептида являются синтетическими аналогами эндогенного лиганда  $\delta$ -ОР лей-энкефалина и содержат аминокислоту аргинин во фланговом С-положении. Один из пептидов, даларгин, является неселективным  $\delta$ - $\mu$ -агонистом ОР. Другой пептид - неопиатный аналог лей-энкефалина – НАЛЭ, лишен аффинности к ОР. Исследуемые пептиды вводили новорожденным белым крысам с 2 по 6 сутки жизни в дозе 100 мкг/кг. Показатели состояния печени изучали на 7-е и 60-е сутки жизни.

### **3.2.1 Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению пептида даларгин в раннем периоде постнатального онтогенеза**

Пятикратное введение даларгина с 2 по 6 сутки жизни не влияло на гравиметрические показатели 7-суточных животных. Масса тела, абсолютная и относительная массы печени животных, подвергнутых пятикратному введению даларгина, не отличались от контрольных параметров (таблица 7).

Таблица 7 - Гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида даларгин с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	Даларгин (n=15)
Масса тела, г	14,40 $\pm$ 0,36	13,93 $\pm$ 0,31
Абсолютная масса печени, мг	420,56 $\pm$ 20,76	404,05 $\pm$ 15,57
Относительная масса печени, % от массы тела	2,88 $\pm$ 0,11	2,89 $\pm$ 0,08

Авторадиографическое исследование ДНК-синтетических процессов в ткани печени не выявило достоверных изменений пролиферативного пула гепатоцитов (ИМЯ) и скорости ДНК-синтетических процессов (показатель ИМ) после воздействия даларгина (таблица 8).

Исследование количества ядрышек в ядрах гепатоцитов выявило повышение среднего показателя на 15% после пятикратного воздействия даларгина (таблица 8). Аналогичные результаты были показаны нами при исследовании влияния неселективного  $\mu/\delta$ -агониста пептида седатин. Пятикратное воздействие седатина в раннем постнатальном периоде приводило к увеличению количества ядрышек в ядрах гепатоцитов на 13,6% (Пинаева О.Г. и соавт., 2014).

Таблица 8 - Морфологические показатели печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида даларгин с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	Даларгин (n=15)
Индекс меченных $^3\text{H}$ -тимидином ядер (ИМЯ), %	2,37 $\pm$ 0,44	2,63 $\pm$ 0,70
Интенсивность метки (ИМ)	10,78 $\pm$ 0,50	13,33 $\pm$ 1,66
Среднее количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,73 $\pm$ 0,04	3,14 $\pm$ 0,10*

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Таким образом, мы не выявили какого-либо негативного влияния введения даларгина на состояние новорожденных животных. Масса тела, масса печени, ДНК-синтетическая активность гепатоцитов подопытных животных не отличались от контрольных показателей. Выявленное достоверное увеличение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов 7-суточных животных, получавших даларгин, свидетельствует в пользу стимулирующего влияния исследуемого пептида даларгин на анаболические процессы в печени новорожденных белых крыс.

У 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых в раннем постнатальном периоде введению даларгина, мы также не выявили изменений массы тела и абсолютной массы печени (таблица 9). Вместе с тем, мы зарегистрировали снижение среднего показателя относительной массы печени на 8,45% у подопытных животных, по сравнению с группой контроля (таблица 9).

Таблица 9 - Гравиметрические показатели 60-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида даларгин с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	Даларгин (n=15)
Масса тела, г	192,46±6,69	196,39±5,04
Абсолютная масса печени, г	6,45±0,19	6,05±0,19
Относительная масса печени, % от массы тела	3,36±0,05	3,08±0,03*

Примечания - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»

Пятикратное неонатальное введение даларгина не оказало влияния на морфометрические показатели гепатоцитов 60-суточных животных. Оставались без изменений такие параметры, как площадь гепатоцитов, площадь ядер гепатоцитов, количество и суммарная площадь ядрышек гепатоцитов (таблица 10).

При этом у 60-суточных животных, подвергнутых с 2 по 6 сутки жизни введению даларгина, мы зарегистрировали увеличение доли двуядерных гепатоцитов в популяции клеток на 34,75% (таблица 10). Работами М.Ю. Смахина (2004) показано стимулирующее влияние специфического агониста  $\delta$ -ОР синтетического аналога энкефалинов пептида DSLET на физиологическую регенерацию печени за счет ацитокинетического типа деления гепатоцитов.

Таблица 10 - Морфологические показатели печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида даларгин с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	Даларгин (n=15)
Площадь гепатоцитов, кв. мкм	663,34±12,19	726,44±39,39
Площадь ядер гепатоцитов, кв. мкм	88,59±3,43	87,36±2,62
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,80±0,173	2,72±0,084
Суммарная площадь ядрышек гепатоцитов, кв. мкм	7,17±0,51	7,86±0,71
Доля двуядерных гепатоцитов в популяции клеток, %	19,75±2,40	34,75±1,92*

Примечания - 1) \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; 2) в этой серии экспериментов использовали белых крыс линии Вистар, приготовление суспензии изолированных гепатоцитов осуществляли с помощью трипсинизации

Таким образом, неонатальное введение неселективного  $\delta$ - $\mu$  - агониста ОР пептида даларгин приводило к стимуляции ядрышкового аппарата гепатоцитов у 7-суточных животных и увеличению количества двуядерных гепатоцитов у 60-суточных животных. Механизмы и физиологическое значение уменьшения относительной массы печени у 60-суточных животных подопытной группы требуют дальнейшего исследования. Возможно, это обусловлено выраженным антиоксидантным эффектом пептида. Физиологический окислительный стресс неонатального периода имеет определенное значение в адаптации к внеутробному существованию и воздействие мощного антиоксиданта в этот период может иметь отдаленные структурные последствия (Солин А.В., Ляшев Ю.Д., 2015).

### 3.2.2 Морфологические показатели печени белых крыс, подвергнутых введению неопиатного аналога лей-энкефалина в раннем периоде постнатального онтогенеза

В данной серии экспериментов мы изучали состояние печени крыс, получавших внутрибрюшинно неопиатный аналог лей-энкефалина – пептид НАЛЭ в дозе 100 мкг/кг веса с 2 по 6 день жизни. При изучении эффектов НАЛЭ на гравиметрические показатели 7-суточных животных, мы не обнаружили достоверных отличий от показателей контроля: масса тела, абсолютная и относительная масса печени подопытных животных не отличались от контрольных параметров (таблица 11).

Таблица 11 - Гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	НАЛЭ (n=15)
Масса тела, г	14,40 $\pm$ 0,36	14,03 $\pm$ 0,43
Абсолютная масса печени, мг	420,56 $\pm$ 20,76	423,89 $\pm$ 16,99
Относительная масса печени, % от массы тела	2,89 $\pm$ 0,11	2,98 $\pm$ 0,07

Анализ показателей синтеза ДНК в печени 7-суточных животных выявил, что число ядер, находящихся в синтетическом периоде цикла, и скорость ДНК-синтетических процессов после 5-кратного введения пептида НАЛЭ не изменялись, о чем свидетельствуют стабильные показатели ИМЯ и ИМ (таблица 12).

Пятикратное введение НАЛЭ также не вызывало изменений количества ядрышек в ядрах гепатоцитов, что косвенно свидетельствует об отсутствии изменений активности белок-синтетических процессов в клетке после воздействия пептида (таблица 12).

Таблица 12 - Морфологические показатели печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	НАЛЭ (n=15)
Индекс меченных <sup>3</sup> H-тимидином ядер (ИМЯ), %	2,37±0,44	2,05±0,41
Интенсивность метки (ИМ)	10,78±0,50	11,23±0,62
Среднее количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,73±0,04	2,64±0,09

Таким образом, пятикратное внутрибрюшинное введение пептида НАЛЭ в раннем постнатальном периоде онтогенеза не оказывало влияния на исследуемые морфологические показатели печени новорожденных белых крыс.

У 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых в раннем постнатальном периоде введению пептида НАЛЭ, мы также не выявили изменений гравиметрических показателей (таблица 13).

Таблица 13 - Гравиметрические показатели 60-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	НАЛЭ (n=15)
Масса тела, г	147,14±5,54	135,0±9,75
Абсолютная масса печени, мг	5682,86±278,21	5280,0±473,04
Относительная масса печени, % от массы тела	3,84±0,10	3,83±0,07

Статистически значимых отклонений от контроля количества ядрышек и их суммарной площади в ядрах гепатоцитов 60-суточных крыс-самцов подопытной группы также зарегистрировано не было (таблица 14).

При анализе морфометрических показателей гепатоцитов мы выявили, что неонатальное пятикратное введение НАЛЭ привело к изменениям размеров гепатоцитов и их ядер. Мы зарегистрировали увеличение средней площади

гепатоцитов на 35,5% и увеличение средней площади ядер гепатоцитов на 29,7% (таблица 14).

Таблица 14 - Морфологические показатели печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых введению пептида НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни

Показатель	Контроль (n=15)	НАЛЭ (n=15)
Площадь гепатоцитов, кв. мкм	1394,84±82,41	1889,30±169,94 *
Площадь ядер гепатоцитов, кв. мкм	192,58±13,62	249,85±24,97*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,137±0,006	0,148±0,006
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,01±0,08	1,97±0,06
Суммарная площадь ядрышек гепатоцитов, кв. мкм.	5,01±0,22	4,66±0,06
Доля двуядерных гепатоцитов в популяции клеток, %	23,13±1,85	29,71±1,34 *

Примечания - 1) \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; 2) в этой серии экспериментов использовали рандомбредных белых крыс, приготовление суспензии изолированных гепатоцитов осуществляли по методу щелочной диссоциации

Гипертрофия гепатоцитов, наряду с пролиферацией и полиплоидизацией, играет важную роль в нормальном и репаративном росте печени (Завадская Е.Э. и соавт., 1989; Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н., 2005). Гипертрофия гепатоцитов сопровождается увеличением их размера и может быть вызвана повышением ploидности клеток (Бродский В.Я., Урываева И.В., 1981; Завадская Е.Э., 1989) или увеличением размера их цитоплазмы, которое не связано с увеличением ploидности клеток и сопровождается уменьшением ядерно-цитоплазматического отношения. Ядерно-цитоплазматическое отношение гепатоцитов животных подопытной и контрольной групп не имело отличий (табли-

ца 14). Мы зарегистрировали достоверное повышение площади ядер гепатоцитов и увеличение доли двуядерных гепатоцитов на 28,5% (таблица 14). Вероятно, имеет место гипертрофия гепатоцитов, связанная с полиплоидизацией.

Таким образом, неонатальное (с 2 по 6 сутки жизни) введение пептида НАЛЭ не влияло на исследованные показатели тканевого гомеостаза печени 7-суточных белых крыс. У 60-суточных животных, подвергнутых в неонатальном периоде онтогенеза введению пептида НАЛЭ, имели место морфологические признаки усиления полиплоидизации и гипертрофии гепатоцитов.

В целом, можно отметить, что введение в неонатальном периоде пептидов семейства опиоидов, как имеющих аффинность к ОР (даларгин), так и не связывающихся с ОР (НАЛЭ) оказывало сходные эффекты, преимущественно, имеющие анаболическую направленность. Можно предположить, что выявленные эффекты исследуемых пептидов способны увеличить структурный резерв печени.

### **3.3 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептидов семейства опиоидов**

#### **3.3.1 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин**

##### **3.3.1.1 Влияние неонатального введения пептида даларгин на состояние печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии**

На данном этапе исследования мы проводили анализ индуцированных АНГ отклонений у 7-суточных крыс, получавших с 2 по 6 день жизни внутрибрюшинно даларгин в дозе 100 мкг на 1 кг веса.

Было сформировано 3 экспериментальные группы.

1 группа – «Контроль» - 7-суточные животные, не подвергавшиеся АНГ и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

2 группа – «Аntenатальная гипоксия» - 7-суточные животные, подвергнутые АНГ и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

3 группа – «Аntenатальная гипоксия+даларгин» - 7-суточные животные, подвергнутые АНГ и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневно внутрибрюшинное введение 100 мкг/кг пептида даларгин в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Пятикратное внутрибрюшинное введение даларгина в раннем постнатальном периоде полностью нивелировало отклонения гравиметрических параметров у животных, перенесших АНГ (таблица 15). Масса тела, абсолютная и относительная масса печени животных группы «Аntenатальная гипоксия+даларгин» не отличались от показателей группы «Контроль».

Таблица 15 - Гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин

Показатель	Контроль (n=12)	Аntenатальная гипоксия (n=12)	Аntenатальная гипоксия + даларгин (n=12)
Масса тела, г	16,07±0,61	10,83±0,91*	14,46±2,01
Абсолютная масса печени, мг	503,75±13,75	367,13±20,42*	512,86±54,06
Относительная масса печени, % от массы тела	3,16±0,12	3,46±0,15	3,70±0,19

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»

По результатам автордиографического исследования, введение даларгина новорожденным животным, подвергнутым АНГ, привело к нормализации пролиферативной активности гепатоцитов: показатель ИМЯ в исследуемой группе не отличался от группы контроля (таблица 16).

Введение даларгина также полностью нивелировало негативное влияние АНГ на количество ядрышек в ядрах гепатоцитов. Изучение ядрышкового организатора показало, что количество ядрышек, снижавшееся на фоне АНГ, после 5-кратного введения даларгина не имело статистически значимых отличий от показателя группы «Контроль» (таблица 16).

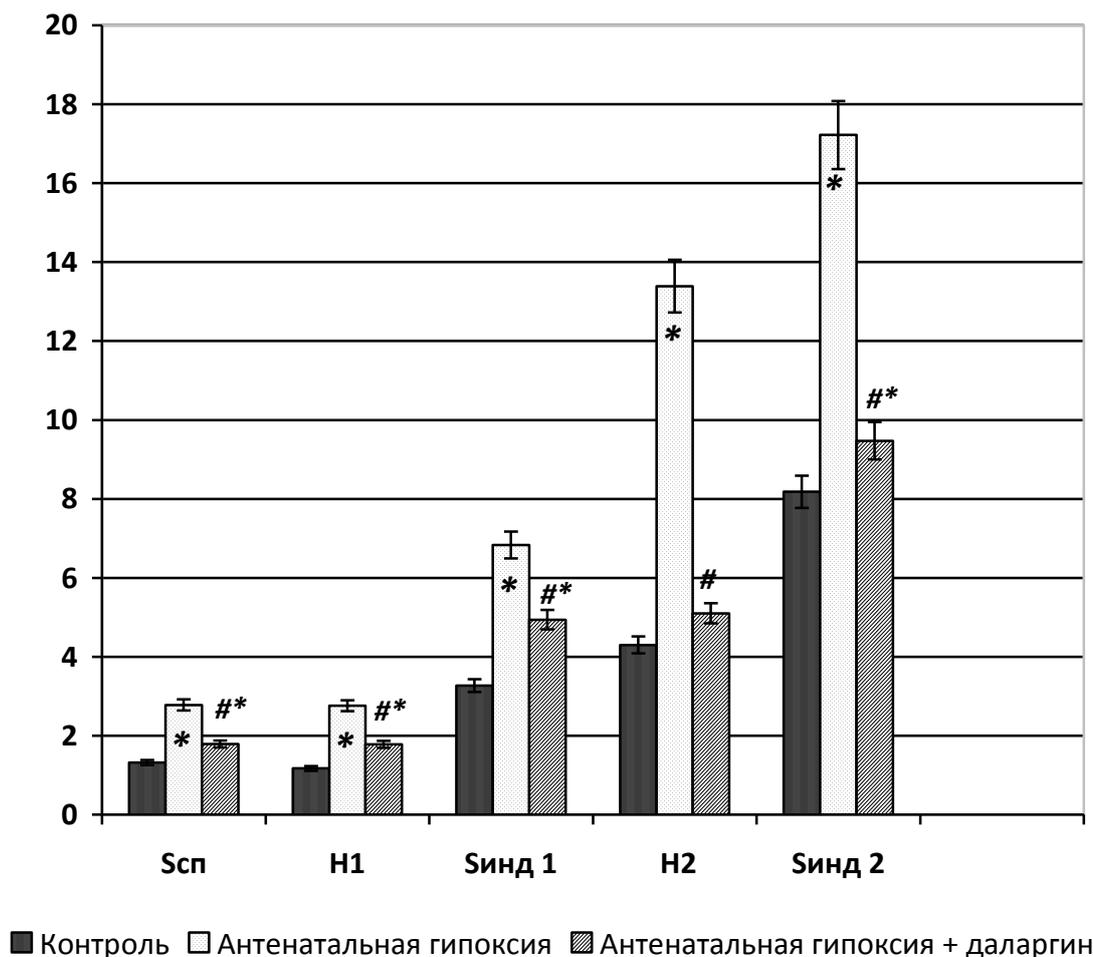
Таблица 16 - Морфологические показатели печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин

Показатель	Контроль (n=12)	Антенатальная гипоксия (n=12)	Антенатальная гипоксия + даларгин (n=12)
Индекс меченных <sup>3</sup> H-тимидином ядер (ИМЯ), %	2,37±0,44	1,34±0,26*	2,20±0,34
Интенсивность метки (ИМ)	10,78±0,50	10,39±0,57	10,97±0,48
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,73±0,04	2,56±0,04*	2,62±0,05

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль».

Полученные результаты свидетельствуют о нормализующем влиянии неонатального введения даларгина на структуру печени новорожденных белых крыс, подвергнутых АНГ.

Результаты ХМЛ-анализа гомогенатов печени свидетельствуют о том, что пятикратное внутрибрюшинное введение даларгина с 2 по 6 сутки жизни привело к существенному уменьшению проявлений окислительного стресса на органном уровне у новорожденных животных, подвергнутых АНГ (рисунок 5).



Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; # -  $p < 0,05$  отношению к группе «Antenatalная гипоксия»

Рисунок 5 - Хемилюминесцентные показатели (отн. ед.) гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин

Неонатальное введение даларгина привело к уменьшению образования АКМ в печени подопытных животных. Средний показатель интенсивности свободнорадикальных процессов (Scp) в печени животных группы «Antenatalная гипоксия» был в 2,1 раза выше контрольного уровня, а в группе «Antenatalная гипоксия+даларгин» - только в 1,35 раза. Для среднего показателя Синд 1 (интенсивность накопления перекисных радикалов) эти соотношения составили 2,09 и 1,51 раза, соответственно. Средняя концентрация гидроперекисей липи-

дов (амплитуда H1) в сыворотке крови животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 2,36 раза выше, чем в группе «Контроль», а в группе «Аntenатальная гипоксия + даларгин» - только в 1,52 раза. Для показателей, характеризующих антиоксидантную защиту (Синд 2) и резистентность к перекисному окислению липидов (амплитуда H2) эти соотношения составили 2,11 и 1,16 раза, а также 3,11 и 1,19 раза, соответственно.

Несмотря на то, что в экспериментальной группе «Аntenатальная гипоксия+даларгин» некоторые ХМЛ-параметры были достоверно выше контрольных показателей, они были также достоверно ниже аналогичных параметров группы «Аntenатальная гипоксия». О способности опиоидных пептидов снижать активность свободнорадикального окисления в тканях печени после ишемическо-реперфузионного поражения сообщают Yamanouchi K. et al. (2003).

Таким образом, неселективный агонист  $\delta$ -/ $\mu$ -ОР пептид даларгин нивелирует негативное влияние АНГ на гравиметрические и морфологические показатели печени новорожденных белых крыс и существенно снижает выраженность окислительного стресса на органном уровне.

### **3.3.1.2 Показатели состояния печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин**

На данном этапе исследования мы проводили сравнительный анализ индуцированных антенатальной гипоксией отклонений у половозрелых 60-суточных самцов крыс, получавших даларгин с 2 по 6 день жизни внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг и крыс, получавших в том же режиме изотонический раствор хлорида натрия.

Было сформировано 3 экспериментальные группы.

1 группа – «Контроль» - 60-суточные животные, не подвергавшиеся антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

2 группа – «Аntenатальная гипоксия» - 60-суточные животные, подвергнутые антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

3 группа – «Аntenатальная гипоксия + даларгин» - 60-суточные животные, подвергнутые антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутрибрюшинное введение 100 мкг/кг пептида даларгин в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

В этой серии экспериментов мы использовали белых крыс линии Вистар. В главе 3.1.2. приведены данные, полученные на рандомбредных белых крысах. Мы зарегистрировали существенные отличия гравиметрических показателей и параметров тканевого гомеостаза печени у исследованных линий животных. Так, 60-суточные крысы самцы линии Вистар имели существенно большую массу тела и, соответственно, большую массу печени. При этом у них выявлены значительно меньшие размеры гепатоцитов и ядер гепатоцитов по сравнению с рандомбредными животными. Возможно, это свидетельствует о преимущественно гиперпластическом типе роста печени у крыс Вистар и, соответственно, о гипертрофическом росте печени с выраженной полиплоидизацией у рандомбредных животных.

Вместе с тем отклонения, выявленные у 60-суточных животных обеих линий, перенесших АНГ, были сходны (таблица 17). АНГ привела к достоверному снижению массы 60-суточных крыс-самцов линии Вистар. Было также выявлено достоверное уменьшение средней площади гепатоцитов на 7,72% и средней суммарной площади ядрышек гепатоцитов на 19,86% (таблица 17).

Масса тела 60-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия +даларгин» была достоверно ниже контрольного показателя, однако несколько больше показателя самцов крыс, подвергнутых АНГ без пептидной коррекции. Введение даларгина с 2 по 6 сутки жизни нивелировало уменьшение размеров гепатоцитов и суммарной площади ядрышек у 60-суточных крыс-самцов, перенесших АНГ (таблица 17). Более того, у 60-суточных животных, подвергнутых

АНГ и неонатальному введению даларгина, мы зарегистрировали достоверное увеличение показателя площади гепатоцитов по отношению к контрольному параметру.

Поскольку динамика изменения количества и суммарной площади ядрышек коррелирует с изменением содержания общего белка в гепатоцитах (Штейн Г.И. и соавт., 1999), то нормализация этих показателей позволяет говорить о защитном влиянии неонатального введения даларгина на белок-синтетическую активность гепатоцитов 60-суточных крыс, перенесших АНГ.

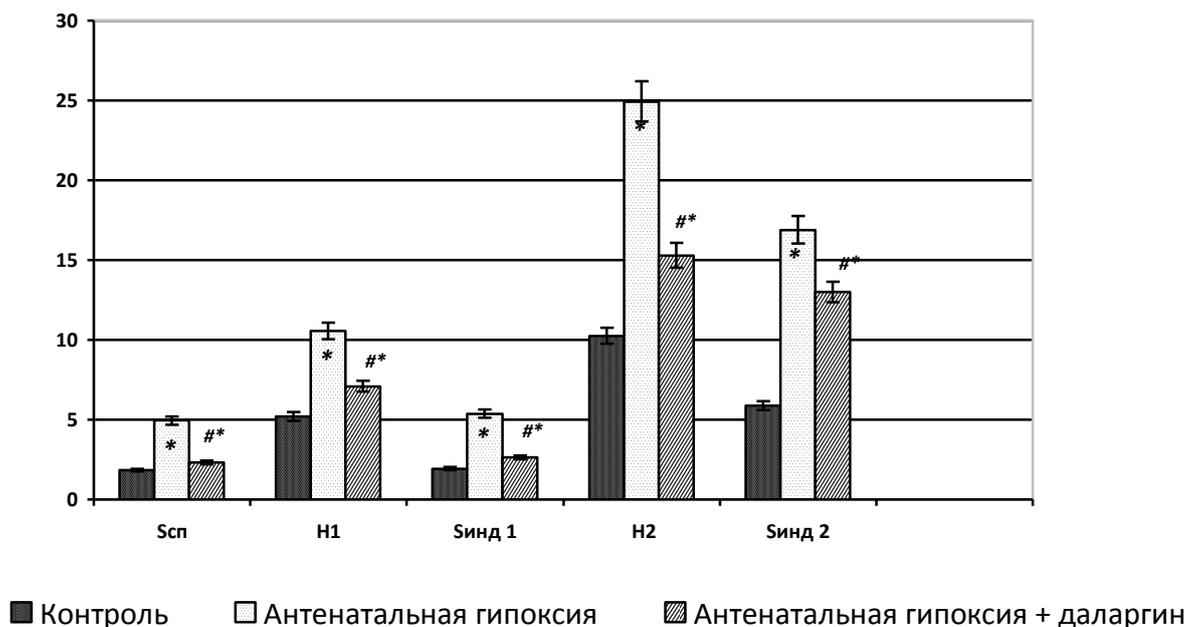
Таблица 17 - Гравиметрические и морфологические показатели печени 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин

Показатель	Контроль (n=10)	Антенатальная гипоксия (n=10)	Антенатальная гипоксия + даларгин (n=10)
Масса тела, г	281,67±9,20	249,44±7,97*	256,18±5,90*
Абсолютная масса печени, г	11,10±0,72	10,07±0,58	10,55±0,45
Относительная масса печени, % от массы тела	3,95±0,11	4,01±0,13	4,09±0,11
Площадь гепатоци- тов, кв. мкм	809,145±19,21	746,69±11,39*	882,34±30,28*
Площадь ядер гепа- тоцитов, кв. мкм	98,734±2,96	92,77±3,03	99,52±2,21
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,26±0,09	2,05±0,13	2,51±0,10
Суммарная площадь ядрышек гепатоци- тов, кв. мкм	7,424±0,34	5,95±0,29*	7,02±0,35
Доля двуядерных ге- патоцитов в популя- ции клеток, %	22,8±2,05	18,70±0,70	24,55±1,10

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»

Морфологические изменения печени у 60-суточных животных, подвергнутых АНГ, сопровождались выраженным окислительным стрессом на органном и системном уровнях. При оценке влияния неонатального введения даларгина на показатели ХМЛ гомогенатов печени 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых АНГ (рисунок 6) мы выявили, что неонатальное введение даларгина обеспечило уменьшение образования АКМ в печени подопытных животных. Средняя интенсивность свободнорадикальных процессов (Scp) в печени животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 2,69 раза выше контрольного уровня, а в группе «Аntenатальная гипоксия+даларгин» - только в 1,26 раза. Для показателя Синд 1 (интенсивность накопления перекисных радикалов) эти соотношения составили 2,03 и 1,37 раза соответственно. Концентрация гидроперекисей липидов (амплитуда Н1) в сыворотке крови животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 2,78 раза выше, чем в группе «Контроль», а в группе «Аntenатальная гипоксия + даларгин» только в 1,37 раза. Для показателей, характеризующих антиоксидантную защиту (Синд 2) и резистентность к ПОЛ (амплитуда Н2) эти соотношения составили 2,43 и 1,49 раза, а также 2,88 и 2,21 раза соответственно.

Показатели хемилюминесценции в гомогенатах печени 60-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+даларгин» были достоверно выше контрольных параметров, однако эти показатели были достоверно ниже параметров группы «Аntenатальная гипоксия». Следовательно, неонатальное введение даларгина существенно снижает выраженность окислительного стресса на органном уровне у 60-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию.

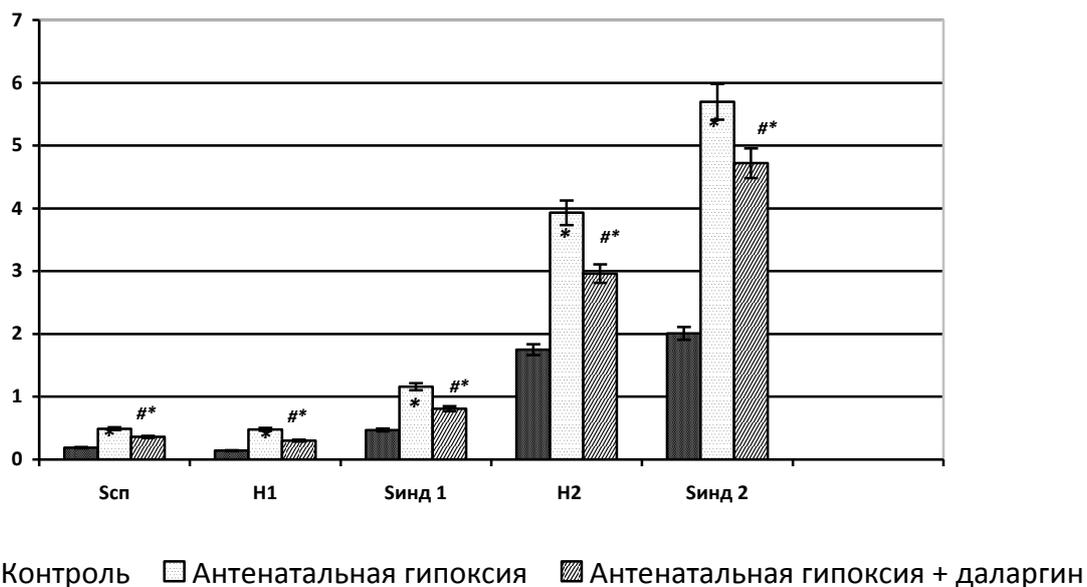


Примечания - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Аntenатальная гипоксия»

Рисунок 6 - Хемилюминесцентные показатели (отн. ед.) гомогенатов печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых АНГ и неонатальному введению пептида даларгин

Средняя интенсивность свободнорадикальных процессов (Scp) в сыворотке крови животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 2,58 раз выше контрольного уровня, а в группе «Аntenатальная гипоксия+даларгин» - только в 1,89 раза (рисунок 7).

Для показателя Синд 1 (интенсивность накопления перекисных радикалов) эти соотношения составили 2,47 и 1,72 раза соответственно. Концентрация гидроперекисей липидов (амплитуда H1) в сыворотке крови животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 3,43 раза выше, чем в группе «Контроль», а в группе «Аntenатальная гипоксия+даларгин» - только в 2,14 раза. Для показателей, характеризующих АОЗ (Синд 2) и резистентность к ПОЛ (амплитуда H2), эти соотношения составили 2,84 и 2,35 раза, а также 2,25 и 1,69 раза соответственно.



Примечание: \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Аntenатальная гипоксия»

Рисунок 7 - Хемилюминесцентные показатели (отн.ед.) сыворотки крови 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида даларгин

Хотя ХМЛ-показатели сыворотки крови 60-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+даларгин» оставались достоверно выше контрольных параметров, эти показатели были достоверно ниже параметров группы «Аntenатальная гипоксия». Таким образом, неонатальное введение даларгина существенно снижает выраженность окислительного стресса на уровне организма в целом у 60-суточных животных, перенесших АНГ.

В литературе имеются сведения о корригирующем влиянии опиоидных пептидов при различных видах окислительного стресса у крыс (Yamanouchi K. et al., 2003; Солин А.В. и соавт., 2012, 2016; Солин А.В., Ляшев Ю.Д., 2015; Самарина Е.Ю. и соавт., 2016). Даларгин предотвращает активацию процессов ПОЛ в крови крыс при гипотермии (Таджибова Л.Т. и соавт., 2010), вызывает активацию антирадикальной защиты и оказывает ингибирующее влияние на интенсивность процессов ПОЛ в периферической крови зрелых крыс в услови-

ях иммобилизационного стресса (Щербаков Д.Л. и соавт., 2014). А.В. Солин и соавт. (2012) установили, что введение селективных агонистов  $\kappa$ -ОР (динорфина А (1-13)),  $\delta$ -ОР (DSLET) и  $\mu$ -ОР (DAGO) снижают стресс-индуцированную активацию ПОЛ и повышают активность ферментов антиоксидантной системы в ткани печени и сыворотке крови крыс при 6-ти часовом иммобилизационном стрессе и при стрессе плавания (Солин А.В., Ляшев Ю.Д., 2012, 2015; Солин А.В. и соавт., 2012, 2016). По данным Е.Ю.Самариной и соавт. (2016), введение неселективного агониста  $\mu/\delta$ -ОР пептида седатин значительно снижает проявления окислительного стресса на организменном уровне в условиях экспериментальной гипобарической гипоксии у крыс.

Данные о том, что введение лиганда опиатных рецепторов в раннем постнатальном периоде онтогенеза способно нивелировать отдаленные биохимические и морфологические последствия окислительного стресса, индуцированного антенатальной гипоксией, получены нами впервые.

### **3.3.2 Показатели состояния печени белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению неопиатного аналога лей-энкефалина**

#### **3.3.2.1 Влияние неонатального введения неопиатного аналога лей-энкефалина на состояние печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии**

На данном этапе исследования мы проводили анализ индуцированных АНГ отклонений у 7-суточных крыс, получавших пептид НАЛЭ с 2 по 6 день жизни внутривентриально в дозе 100 мкг/кг.

Было сформировано 3 экспериментальные группы.

1 группа – «Контроль» - 7-суточные животные, не подвергавшиеся АНГ и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутривентриальное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

2 группа – «Аntenатальная гипоксия» - 7-суточные животные, подвергнутые АНГ и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

3 группа – «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» - 7-суточные животные, подвергнутые АНГ и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневно внутрибрюшинное введение 100 мкг/кг пептида НАЛЭ в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Пятикратное введение НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни не приводило к нормализации массы тела и абсолютной массы печени 7-суточных животных, подвергнутых внутриутробному гипоксическому воздействию. У крыс группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» средние значения этих показателей оставались достоверно ниже контрольных параметров, соответственно на 32,61% и на 21,74% (таблица 18).

Таблица 18 - Гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида НАЛЭ

Показатель	Контроль (n=15)	Аntenатальная гипоксия (n=15)	Аntenатальная гипоксия + НАЛЭ (n=15)
Масса тела, г	16,07±0,61	10,83±0,91*	11,21±1,14*
Абсолютная масса печени, мг	503,75±13,75	367,13±20,42*	394,25±40,81*
Относительная масса печени, % от массы тела	3,16±0,12	3,46±0,15	3,51±0,12

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»

Введение пептида НАЛЭ новорожденным крысам, перенесшим АНГ, также не корректировало изменения ядрышкового аппарата гепатоцитов: у 7-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» количество яд-

рышек, косвенно характеризующее белок-синтетическую активность клеток, оставалось достоверно ниже контроля на 15,4% (таблица 19).

Таблица 19 - Морфологические показатели печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида НАЛЭ

Показатель	Контроль (n=15)	Антенатальная гипоксия (n=15)	Антенатальная гипоксия + НАЛЭ (n=15)
Индекс меченных <sup>3</sup> H- тимидином ядер (ИМЯ), %	2,37±0,44	1,34±0,26*	3,54±0,35*
Интенсивность метки (ИМ)	10,78±0,50	10,39±0,57	13,23±1,09
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,73±0,04	2,56±0,04*	2,31±0,08*

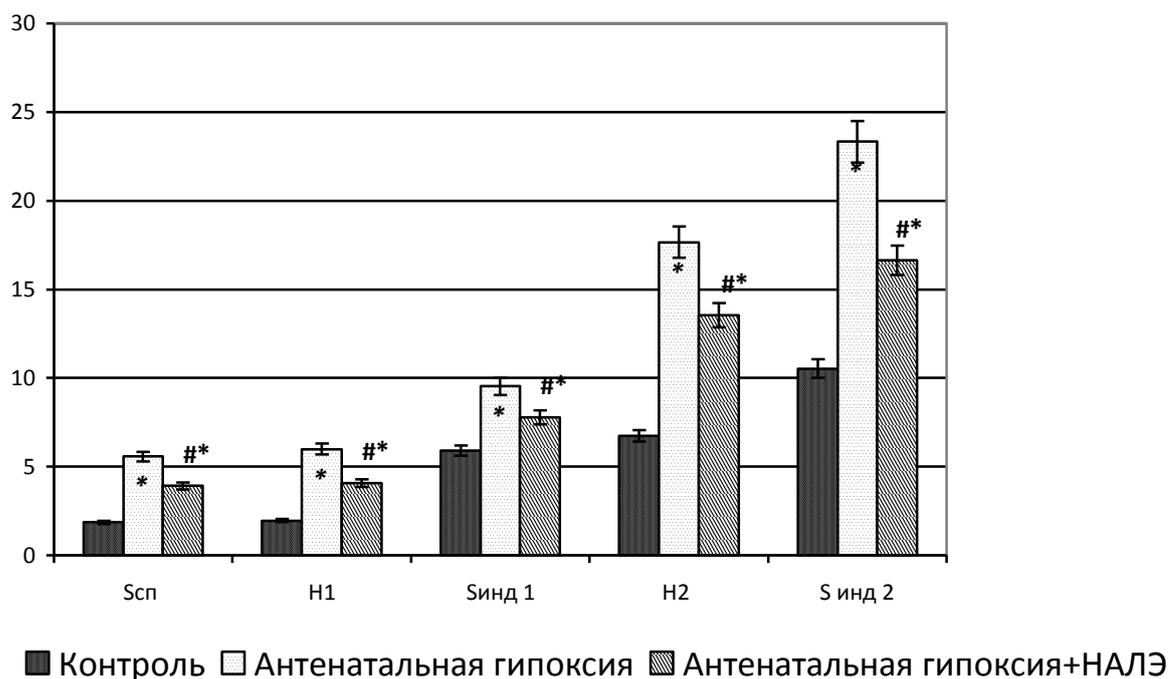
Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»

Вместе с тем, неонатальное введение пептида НАЛЭ нивелировало индуцированное АНГ угнетение ДНК-синтетической активности гепатоцитов 7-суточных животных. Более того, средний ИМЯ печени подопытных животных достоверно превышал контрольный показатель в 1,49 раза (таблица 19). Интересно, что при анализе влияния неонатального введения пептида НАЛЭ на интактных 7-суточных животных (глава 3.2.2.) мы не выявили стимулирующего влияния неопиатного аналога лей-энкефалина на пролиферативную активность гепатоцитов. Механизмы стимулирующего влияния НАЛЭ на активность процессов синтеза ДНК в печени животных, перенесших АНГ, требуют дальнейшего изучения.

По данным Л.И.Уткиной и С.С.Тимошина (1991) при исследовании печени 2-суточных крысят, матери которых подвергались гипоксическому воздействию и введению пептида НАЛЭ с 5-6 дня беременности в течение 7 дней, бы-

ла выявлена активация синтеза ДНК, по сравнению с животными, подвергавшимися АНГ, матери которых пептидной коррекции не получали (Уткина Л.И., Тимошин С.С., 1991).

Результаты ХМЛ-анализа гомогенатов печени свидетельствуют о том, что пятикратное внутрибрюшинное введение НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни привело к существенному уменьшению проявлений окислительного стресса на органном уровне у новорожденных животных, подвергнутых АНГ (рисунок 8).



Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Аntenатальная гипоксия»

Рисунок 8 - Хемилюминесцентные показатели (отн. ед.) гомогенатов печени 7-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и пятикратному введению НАЛЭ

После введения НАЛЭ в условиях окислительного стресса уровень АКМ значительно снизился. Уменьшилась интенсивность генерации АКМ (средняя величина Scp снизилась в 1,42 раза), в том числе за счет уменьшения образования гидроперекисей липидов (амплитуда H1 - уменьшилась в 1,47 раза) и снижения скорости накопления свободных перикисных радикалов (величина Синд

1 – снизилась в 1,22 раза). Кроме того, значительно повысился уровень антиоксидантной защиты, о чем свидетельствует снижение величины Синд 2 в 1,4 раза и усиление резистентности к перекисному окислению (снижение амплитуды H<sub>2</sub> в 1,3 раза). Несмотря на то, что в экспериментальной группе «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» ХМЛ-параметры оставались достоверно выше контрольных показателей, они были достоверно ниже аналогичных параметров группы «Аntenатальная гипоксия».

Таким образом, пятикратное введение пептида НАЛЭ новорожденным крысам, перенесшим антенатальную гипоксию, существенно снижает выраженность окислительного стресса на органном уровне и устраняет угнетающее влияние АНГ на синтез ДНК гепатоцитами. Вместе с тем, влияние АНГ на массу тела, абсолютную массу печени и количество ядрышек в ядрах гепатоцитов не корректировалось неонатальным введением НАЛЭ.

### **3.3.2.2 Показатели состояния печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению неопиатного аналога лей-энкефалина**

На данном этапе исследования мы проводили сравнительный анализ индуцированных антенатальной гипоксией отклонений у половозрелых 60-суточных самцов крыс, получавших пептид НАЛЭ с 2 по 6 день жизни внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг, и крыс, получавших в том же режиме изотонический раствор хлорида натрия.

Было сформировано 3 экспериментальные группы.

1 группа – «Контроль» - 60-суточные животные, не подвергавшиеся антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежедневное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

2 группа – «Аntenатальная гипоксия» - 60-суточные животные, подвергнутые антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сутки жизни

ежесуточное внутрибрюшинное введение 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

3 группа – «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» - 60-суточные животные, подвергнутые антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутрибрюшинное введение 100 мкг/кг пептида НАЛЭ в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

При анализе гравиметрических показателей 60-суточных животных, подвергнутых АНГ и неонатальному введению пептида НАЛЭ, мы зарегистрировали отсутствие достоверных отличий веса тела, абсолютной и относительной массы печени от контрольных параметров (таблица 20). При этом 60-суточные животные группы «Аntenатальная гипоксия» характеризовались достоверным снижением массы тела на 11,4%, по сравнению с группой контроля. Это свидетельствует о коррекции пептидом НАЛЭ общесоматических отдаленных последствий антенатальной гипоксии.

Таблица 20 - Гравиметрические показатели 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида НАЛЭ

Показатель	Контроль (n=10)	Аntenатальная гипоксия (n=10)	Аntenатальная гипоксия + НАЛЭ (n=10)
Масса тела, г	281,67±9,20	249,44±7,97*	274,33±9,69
Абсолютная масса печени, г	11,10±0,72	10,07±0,58	11,15±0,70
Относительная масса печени, % от массы тела	3,95±0,11	4,01±0,13	3,73±0,40

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль».

При цитоморфометрическом анализе изолированных гепатоцитов мы обнаружили, что все исследуемые параметры гепатоцитов 60-суточных крыс-

самцов группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» (площадь гепатоцитов, площадь ядер гепатоцитов, количество и суммарная площадь ядрышек гепатоцитов, а также доля двуядерных гепатоцитов) не имели достоверных отличий от контроля (таблица 21). В то время как у животных группы «Аntenатальная гипоксия» было зарегистрировано достоверное уменьшение средней площади гепатоцитов на 7,7% и средней суммарной площади ядрышек на 19,8%. Следовательно, неонатальное введение пептида НАЛЭ оказывало нормализующее влияние на цитокариометрические показатели половозрелых животных, перенесших АНГ.

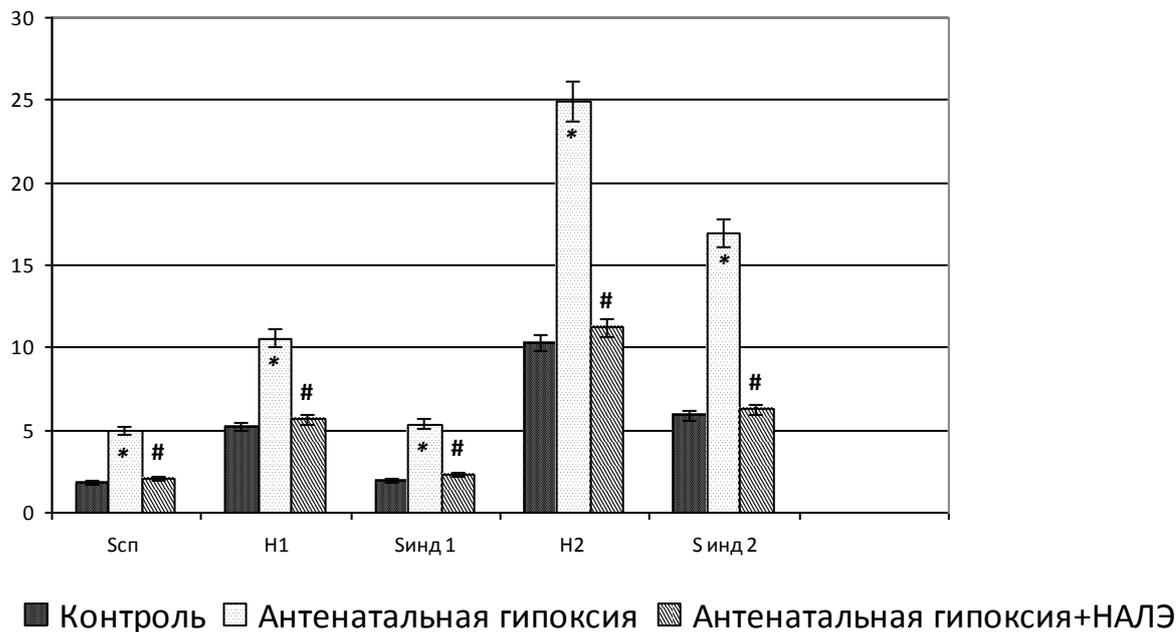
Таблица 21 - Морфологические показатели печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению пептида НАЛЭ

Показатель	Контроль (n=10)	Аntenатальная гипоксия (n=10)	Аntenатальная гипоксия + НАЛЭ (n=10)
Площадь гепатоцитов, кв. мкм	809,15±19,21	746,69±11,39*	884,17±64,15
Площадь ядер гепатоцитов, кв. мкм	98,734±2,96	92,77±3,03	101,34±3,35
Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов	2,26±0,09	2,05±0,13	2,49±0,15
Суммарная площадь ядрышек гепатоцитов, кв. мкм	7,42±0,34	5,95±0,29*	6,34±0,32
Доля двуядерных гепатоцитов в популяции клеток, %	22,82±2,05	18,70±0,70	25,00±1,36

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»

При оценке влияния неонатального введения НАЛЭ на показатели ХМЛ гомогенатов печени 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых АНГ (рисунок 9),

мы не выявили разницы ХМЛ показателей в группе «Контроль» и «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ».

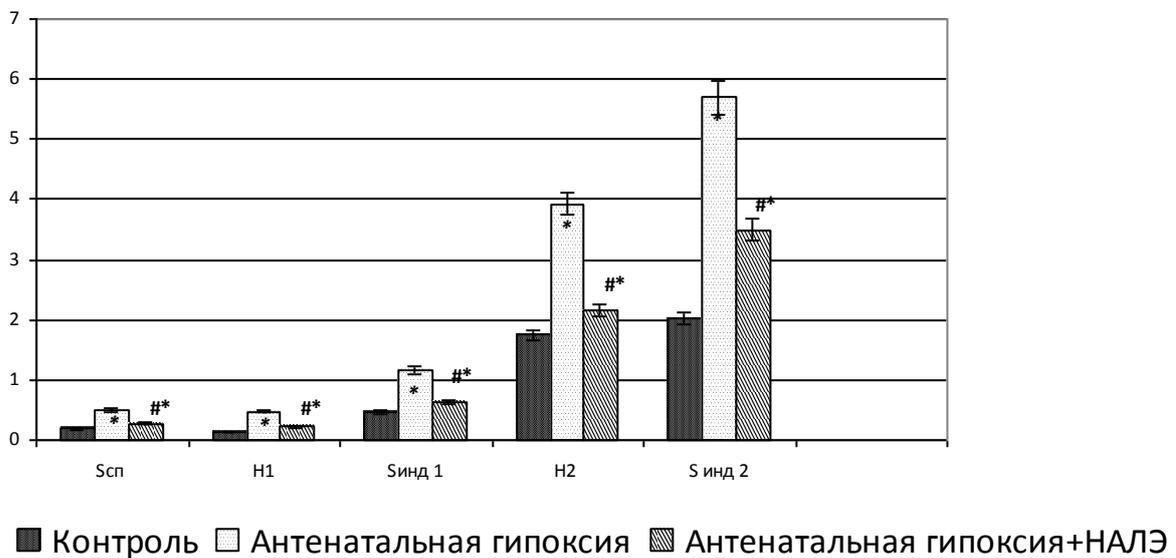


Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; # -  $p < 0,05$  отношению к группе «Аntenатальная гипоксия»

Рисунок 9 - Показатели хемилюминесценции (отн.ед.) гомогенатов печени 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению НАЛЭ

Интенсивность свободнорадикальных процессов (Scp) в печени животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» была в 2,49 раза ниже, чем в группе «Аntenатальная гипоксия». Интенсивность процессов накопления перекисных радикалов (Синд 1) и концентрация гидроперекисей липидов (амплитуда H1) в печени животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» были в 1,87 раза и в 2,37 раза, соответственно, ниже, чем в группе «Аntenатальная гипоксия». При этом значительно повысились АОЗ (Синд 2) и резистентность к ПОЛ (амплитуда H2): эти показатели были в 2,22 и 2,71 ниже, чем в группе «Аntenатальная гипоксия». Этот факт свидетельствует о выраженном корригирующем влиянии неонатального введения НАЛЭ на процессы свободнорадикального окисления в печени 60-суточных животных, перенесших АНГ.

При оценке влияния неонатального введения пептида НАЛЭ на показатели ХМЛ крови 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых АНГ (рисунок 10), мы выявили, что неонатальное введение НАЛЭ снизило образование АКМ в организме подопытных животных. Интенсивность свободнорадикальных процессов (Scп) в сыворотке крови животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 2,58 раз выше контрольного уровня, а в группе «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» - только в 1,47 раза. Для показателя Синд 1 (интенсивность накопления перекисных радикалов), эти соотношения составили 2,47 и 1,32 раза, соответственно. Концентрация гидроперекисей липидов (амплитуда Н1) в сыворотке крови животных группы «Аntenатальная гипоксия» была в 3,43 раза выше, чем в группе «Контроль», а в группе «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» только в 2,18 раза. Для показателей, характеризующих АОЗ (Синд 2) и резистентность к ПОЛ (амплитуда Н2) эти соотношения составили 2,84 и 1,74 раза, а также 2,25 и 1,23 раза, соответственно.



Примечание - \* -  $p < 0,05$  по отношению к группе «Контроль»; # -  $p < 0,05$  отношению к группе «Аntenатальная гипоксия»

Рисунок 10 - Показатели хемилюминесценции (отн.ед.) крови 60-суточных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии и неонатальному введению НАЛЭ

Хотя ХМЛ-показатели сыворотки крови 60-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» оставались выше контрольных параметров, эти показатели были достоверно ниже параметров группы «Аntenатальная гипоксия». Следовательно, неонатальное введение пептида НАЛЭ существенно снижает выраженность окислительного стресса на уровне целостного организма у 60-суточных животных, перенесших АНГ.

Таким образом, введение в раннем постнатальном периоде онтогенеза неопиатного аналога лей-энкефалина оказывает частичное корректирующее влияние на морфофункциональные параметры 60-суточных крыс-самцов, подвергнутых антенатальной гипоксии. У животных, получавших в неонатальном возрасте пептидную коррекцию с помощью НАЛЭ, мы не выявили таких последствий антенатальной гипоксии, как снижение массы тела, уменьшение размеров гепатоцитов и суммарной площади ядрышек; полностью нивелировались проявления окислительного стресса на органном уровне и существенно уменьшились проявления окислительного стресса на уровне организма в целом.

#### 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного нами экспериментального исследования подтвердили описанное в научной литературе выраженное повреждающее влияние антенатальной гипоксии на плод млекопитающих. Мы наблюдали достоверное снижение массы тела у новорожденных животных, подвергнутых АНГ. Индуцированная антенатальной гипоксией задержка внутриутробного развития оказывает длительное негативное влияние на рост и развитие организма в постнатальном онтогенезе (Нагаева Е.В., Ширяева Т.Ю., 2010; Wedgwood S. et al., 2015; Xiong F. et al., 2016).

При гипоксии в организме плода происходят компенсаторно-приспособительные изменения, направленные на адаптацию к неблагоприятным условиям развития (Цывьян П.Б., 2007; Полячикова О.Л., Бородули Г.М., 2009; Луканская Е.Н., 2013; Nusken K.D. et al., 2008). В результате компенсаторной централизации кровообращения плода и переноса основного потока оксигенированной крови через венозный проток в нижнюю полую вену происходит уменьшение потока крови, притекающей к печени (Цывьян П.Б., 2007; Протопопова Н.В. и соавт., 2012; Черкасская Г.В., 2014). Вследствие «эффекта щажения мозга» потребление кислорода в печени во время гипоксических эпизодов уменьшается больше, чем в других жизненно важных органах. Это неблагоприятное для печени следствие компенсаторно-приспособительного механизма централизации кровообращения влечет за собой морфологические и метаболические изменения гепатоцитов.

У 7-суточных животных, перенесших АНГ, мы выявили снижение абсолютной массы печени, уменьшение количества ДНК-синтезирующих гепатоцитов, снижение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов, интенсификацию процессов свободнорадикального окисления и снижение активности антиоксидантной системы в ткани печени. В литературе описаны выраженные деструктивные изменения, низкий уровень репаративных процессов и усиление процессов фиброобразования в печени новорожденных мышей, перенесших АНГ (Надеев

А.П., 2006; Кузнецова И.В., 2007; Надеев А.П. и соавт., 2014). Таким образом, АНГ индуцирует существенные структурные нарушения в печени млекопитающих в раннем постнатальном периоде.

Согласно нашим результатам, АНГ с 14 по 19 сутки гестации индуцирует достоверное уменьшение количества ДНК-синтезирующих гепатоцитов у 7-ми суточных белых крыс: средний показатель индекса меченых ядер снизился в 1,77 раза. В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории ранее, было зарегистрировано достоверное снижение ДНК-синтетической и митотической активности гепатоцитов у новорожденных белых крыс, перенесших АНГ на 5-6 сутки гестации (Уткина Л.И., Тимошин С.С. 1990, 1991). Нарушение гиперпластического роста печени в раннем постнатальном периоде у млекопитающих, перенесших АНГ, по-видимому, является причиной некомпенсируемого структурного дефицита, поскольку базовое становление популяции гепатоцитов происходит именно в ранние возрастные периоды (Sasaki K., Sonoda Y., 2000; Guo Y. et al., 2009; Kung J.W.C. et al., 2010).

Ткань печени способна не только к гиперпластическому, но и гипертрофическому росту. Полиплоидизация и гипертрофия гепатоцитов являются важными компонентами формирования структурного резерва органа (Саркисов Д.С. и соавт., 1987; Кудрявцев и соавт., 1993; Melchiorri et al., 1993). Показателем гипертрофических изменений в клетке могут быть параметры ядрышкового аппарата. Зарегистрированное нами уменьшение количества ядрышек гепатоцитов у подопытных 7-суточных животных свидетельствует о снижении белок-синтетической активности печени после АНГ (Мамаев Н.Н. и соавт., 1989). Таким образом, АНГ ограничивает не только гиперпластический, но и гипертрофический рост печени.

Печень является одним из органов-мишеней при действии любого стрессорного раздражителя; при этом в ткани печени особенно выражена активация процессов свободнорадикального окисления (Буеверов А.О., 2002; Padma V.V. et al., 2012). В нашем исследовании, структурные нарушения печени новорожденных белых крыс, перенесших АНГ, сопровождались интенсификацией сво-

боднорадикального окисления. Мы выявили ускорение образования перекисных радикалов на фоне ослабления антиоксидантной защиты. Данные изменения можно расценивать как наличие окислительного стресса на органном уровне. Чрезмерное образование АКМ при гипоксии способно привести к нарушению синтеза ДНК и клеточного деления (Song W. et al., 1999). Вероятно, АНГ усугубляет течение и проявления физиологического окислительного стресса, который имеет место в первые сутки после рождения (Кореновский Ю.В. и соавт., 2007).

Структурный дефицит печени наряду с выраженным окислительным стрессом на органном уровне может привести к ухудшению функционирования органа, истощению компенсаторных механизмов в печени новорожденных млекопитающих, подвергнутых АНГ, с последующими морфофункциональными нарушениями гепатобилиарной системы (Ищенко Е.В., 2006; Надеев А.П. и соавт., 2014).

Полученные нами результаты подтверждаются литературными данными. У новорожденных детей после АНГ регистрируется дисфункция печени, проявляющаяся в снижении белок-синтетической активности и нарушении способности к выведению билирубина. У низковесных новорожденных детей после АНГ дисфункция печени проявляется коагулопатией, гипоальбуминемией (Hannam S. et al., 2003). Хроническая внутриутробная гипоксия занимает особое место среди факторов риска тяжелой транзиторной неонатальной гипербилирубинемии (Мехрякова И.А., 2008).

АНГ, являясь неблагоприятным фактором для роста и развития плода, может приводить к изменению экспрессии генов (Xiong F. et al., 2016), как одной из форм нарушения адаптации. Экспрессия генов изменяется либо посредством нарушения активности транскрипционных факторов, промоторов и супрессоров генов, либо эпигенетической модификацией ДНК. При этом, изменения экспрессии генов могут быть и причиной, и следствием ремоделирования тканей и изменений в эндокринной оси (Нагаева Е.В., Ширяева Т.Ю., 2010). В

результате эпигенетической модификации экспрессии генов развивается стойкое нарушение физиологических функций в отдаленные периоды онтогенеза.

Гипоксия, перенесенная в критические периоды антенатального развития, ассоциирована с развитием инсулинопении и инсулинорезистентности (Wan G. et al., 1998; Huang S. T. et al., 2004; Yang S.W., 2000; Lo H.C. et al., 2002; Нагаева Е.В., Ширяева Т.Ю., 2010). К инсулинорезистентности могут приводить изменения генов Р13-киназы, инсулинового рецептора, ФНО- $\alpha$  и др. (Леонтьева И.В., 2011). Инсулинорезистентность играет ведущую роль в развитии метаболического синдрома (Higgins V, Adeli K., 2017). Формирование метаболического синдрома начинается в детском возрасте задолго до клинической манифестации сахарного диабета 2-го типа и патологии сердечно-сосудистой системы и долгое время протекает бессимптомно (Болотова Н.В. и соавт., 2007). В настоящее время метаболический синдром признается актуальной проблемой педиатрии. Его частота в детской популяции составляет 4-7,6%, а у детей и подростков с ожирением достигает 53% (Болотова Н.В. и соавт., 2007; Бокова Т.А., Урсова Н.И., 2011; Бокова Т.А., 2014; Леонтьева И.В., 2011; Weiss R. et al., 2004; Zimmet P. et al., 2007). Окислительный стресс, наряду с инсулинорезистентностью, воспалением и метаболическим синдромом, является одним из ключевых патогенетических механизмов неалкогольного стеатогепатита, неалкогольной жировой болезни печени с исходом в фиброз (Буеверов А.О., 2012; Бокова Т.А., 2014; Ермолова Т.В. и соавт., 2016; Sanyal A.J. et al. 2001; Angulo P., 2002; Rolo A.P. et al., 2012). У детей с метаболическим синдромом неалкогольная жировая болезнь печени выявляется в 84% случаев (Бокова Т. А., Урсова Н. И. 2011; Gupta R., 2011).

Мы провели анализ отдаленных последствий АНГ у 60-суточных крыс. В нашей работе мы не зарегистрировали «догоняющего роста» у 60-суточных животных, подвергнутых АНГ. Их гравиметрические показатели оставались ниже контрольных параметров. Следует обратить внимание на тот факт, что снижение массы тела имело место через 63-65 дней после последнего гипоксического

воздействия. Негативное влияние АНГ на массу тела мышей в отдаленном периоде онтогенеза показано А.П. Надеевым (2006), И.В. Кузнецовой (2007).

У 60-суточных крыс, перенесших АНГ, мы выявили снижение абсолютной и относительной массы печени; уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов; уменьшение средней площади гепатоцитов, ядер гепатоцитов, суммарной площади ядрышек гепатоцитов и повышение доли двуядерных гепатоцитов в популяции клеток. Уменьшение размеров гепатоцитов и их ядер косвенно свидетельствует о низком уровне ploидности гепатоцитов у животных, перенесших АНГ. Индуцированное АНГ увеличение доли двуядерных гепатоцитов в популяции клеток печени 60-суточных животных имеет двойное значение. С одной стороны, изменение количества двуядерных гепатоцитов может свидетельствовать о нарушении процессов цитокинеза, а с другой стороны, может быть компенсаторной реакцией, направленной на сохранение нормального уровня функционирования печени в условиях структурного дефицита.

Также мы выявили изменения свободнорадикального окисления у 60-суточных крыс, подвергнутых АНГ. На тканевом и системном уровнях проявлялась интенсификация процессов свободнорадикального окисления, ослабление антиоксидантной защиты, снижение резистентности к перекисному окислению.

В физиологических условиях АКМ являются частью внутриклеточной сигнальной трансдукции, индуцируют в гепатоцитах человека стресс-чувствительный p38 MAPK/ERK-Akt каскад (Wang X et al., 2011), участвующий в одновременной регуляции клеточного роста и пролиферации (Tormos AM, et al., 2013). Повышение концентрации АКМ переводит клетку в неустойчивое состояние повышенной чувствительности к специфическим управляющим стимулам, что является необходимым условием для эпигеномной регуляции процесса дифференцировки (Чижов А.Я. и соавт., 2012).

Накопление АКМ при окислительном стрессе, напротив, снижает пролиферативную активность гепатоцитов (Gorla G.R. et al., 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> участвует в сигнальной трансдукции TGF-β1, который в условиях патологии становится

основным индуктором процессов фиброза печени, определяет дифференцировку звездчатых клеток в миофибробласты, непосредственно влияет на синтез коллагенов и тканевых ингибиторов протеиназ 1 типа (Bataller R., Brenner D.A., 2005; Cong M. et al., 2012). Основной повреждающий эффект АКМ заключается в разрушении мембран клеток, модификации белков и ДНК (Berlett V.S., Stadtman E.R., 1997; Croteau D.L., Bohr V.A., 1997), что приводит к внутриклеточному изменению восприятия и передачи сигнала, активации множества каскадов, изменяющих экспрессию генов и способность клеток к выживанию (Gitto E. et al., 2002). Данные изменения усугубляют течение окислительного стресса и приводят к развитию «фетально запрограммированных» болезней взрослых.

Это соответствует теории «внутриутробного программирования», выдвинутой в 1992 г. Hales C. и Barker D. Суть теории заключается в том, что воздействие неблагоприятных факторов во время беременности вызывает ответную реакцию - адаптивный ответ со стороны плода. При этом сохраняется полноценность развития и адекватное функционирование жизненно-важных органов (ЦНС и сердца). Эти органы плода получают адекватное питание, сэкономленное в их пользу, благодаря перераспределению нутриентов за счет тканей печени, поджелудочной железы, почек, скелетных мышц. Кроме того, согласно данной теории, происходит «перепрограммирование» регуляторных систем плода, приводящее к изменению метаболизма и направленное на выживание организма в неблагоприятных условиях (Нагаева Е.В., Ширяева Т.Ю., 2010). Указанные механизмы физиологически целесообразны только в период внутриутробного развития. Однако они персистируют и в постнатальном периоде, обуславливая в дальнейшем, измененный ответ организма на различные неблагоприятные факторы во взрослой жизни (Gluckman P.D., Hanson M.A., 2004).

Окислительный стресс, имеющий место в печени у 60-суточных животных, вероятнее всего, является результатом эпигенетической модификации экспрессии генов. Показано, что фетоплацентарная недостаточность, развивающаяся в результате перевязки маточной артерии, вызывает нарушение метили-

рования структуры ДНК (Pham T.D. et al., 2003) и ацетилирования гистонов (Ke X. et al., 2006) в тканях взрослого потомства экспериментальных животных. Данные изменения, с одной стороны, являются компенсаторно-приспособительными, а с другой, отражают нарушения адаптации к неблагоприятным условиям развития организма в антенатальном периоде.

В нашем исследовании не удалось зарегистрировать функциональных нарушений печени у 60-суточных крыс после АНГ. Показатели АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛДГ, ЩФ, билирубина и аргиназы-1 не отличались от контрольных параметров. Возможно, в физиологических условиях структурный дефицит печени не проявляется выраженными функциональными изменениями, поскольку есть резерв функционирования органа. Существуют литературные данные о том, что даже при крайне тяжелых морфологических изменениях ткани печени признаки печеночной недостаточности могут отсутствовать или быть незначительными (Дуданова О.П. Белавина И.А., 2014; Ермолова Т.В. и соавт., 2016). Печень способна поддерживать свои функции даже при удалении 80% ее паренхимы (Журавлев В.А., 1986). Вместе с тем, нельзя исключить возможность возникновения функциональной недостаточности гепатоцитов после АНГ при патологических состояниях, например, при токсическом, кандидозном или вирусном поражении печени. Работами А.П. Надеева (2006), И.В. Кузнецовой (2007), А.П. Надеева и соавт. (2014) показано, что перенесенная внутриутробно гипоксия изменяет динамику хронического туберкулезного гранулематозного воспаления в печени у мышей и масштабы деструктивных изменений при дополнительном инфицировании *Candida albicans*. Этот вопрос требует дальнейшего исследования.

Поскольку АНГ индуцирует существенные структурные нарушения печени, то становится актуальным не только своевременное выявление этих нарушений в ранние периоды онтогенеза (Ищенко Е.В., 2006; Бережанская С.Б. и соавт., 2013), но и поиски эффективных способов их коррекции. Мы предприняли попытку провести коррекцию ранних и отдаленных негативных последствий АНГ на печень с помощью введения в неонатальном периоде развития не-

селективного агониста  $\delta$ -/ $\mu$ -опиатных рецепторов синтетического опиоидного пептида даларгин и неопиатного аналога лей-энкефалина - пептида НАЛЭ.

При исследовании 7-суточных животных, получавших с 2 по 6 сутки жизни неселективный агонист  $\delta$ -/ $\mu$ -ОР даларгин на фоне последствий перенесенной АНГ, мы выявили полную коррекцию постгипоксических нарушений. Введение даларгина приводило к нормализации сниженных в результате гипоксического воздействия гравиметрических показателей: вес тела и абсолютная масса печени животных, получавших даларгин после перенесенной АНГ, не отличались от аналогичных параметров животных группы контроля. Введение даларгина отменяло негативное влияние АНГ на пролиферативную и белок-синтетическую активность гепатоцитов подопытных животных. Способность даларгина оказывать стимулирующее влияние на пролиферативные и регенераторные процессы, в первую очередь, в очаге повреждения, показана С.А. Алексеевко, С.С. Тимошиным (1996).

В гомогенатах печени 7-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+даларгин» мы зарегистрировали существенное уменьшение активности свободнорадикального окисления и увеличение антиоксидантной защиты по сравнению с группой «Аntenатальная гипоксия». По данным авторов (Солин А.В., Ляшев Ю.Д., 2012; 2015; Солин А.В. и соавт., 2012; 2016), введение селективных агонистов  $\delta$ -ОР (DSLET),  $\mu$ -ОР (DAGO),  $\kappa$ -ОР (динорфина А (1-13)), снижает стресс-индуцированную активацию ПОЛ и повышает активность ферментов антиоксидантной системы в ткани печени крыс при 6-ти часовом иммобилизационном стрессе и при стрессе плавания. О способности ОП снижать активность свободнорадикального окисления в тканях печени после ишемическо-реперфузионного поражения сообщают К. Yamanouchi et al. (2003).

Таким образом, даларгин - неселективный агонист  $\delta$ -/ $\mu$ -ОР - полностью нивелирует негативное влияние антенатальной гипоксии на структурные показатели печени и существенно уменьшает проявления окислительного стресса на тканевом уровне у 7-суточных животных.

Введение новорожденным животным неопиатного аналога лей-энкефалина индуцировало лишь частичную коррекцию негативных последствий АНГ у 7-суточных животных. НАЛЭ не отменял постгипоксическое снижение гравиметрических показателей и белок-синтетической активности гепатоцитов. Масса тела, абсолютная масса печени и количество ядрышек в ядрах гепатоцитов у животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» оставались ниже контрольных параметров. Вместе с тем, неонатальное введение НАЛЭ полностью отменяло негативное влияние АНГ на пролиферативную активность гепатоцитов и, более того, оказывало стимулирующее влияние на ДНК-синтетическую активность гепатоцитов у 7-суточных животных. Необходимо обратить внимание на тот факт, что при анализе влияния неонатального введения пептида НАЛЭ на интактных 7-суточных животных (глава 3.2.2.1), мы не выявили стимулирующего влияния неопиатного аналога лей-энкефалина на пролиферативную активность гепатоцитов. Механизмы стимулирующего влияния НАЛЭ на активность процессов синтеза ДНК в печени животных, перенесших АНГ, требуют дальнейшего изучения.

Неонатальное введение пептида НАЛЭ, как и даларгина, значительно снизило проявления окислительного стресса на органном уровне у животных в раннем постнатальном периоде. В гомогенатах печени 7-суточных животных экспериментальных групп «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» ХМЛ-параметры были достоверно ниже аналогичных параметров группы «Аntenатальная гипоксия». Однако корригирующий эффект НАЛЭ был частичным, поскольку ХМЛ-параметры групп «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» все же оставались выше контрольных показателей.

Таким образом, пятикратное введение с 2 по 6 сутки жизни как неселективного агониста  $\delta/\mu$ -ОР пептида даларгин, так и неопиатного аналога лей-энкефалина оказывало корригирующее влияние на последствие АНГ у 7-суточных белых крыс. Вместе с тем, следует отметить более выраженное нормализующее влияние даларгина. Эта закономерность прослеживалась как при

анализе морфологических показателей, так и параметров хемилюминесценции (рисунок 11).

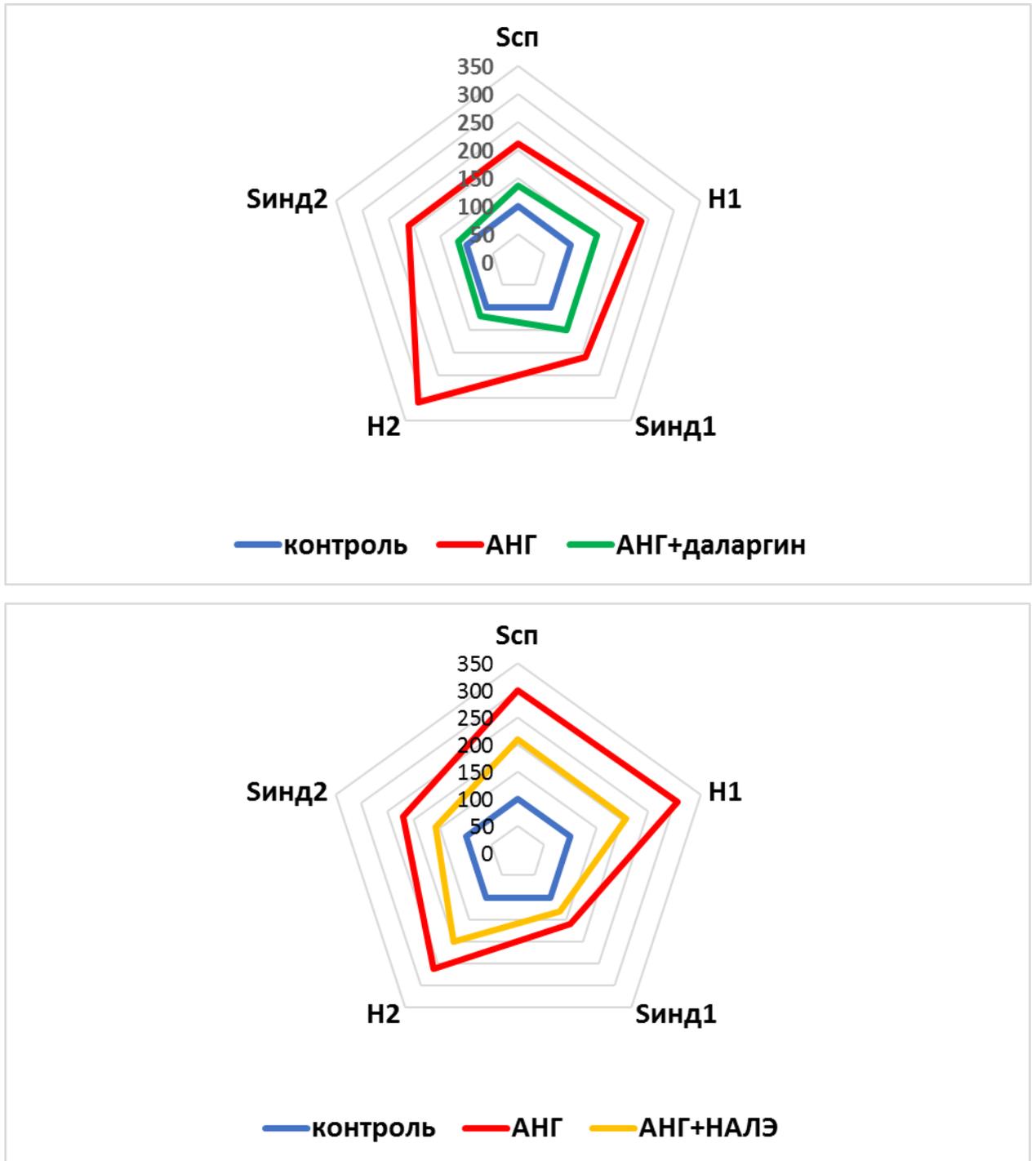


Рисунок 11 - Хемилюминесцентные показатели гомогенатов печени 7-суточных крыс исследуемых групп (показатели приведены в % по отношению к параметрам контроля)

При анализе отдаленных последствий АНГ у 60-суточных животных, получавших с 2-6 сутки жизни даларгин, мы наблюдали частичную коррекцию показателей. У 60-суточных животных, перенесших АНГ, неонатальное введение даларгина нивелировало уменьшение размеров гепатоцитов и суммарной площади их ядрышек, что позволяет предполагать нормализующее влияние неонатального введения даларгина на анаболическую активность гепатоцитов. Вместе с тем, мы не выявили коррекции массы тела 60-суточных животных этой экспериментальной группы: и животные группы «Аntenатальная гипоксия», и животные группы «Аntenатальная гипоксия+даларгин» имели сниженные показатели массы тела.

В гомогенатах печени и сыворотке крови мы зарегистрировали уменьшение образования АКМ и увеличение показателей антиоксидантной защиты, по сравнению с группой «Аntenатальная гипоксия». Следовательно, неонатальное введение даларгина существенно снижает выраженность окислительного стресса на органном и системном уровнях у 60-суточных животных подопытной группы.

Неонатальное введение НАЛЭ полностью корректировало отдаленные последствия АНГ у 60-суточных животных. У половозрелых животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» вес тела, абсолютная и относительная масса печени, а также средняя площадь гепатоцитов и их ядер, среднее количество ядрышек, средняя суммарная площадь ядрышек, а также доля двуядерных гепатоцитов не отличались от контрольных параметров.

Неонатальное введение пептида НАЛЭ, как и даларгина, значительно снижало выраженность окислительного стресса у 60-суточных животных подопытной группы на органном и системном уровнях. В ткани печени 60-суточных животных экспериментальной группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» ХМЛ-параметры были достоверно ниже аналогичных параметров группы «Аntenатальная гипоксия» и не отличались от показателей группы контроля. НАЛЭ оказывал полностью корригирующий эффект на проявления ОС на органном уровне.

В сыворотке крови мы зарегистрировали уменьшение образования АКМ, активности свободнорадикального окисления и увеличение антиоксидантной защиты по сравнению с группой «Аntenатальная гипоксия», при этом ХМЛ-параметры группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» оставались достоверно выше контрольных показателей.

Следует отметить, что выраженность окислительного стресса на системном уровне у 60-суточных животных группы «Аntenатальная гипоксия+НАЛЭ» была существенно ниже, чем у группы «Аntenатальная гипоксия+даларгин» (рисунок 12).

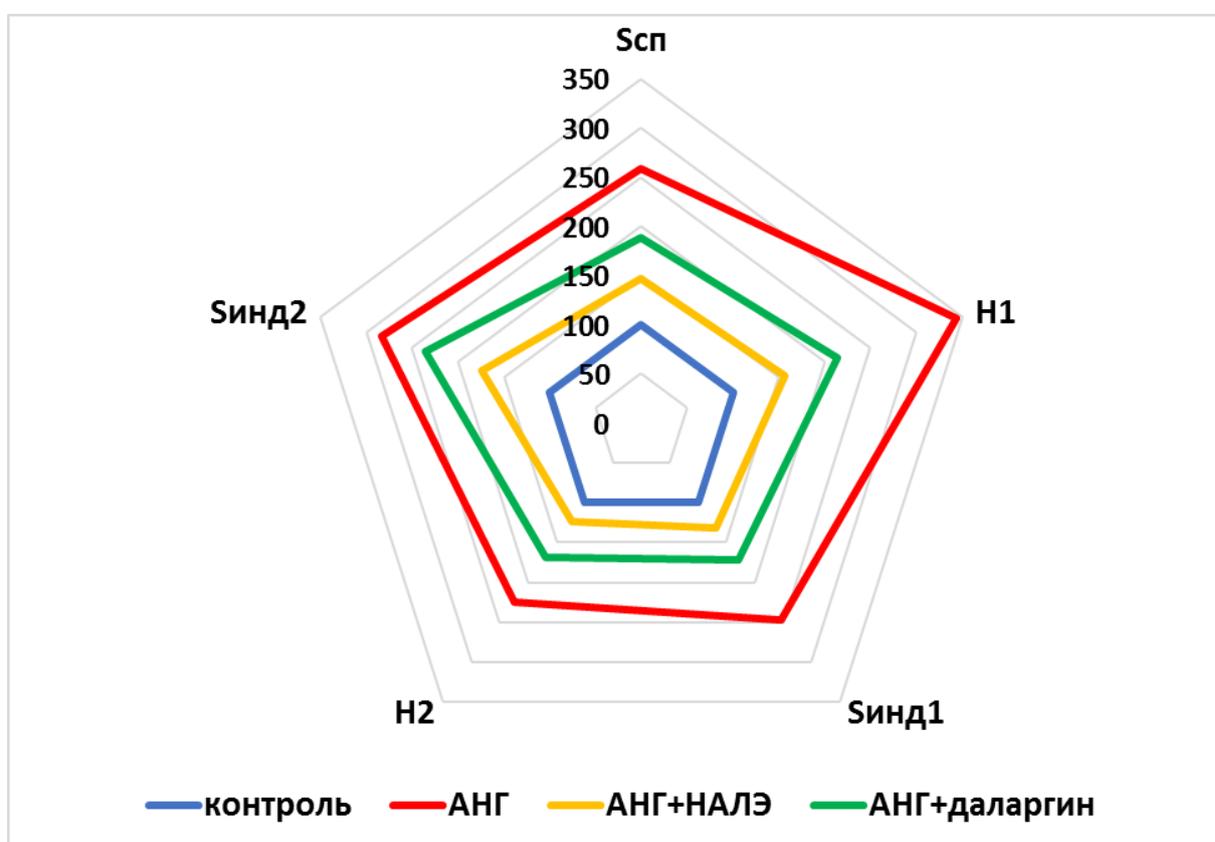


Рисунок 12 - Хемилуминесцентные показатели сыворотки крови 60-суточных крыс исследуемых групп (показатели приведены в % по отношению к параметрам контроля)

Таким образом, агонист ОР даларгин и неопиатный аналог лей-энкефалина, оказывали однонаправленные корректирующие влияния на нега-

тивные ранние и отдаленные последствия АНГ в печени. Вместе с тем, следует отметить, что даларгин оказывал более выраженное, чем НАЛЭ, нормализующее влияние на состояние печени 7-суточных животных. По-видимому, аффинность к опиатным рецепторам является важной частью механизмов гепатопротективного влияния пептидов в раннем постнатальном периоде. Цитопротективные свойства агонистов ОР описаны в литературе (Сазонова Е.Н., 2004; Wang X. et al., 2016; Estrada J.A. et al., 2016; Kishi H. et al., 1996; Moon T. D., 1988; Persson A.I. et al., 2003; Тимошин С.С. и соавт., 1990; Гончарова Е.Н., 1997; Мельникова Н.П., 1998; Масленникова Н. В. и соавт., 2008; Mathew V. et al., 2011; Zagon I.S. et al., 2009; Wang D. et al., 2009; Kim H. et al., 2012; Животова Е.Ю., 2014). Следует отметить, что у 7-суточных интактных (не подвергнутых АНГ) животных пятикратное воздействие даларгина оказывало стимулирующее влияние на анаболические процессы в печени: индуцировало увеличение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов. Введение НАЛЭ интактным новорожденным животным не вызывало каких-либо изменений состояния печени.

Сопоставляя эффекты неонатального введения даларгина и пептида НАЛЭ на состояние печени 60-суточных животных можно отметить более выраженное корректирующее влияние пептида НАЛЭ. При исследовании отдаленных последствий неонатального введения НАЛЭ на интактном фоне, у 60-суточных животных мы выявили возрастание размеров гепатоцитов и их ядер, а также увеличение доли двуядерных гепатоцитов. Механизмы долгосрочных эффектов НАЛЭ требуют дальнейшего исследования.

В литературе имеются указания на наличие в тканях печени неспецифических рецепторов к биологически активным пептидам, связывающим различные типы пептидных регуляторов (Khawaja X.Z. et al., 1990). Miloudi K. et al., (2012) сообщают о выраженном антиоксидантном влиянии на гепатоциты двух гептапептидов из молока. По данным J.S. Kim и J.J. Lemasters (2006) гепатопротективное действие морфина при ишемическо-реперфузионном повреждении гепатоцитов не связано с активацией опиоидных рецепторов. Возможно, что в случае с НАЛЭ имеется прямое взаимодействие пептида с G-белками мембран

клеток, приводящее к реализации последующих регуляторных эффектов (Al-Hasani R. et al., 2011).

Можно предположить, что более выраженный «ранний» нормализующий эффект даларгина после АНГ в наибольшей степени связан с влиянием на активность транскрипционных факторов, промоторов и супрессоров генов. Реализация долгосрочных эффектов НАЛЭ, вероятно, обусловлена эпигенетическими механизмами.

Результаты проведенного исследования показывают высокую эффективность неонатального введения неселективного агониста  $\delta$ -/ $\mu$ -ОР пептида даларгин и неопиоидного аналога лей-энкефалина (НАЛЭ) для коррекции негативных влияний антенатальной гипоксии на состояние печени млекопитающих. Однако, применение даларгина в неонатологии и педиатрии нежелательно в связи с наличием у него опиоидной активности. Кроме того, обращает внимание выявленный нами факт снижения относительной массы печени у 60-суточных животных, подвергнутых воздействию даларгина в раннем постнатальном периоде.

В связи с этим, неопиатный аналог лей-энкефалина – НАЛЭ - представляет особый интерес, как перспективное и безопасное средство для коррекции негативных последствий АНГ.

## ВЫВОДЫ

1. У 7-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, имеет место активация свободнорадикального окисления в ткани печени, сопровождающаяся угнетением пролиферативной и белок-синтетической активности гепатоцитов.

2. У 60-суточных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, сохраняются проявления окислительного стресса на тканевом и системном уровнях; при этом регистрируются уменьшение площади гепатоцитов и их ядер, а также признаки угнетения белок-синтетической активности гепатоцитов (уменьшение количества и размеров ядрышек).

3. Введение новорожденным животным с 2 по 6 сутки жизни агониста  $\delta/\mu$ -опиатных рецепторов пептида даларгин приводит к активации ядрышкового аппарата гепатоцитов 7-суточных животных и увеличению количества двуядерных гепатоцитов у 60-суточных крыс-самцов.

4. Введение неопиатного аналога лей-энкефалина с 2 по 6 сутки жизни в дозе 100 мкг/кг не влияет на исследуемые параметры печени 7-суточных белых крыс и приводит к увеличению средней площади гепатоцитов, средней площади ядер гепатоцитов и доли двуядерных гепатоцитов у 60-суточных крыс-самцов.

5. Неонатальное введение агониста  $\delta/\mu$ -опиатных рецепторов пептида даларгин животным, перенесшим антенатальную гипоксию, уменьшает выраженность окислительного стресса и нормализует структурные показатели печени 7-суточных белых крыс. Корректирующий эффект неонатального введения неопиатного аналога лей-энкефалина у 7-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию, выражен существенно меньше.

6. Неонатальное введение агониста  $\delta/\mu$ -опиатных рецепторов пептида даларгин частично корректирует последствия антенатальной гипоксии у 60-суточных животных: регистрируется увеличение размеров гепатоцитов на фоне уменьшения выраженности окислительного стресса на тканевом и сис-

темном уровне.

7. Неонатальное введение неопиатного аналога лей-энкефалина нивелирует последствия антенатальной гипоксии у 60-суточных животных. Неопиатный аналог лей-энкефалина является перспективным средством коррекции ранних и отдаленных постгипоксических изменений гепатоцитов у млекопитающих.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АКМ – активированные кислородные метаболиты
- АНГ – антенатальная гипоксия
- АОЗ – антиоксидантная защита
- ЗВУР – задержка внутриутробного развития
- ИМ – интенсивность метки
- ИМЯ – индекс меченых ядер
- НАЛЭ – неопиатный аналог лей-энкефалина
- ОП – опиоидные пептиды
- ОР – опиатные рецепторы
- ОС – окислительный стресс
- ПОЛ – перикисное окисление липидов
- РП – регуляторные пептиды
- СРО – свободнорадикальное окисление
- ХМЛ – хемиллюминесценция
- ЯОР – ядрышкообразующие районы хромосом
- Акт- киназа, изолированная из AKR thymoma cell line
- Bax - Bcl-associated X- protein
- Bcl-2 -- B-cell lymphoma protein-2
- cNOS – constitutive NO-synthase
- EGF - epidermal growth factor
- ERK1/2 - extracellular-signal-regulated kinase IGF – insulin-like growth factors
- iNOS – inducible NO-synthase
- JAK2 - Janus kinase
- MPT-пора –Mitochondrial Permeability Transition pore
- NF-κB – nuclear factor kappa B
- NO – nitric oxide
- NOS – nitric oxide synthase
- OGF – Opioids Growth Factor

PI3K - phosphatidylinositol 3-kinase

PKC - protein kinase C

Raf-1-- rapidly accelerated fibrosarcoma серин/треонин протеинкиназа

Ras -rat sarcoma protein

Src - sarcoma tyrosine kinase

МАРК - mitogen-activated protein kinase

MER-МАРК- kinase

$\delta$ -ОР – дельта-опиатные рецепторы

$\kappa$ -ОР – каппа-опиатные рецепторы

$\mu$ - ОР – мю-опиатные рецепторы

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия [Текст] / Г. Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 383 с.
2. Активность изоформ холестеролэстеразы и щелочной фосфотазы сыворотки крови при некоторых поражениях печени [Текст] / Б. П. Суринов, Т. С. Смагина, И. А. Румянцева, А. П. Иващенко // Вопросы мед. химии. - 1974. - Т. 20, № 2. - С. 151-154.
3. Алекминская, Л. А. Взаимоотношения энкефалинов с симпатико-адреналовой системой при острой ишемии миокарда в эксперименте [Текст] / Л. А. Алекминская, Б. Ю. Кондратьева, В. Д. Слепукин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1986. - № 1. - С. 16-18.
4. Алексеенко, С. А. Влияние блокаторов H<sub>2</sub>-рецепторов гистамина и даларгина на репаративные процессы в слизистой оболочке гастродуоденальной системы у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки [Текст] / С. А. Алексеенко, С. С. Тимошин // Клинич. медицина. - 1996. - Т. 74, № 9. - С. 52-54.
5. Арутюнян, А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма : метод. рекомендации [Текст] / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. - СПб., 2000. - 45 с.
6. Ашмарин, И. П. Перспективы практического применения и некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов [Текст] / И. П. Ашмарин // Вопр. мед. химии. - 1984. - Т. 30. - С. 2-7.
7. Балдина, Н. Ю. Геморрагическая болезнь новорожденных – нозология с проблемами в диагностике и лечении [Текст] / Н. Ю. Балдина, И. И. Спичак // Педиатрический вестник Южного Урала. -2014. - № 1-2. - С. 83-90.
8. Бебякова, Н. А. Влияние структурной модификации молекулы даларгина на вазоактивный эффект пептида при остром стрессе [Текст] / Н. А. Бебякова, С. Н. Левицкий, И. А. Шабалина // Fundamental research. - 2011. - № 12. - С. 704-707.

9. Биоамины мозга и поведение потомства после антенатальной гипоксии: эффекты пептидных нейромодуляторов [Текст] / М. В. Маслова, А. С. Маклакова, А. В. Граф [и др.] // Нейрохимия. - 2001. - Т. 18, № 3. - С. 212-215.
10. Биохимические критерии в оценке эффективности применения да-ларгина в комплексной терапии больных гепатитом А [Текст] / О. В. Щепилова, Г. С. Томилка, О. А. Лебедько [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. - 2008. - № 3. - С. 25-27.
11. Бобков, Ю. И. Адаптационные внутриклеточные механизмы регуляции энергетического гомеостаза при прерывистой нормобарической гипоксии [Текст] / Ю. И. Бобков, Н. П. Лебкова, А. Я. Чижов // Российский физиологический журнал. - 1999. - № 3. - С. 403-441.
12. Бокова, Т. А. Неалкогольная жировая болезнь печени и метаболический синдром у детей: клинко-патогенетические взаимосвязи [Текст] / Т. А. Бокова // Лечащий врач. – 2014. - № 5. – С. 64-68.
13. Бокова, Т. А. Патология гепатобилиарной системы у детей и подростков с ожирением и метаболическим синдромом [Текст] / Т. А. Бокова, Н. И. Урсова // Врач. - 2011. - № 1. - С. 56–58.
14. Болотова, Н. В. Особенности формирования метаболического синдрома у детей и подростков [Текст] / Н. В. Болотова, С. В. Лазебникова, А. П. Аверьянов // Педиатрия. - 2007. – Т. 86, № 3. – С. 35-39.
15. Брагин, Е. О. Опиоидные и моноаминовые механизмы регуляции функций организма в экстремальных условиях. Итоги науки и техники [Текст] / Е. О. Брагин, В. В. Яснецов. - М., 1991. - Т. 41. - 181 с.
16. Бродский, В. Я. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка [Текст] / В. Я. Бродский, И. В. Урываева. - М. Наука, 1981. – 259 с.
17. Буеверов, А. О. Многоликий стеатогепатит [Текст] / А. О. Буеверов // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. - 2012. - № 3. – С. 3-9.

18. Буеверов, А. О. Окислительный стресс и его роль в повреждении печени [Текст] / А. О. Буеверов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2002. – Т. 12, № 4. - С. 21-25.
19. Бурдули, Г. М. Репродуктивные потери (клинические и медико-социальные аспекты) [Текст] / Г. М. Бурдули, О. Г. Фролова. - М.: Триада Х, 2012. - 188 с.
20. Вахитова, Л. Ф. Состояние показателей мембранолиза и липидного обмена у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, и методы коррекции [Текст] : автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Казань, 2004. – 11 с.
21. Взаимосвязь между содержанием гликогена в гепатоцитах и их размером в нормальной и цирротической печени крыс [Текст] / Н. Н. Безбородкина, А. А. Вахтина, Е. В. Бойдюк [и др.] // Цитология. - 2009. – Т. 51, № 5. - С. 417–425.
22. Виноградов, В. А. Даларгин – наиболее активный синтетический аналог эндогенных опиоидов для лечения язвенной болезни [Текст] / В. А. Виноградов, В. М. Полонский // Бюлл. ВКНЦ АМН СССР. – 1986. – № 2. – С. 62-63.
23. Висмонт, А. Ф. Об участии аргиназы печени в процессах детоксикации, регуляции уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови и температуры тела при эндотоксиновой лихорадке [Текст] / А. Ф. Висмонт, Л. М. Лобанок // Новости медико-биологических наук. – 2011. – Т. 3, № 2. – С. 158–162.
24. Влияние антенатальной гипоксии на некоторые структурно-функциональные показатели головного мозга белых крыс в раннем периоде постнатального онтогенеза [Текст] / Е. Н. Сазонова, А. А. Симанкова, С. Ю. Крыжановская, С. С. Тимошин // Дальневост. медиц. журнал. – 2011. - № 4. – С. 86-89.
25. Влияние антенатальной гипоксии на поведенческие реакции половозрелых белых крыс [Текст] / Е. Н. Сазонова, А. А. Симанкова, О. А. Лебедько [и др.] // Бюлл. exper. биол. и медиц. – 2011. - № 4. – С. 89-92.

26. Влияние антенатальной гипоксии на тканевой гомеостаз миокарда белых крыс: ранние и отдаленные последствия [Текст] / С. И. Зубенко, Янь Лю, М. О. Жульков [и др.] // Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 2014. – Т. 157, № 3. – С. 294-298.

27. Влияние аргинин содержащего мю – дельта- агониста опиатных рецепторов седатина на процессы синтеза ДНК в эпителии фундального отдела желудка белых крыс [Текст] / М. Ю. Флейшман, А. В. Кузнецов, В. И. Дейгин, С. С. Тимошин // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2004. – Т. 137, № 3. – С. 235-237.

28. Влияние даларгина на аминокислотный спектр гомогената печени у крыс с экспериментальным перитонитом [Текст] / А. И. Бобков, В. И. Кравцов, В. В. Макаровский, И. И. Семавин // Нейропептиды в эксперименте и клинической практике. Сб. науч. трудов. – Томск, 1989. - С. 73-75.

29. Влияние даларгина на показатели окислительного стресса при операциях коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения [Текст] / Л. Г. Князькова, В. В. Ломиворотов, Т. А. Могутнова, Л. Б. Патрушев // Патол. кровообр. и кардиохир. – 2007. - № 4. – С. 21–26.

30. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии [Текст] / Л. Т. Таджибова, М. Д. Астаева, Ж. Г. Исмаилова [и др.] // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2010. – Т. 150, № 9. – С. 271–274.

31. Влияние опиоидного пептида даларгина и дез-тир-даларгина на насосную функцию сердца в условиях ишемии-реперфузии [Текст] / Т. В. Ласукова, Л. Н. Маслов, Ю. К. Подоксенов [и др.] // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2004. - Т. 137, № 1. - С. 35-38.

32. Влияние пептидного морфогена гидры на постгипоксические нарушения у крысят, подвергнутых пренатальной гипоксии [Текст] / О. А. Лебедево, Т. В. Яценко, С. С. Тимошин, А. Ю. Рубина // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1997. – Т. 123, № 3. - С. 269-272.

33. Влияние синтетических аналогов дерморфина на тканевой гомеостаз миокарда новорожденных белых крыс [Текст] / С. Ю. Крыжановская, О. А.

Лебедько, Е. Н. Сазонова [и др.] // Бюлл. Экспер. биол. и мед. – 2007. - № 10. - С. 413-416.

34. Влияние синтетических энкефалинов на синтез простагландинов и перекисное окисление липидов в изолированном сердце при активации свободнорадикальных процессов [Текст] / Ю. Б. Лишманов, Т. Ю. Реброва, С. А. Афанасьев, А. И. Кравченко // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1992. - № 11. – С. 468-470.

35. Влияние синтетического аналога лей-энкефалина, даларгина, на метаболизм и кровоснабжение печени в условиях острой кровопотери у крыс [Текст] / Г. К. Золоев, В. С. Павленко, И. В. Бобров [и др.] // Пат. физиол. и эксп. тер. - 1988. - № 3. - С. 48-51.

36. Влияние трансплантации фетальных тканей на репаративные процессы при экспериментальном циррозе печени [Текст] / А. Н. Батанов, Л. Я. Эберт, С. А. Пышкин, П. Г. Димов // Бюлл. экспер. биол. - 2000. - Т. 130, № 8. - С. 216-219.

37. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза [Текст] / Н. В. Рязанцева, Е. Г. Старикова, Л. А. Таширева [и др.] // Цитология. - 2012 – Т. 54, № 2. - С. 105-111.

38. Внутритрубочное программирование заболеваний человека: от адаптации к патологии [Текст] / П. Б. Цывьян, Н. В. Башмакова, Т. В. Маркова [и др.]. – Екатеринбург, 2007. – 72 с.

39. Волков, М. С. Активация транскрипционного фактора NF-κB в клетках гепатом под действием канцерогенных полициклических ароматических углеводородов [Текст] / М. С. Волков, В. А. Кобляков // Цитология. – 2011. - Т. 53, № 5. - С. 418-422.

40. Гармашева, Н. Л. Патофизиологические основы охраны внутриутробного развития человека [Текст] / Н. Л. Гармашева, Н. Н. Константинова. - Л. : Медицина, 1985. – 160 с.

41. Герелюк, И. П. Циркуляторная гипоксия в плаценте крыс при остром эмоционально-болевым стрессе и ее коррекция [Текст] / И. П. Герелюк, С. Н. Масляк // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. Материалы 2-й Всесоюз. конф. – Гродно, 1991. - С. 410-411.

42. Герок, В. Заболевания печени и желчевыделительной системы [Текст] / Вольфганг Герок, Хуберт Е. Блюм ; пер. с нем. ; под общ. ред. акад. РАМН В.Т.Ивашкина, проф. А.А.Шептулина. – М. : МЕДпресс- информ, 2009. – 200 с.

43. Гончарова, Е. Н. Влияние аналога лей-энкефалина даларгина на синтез ДНК в миокарде и эпителии языка белых крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза [Текст] / Е. Н. Гончарова, С. С. Тимошин, Т. В. Яценко // Бюлл. exper.биол. и мед. - 1997. – Т. 123, № 1. - С. 43-45.

44. Гречанина, Е. Я. Наследственные нарушения метаболизма (продолжение) [Текст] / Е. Я. Гречанина // Здоровье Украины. - 2003. - № 82. - С. 4-5.

45. Гумерова, А. А. Гисто- и цитогенез печени человека и крысы в ходе пренатального развития и репаративной регенерации [Текст] : автореф. дис. ... докт. мед. наук. - Казань, 2012. – 230 с.

46. Гумерова, А. А. Экспрессия маркеров различных типов клеток печени на ранних этапах пренатального развития человека [Текст] / А. А. Гумерова, М. А. Титова, А. П. Киясов // Цитология. - 2007. - Т. 49, № 2. - С. 133-141.

47. Дас, Д. К. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редоксигнализации [Текст] / Д. К. Дас, Н. Молик // Биохимия. – 2004. – Т. 69, Вып. 1. – С. 16-24.

48. Динамика клеточной пролиферации в печени крыс в раннем постнатальном онтогенезе и роль эпидермального фактора роста в организации пролиферативного режима [Текст] / В. Б. Захаров, С. Н. Смирнов, С. Г. Мамонтов [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2005. Т. 139, № 5. – С. 585-588.

49. Динамика морфофункциональных нарушений печени у детей, перенесших перинатальную гипоксию, на протяжении первого года жизни [Текст] /

С. Б. Бережанская, Е. В. Ищенко, Е. Я. Каушанская, Е. А. Лукьянова // Педиатрия. - 2013. –Т. 92, № 2. – С. 52-56.

50. Донцов, А. В. Антиоксидантный эффект даларгина у пациентов с ишемической болезнью сердца и метаболическим синдромом [Текст] / А. В. Донцов // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2015. –Т. 78, № 7. – С. 3-6.

51. Држевецкая, И. А. Основы физиологии обмена веществ и эндокринной системы [Текст] / И. А. Држевецкая. - М.: Высш. школа, 1994. – 255 с.

52. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты [Текст] / Е. Е. Дубинина. – СПб.: Издательство медицинская пресса, 2006. – 400 с.

53. Дуданова, О. П. Повреждение паренхимы и нарушение перфузии печени в прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени [Текст] / О. П. Дуданова, И. А. Белавина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. - Т. 108, № 8. – С. 41–45.

54. Дудченко, А. М. Параметры аденилатного пула как предикторы нарушений энергетического обмена в гепатоцитах при гипоксии [Текст] / А. М. Дудченко, Л. Д. Лукьянова // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2003. - № 7. - С. 41-44.

55. Евсеенко, Д. А. Изменения в фетоплацентарном комплексе при острой и хронической внутриутробной гипоксии [Текст] / Д. А. Евсеенко, Ю. В. Ещенко // Педиатрия. - 2002. - № 1. - С. 5-9.

56. Ельчанинов, А. В. Морфологическая характеристика репаративной регенерации фетальной печени крыс [Текст] : дисс. ... канд. мед. наук. - М., 2011. - 111 с.

57. Епифанова, О. И. Метод автордиографии в изучении клеточных циклов [Текст] / О. И. Епифанова. – М.: Наука, 1969. – 119 с.

58. Ермолова, Т. В. Неалкогольная жировая болезнь печени: современный взгляд на проблему [Текст] / Т. В. Ермолова, С. Ю. Ермолов, Е. Л. Беляева // Эффективная фармакотерапия. – 2016. - № 5. – С. 26-35.

59. Ещенко, О. И. Морфологические изменения в плаценте и печени при гипоксии плода [Текст] / О. И. Ещенко, Л. Г. Мартыненко // Врачебное дело. - 1988. - № 10. - С. 67-70.
60. Животова, Е. Ю. Влияние структурных и аналогов лей-энкефалина на процессы синтеза ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка белых крыс [Текст] / Е. Ю. Животова, О. А. Лебедько, С. С. Тимошин // Дальневосточный медицинский журнал. - 2012. - № 1. - С. 109-112.
61. Животова, Е. Ю. Участие регуляторных пептидов в поддержании тканевого гомеостаза слизистой оболочки желудка [Текст] : дисс. ...докт. мед. наук. - Владивосток, 2014. – 276 с.
62. Журавин, И. А. Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии [Текст] / И. А. Журавин, Н. М. Дубровская, Н. Л. Туманова // Рос. физиол. журнал. - 2003. - Т. 89, № 5. - С. 522-532.
63. Журавлев, В. А. Большие и предельно большие резекции печени [Текст] / В. А. Журавлев. - Саратов, 1986. – 197 с.
64. Завадская, Е. Э. Цитологические механизмы репаративного роста печени в условиях ее хронического повреждения и частичной гепатэктомии [Текст] : автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Л., 1989. - 22 с.
65. Зайцев, С. В. Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы [Текст] / С. В. Зайцев, К. Н. Ярыгин, С. Д. Варфоломеев. - М., 1993. - 256 с.
66. Западнюк, И. П. Лабораторные животные [Текст] / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. - Киев : Вища школа, 1974. - 304 с.
67. Зиматкин, С. М. Сравнительная анатомия печени и желчевыводящих путей человека и крысы [Текст] / С. М. Зиматкин, Н. И. Марковец // Вестник ВГМУ. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 18-23.
68. Значение мю- и дельта- опиатных рецепторов в реализации действия энкефалинов на течение гипоксической гипоксии [Текст] / Г. К. Золоев, Е. С. Аргентаев, И. В. Боброва [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1992, а. - № 11. - С. 507-510.

69. Зозуля, А. А. Опиоиды и иммунитет [Текст] / А. А. Зозуля, С. Ф. Пшеничкин // Итоги науки и техники. Иммунология. - М., 1990. - Т. 25. - С. 48-121.

70. Иванова, А. С. Роль оксида азота и альфа-токоферола в системе мать-плод и постнатальном эритроцитарном системогенезе при нарушении маточно-плацентарного кровообращения у белых крыс [Текст] : автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – Иваново, 2014. – 269 с.

71. Измestьева, К. А. Современные представления о компенсаторно-приспособительных реакциях в функциональной системе «мать-плацента-плод» (обзор литературы) [Текст] / К. А. Измestьева, Н. Р. Шабuнина-Басок // Уральский медицинский журнал. – 2010. - №05(70). - С. 17-23.

72. Исследование деградации пептидов в сыворотке крови методом 1НЯМР [Текст] / О. Л. Исакова, Н. Ф. Сепетов, Ж. Д. Беспалова [и др.] // Биоорганич. химия. – 1986. – Т. 12, № 1. – С. 106-111.

73. Исследование полиплоидизации гепатоцитов при некоторых хронических заболеваниях печени у человека [Текст] / Б. Н. Кудрявцев, М. В. Кудрявцева, Г. А. Сакута [и др.] // Цитология. - 1993. - Т. 35, № 5. – С. 70-83.

74. Исследования органопротекторного эффекта опиоидного пептида даларгина на поджелудочную железу и печень в эксперименте [Текст] / Р. И. Короткина, Е. П. Фомченков, В. П. Григорьевский [и др.] // Биохимические проблемы хирургии : сб. науч тр. - Москва, 1991. - С. 22-26.

75. Ищенко, Е. В. Диагностика и прогноз морфофункциональных изменений гепатобилиарной системы у детей первого года жизни из группы высокого перинатального риска [Текст] : автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Е. В. Ищенко. - Ростов-на-Дону, 2006. – 16 с.

76. К вопросу о некоторых молекулярных механизмах антиоксидантного действия даларгина на печень в условиях холестаза в эксперименте [Текст] / Р. И. Короткина, Е. П. Фомченков, В. И. Андреев [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1992.– № 1. – С. 38-40.

77. Калинин, В. Ю. Влияние даларгина на функциональное состояние печени в условиях острой гипоксии [Текст] : дисс. ... канд. биол. наук. - Ульяновск, 2000. – 135 с.
78. Карлсон, Б. М. Основы эмбриологии по Пэттену [Текст] / Б. М. Карлсон. - М. : Мир, 1983. – 357 с.
79. Кельмансон, И. А. Отсроченный риск кардиоваскулярной патологии, ассоциированный с малой массой тела при рождении [Текст] / И. А. Кельмансон // Росс. вестник перинат. и педиатрии. - 1999. - № 2. - С. 12-18
80. Кинетика клеточной популяции паренхимы печени человека в разные периоды его жизни [Текст] / Б. Н. Кудрявцев, М. В. Кудрявцева, Г. А. Сакута, Г. И. Штейн // Цитология. - 1991. - Т. 33, № 8. - С. 96-108.
81. Клеточное размножение и процессы дифференциации [Текст] / Л. Ф. Андреева, А. Г. Десницкий, А. К. Дондуа, Н. А. Лукина. – Л.: Наука, 1983. – 248 с.
82. Клеточные механизмы постнатального роста печени крыс при хроническом воздействии сульфата кадмия и хлорида стронция [Текст] / Т. М. Шахламетова, З. Ж. Мамырбаева, Р. И. Берсимбаев [и др.] // Цитология. – 1998. – Т. 40, № 5 – С. 417-431.
83. Коган, М. Е. Определение количества клеток в различных органах и тканях после щелочной диссоциации [Текст] / М. Е. Коган, Л. Н. Белов, Т. А. Леонтьева // Арх. патол. - 1976. - Т. XXXVIII, №1. - С. 77-80.
84. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники [Текст] / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. - СПб.: СпецЛит, 2010. - 95 с.
85. Корнеев, А. А. О формировании индивидуальной резистентности организма к острой гипоксической гипоксии в процессе онтогенеза [Текст] / А. А. Корнеев // Пат. физиология и экспер. терапия. - 1991.- № 1. - С. 41-44.
86. Крыжановская, С. Ю. Влияние внутриутробной гипоксии на процессы пролиферации и свободнорадикального окисления в миокарде белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза [Текст] : автореф. дисс. ... канд. мед. наук / С. Ю. Крыжановская. - Владивосток, 2008. - 22 с.

87. Кузнецова, И. В. Влияние внутриутробной гипоксии на систему мононуклеарных фагоцитов и проявления туберкулезного воспаления в печени в отдаленном постнатальном периоде у мышей оппозитных линий [Текст] : дисс. ... канд. биологич. наук / И. В. Кузнецова. – Новосибирск, 2007. – 144 с.

88. Кургалюк, Н. Н. Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии [Текст] / Н. Н. Кургалюк // Успехи физиол. Наук. - 2002. - Т. 33, № 4. - С. 65-79.

89. Лабораторные методы исследования в клинике [Текст] : справочник / В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Р. П. Золотницкая [и др.]. – М.: Медицина, 1987. - 368 с.

90. Лапаев, Э. В. О допустимых величинах скорости изменения барометрического давления [Текст] / Э. В. Лапаев, Г. И. Тарасенко, В. Н. Чернуха // Военно-медиц. журнал. – 1981. - № 1. - С. 50-51.

91. Ласкова, Г. Ф. Дозозависимое воздействие бупренорфина на фосфолипидный состав плазматических мембран гепатоцитов у кошек при геморрагическом шоке [Текст] / Г. Ф. Ласкова, В. И. Удовиченко // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1994. - №8. - С. 164-165.

92. Лебедева, И. М. Интенсивность транспорта глюкозы к плоду в условиях анемической и гипоксической гипоксии у беременных [Текст] / И. М. Лебедева // Некоторые функции системы «мать – плацента – плод» при гипоксических состояниях у беременных. : сб. науч. трудов. - Фрунзе, 1978. - С. 42–47.

93. Лебедько, О. А. Активные кислородные метаболиты как универсальные мессенджеры процессов сигнальной трансдукции [Текст] / О. А. Лебедько, С. С. Тимошин // Дальневост. медицин. журнал. - 2004. - № 4. - С. 95-98.

94. Лебедько, О. А. Влияние регуляторных пептидов на синтез ДНК в эпителиоцитах и гладких миоцитах респираторного тракта белых крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза [Текст] : автореф. дис... докт. мед. наук / О. А. Лебедько. - Владивосток, 2003. – 46 с.

95. Лебедько, О. А. Применение неопиатного аналога лейэнкефалина и пептидного морфогена гидры для коррекции нарушений пролиферации в эпителии трахеи и процессов ПОЛ в легких новорожденных крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии [Текст] / О. А. Лебедько, С. С. Тимошин // Бюлл. экпер. биол. и мед. – 1994. - № 5. – С. 535-537.

96. Лебедько, О. А. Применение седатина для коррекции нарушений биогенеза активированных кислородных метаболитов в легких и крови новорожденных крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии [Текст] / О. А. Лебедько, О. Е. Гусева, С. С. Тимошин // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2007. – Вып. 24. – С. 37-39.

97. Леонтьева, И. В. Диагностика и лечение метаболического синдрома в практике педиатра [Текст] / И. В. Леонтьева // Доктор Ру. – 2011. № 2 (61). - С. 13–23.

98. Луканская, Е. Н. Особенности кислотно-основного, газового, метаболического состояния крови пуповины при хронической и острой гипоксии плода [Текст] / Е. Н. Луканская // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. - 2013. - № 1. – С. 76-83.

99. Лушников, Е. Ф. Гибель клетки (апоптоз) [Текст] / Е. Ф. Лушников, А. Ю. Абросимов. - М. : Медицина, 2001. - 192 с.

100. Лю, Б. Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма [Текст] / Б. Н. Лю // Успехи совр.биол. - 2001. - Т. 121, № 5. - С. 488-501.

101. Мамаев, Н. Н. Метод оценки белоксинтезирующей функции кардиомиоцитов человека [Текст] / Н. Н. Мамаев, А. Я. Гудкова, Х. К. Аминева // Арх. анат., гистол. и эмбриол. - 1989. - Т. ХСVI, № 5. - С. 69-72.

102. Мамаев, Н. Н. Структура и функция ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты [Текст] / Н. Н. Мамаев, С. Е. Мамаева // Цитология. – 1992. – Т. 34, № 10. – С. 3-15.

103. Масленникова, Н. В. Влияние βказоморфина на процессы синтеза ДНК в клеточных популяциях новорожденных белых крыс [Текст] / Н. В. Мас-

ленникова, Е. Н. Сазонова, С. С. Тимошин // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2008. – Т. 145, № 2. – С. 170-172.

104. Маслова, М. В. Влияние гептапептида семакс на деятельность сердца крыс при острой гипобарической гипоксии в раннем постнатальном периоде [Текст] / М. В. Маслова, Я. В. Крушинская, А. С. Маклакова // Бюлл. эксп. биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, № 2. – С. 161-164.

105. Махинько, В. И. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс [Текст] / В. И. Махинько, В. Н. Никитин // Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. – Киев, 1975. – С. 308-326.

106. Медведев, М. А. Роль  $\mu$ -опиоидных рецепторов в регуляции желчеотделительной функции печени [Текст] / М. А. Медведев, И. В. Рудин, А. Ф. Гараева // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 90-95.

107. Медведев, М. А. Роль опиоидных пептидов в регуляции секретин-стимулированной секреции желчи [Текст] / М. А. Медведев, И. В. Рудин // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 3. – С. 37-41.

108. Медведев, М. А. Роль опиоидных пептидов в регуляции холецистокинин стимулированной секреции желчи [Текст] / М. А. Медведев, И. В. Рудин, А. Ф. Гараева // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2006. – Т. 92, № 11. – С. 136-137.

109. Медведев, М. А. Роль опиоидных рецепторов печени в регуляции желчеотделения [Текст] / М. А. Медведев, И. В. Рудин, А. Ф. Гараева // Бюлл. экспер. биол. и медиц. – 2006. – Т. 142, № 11. – С. 494-496.

110. Мельникова, Н. П. Влияние лигандов опиатных рецепторов на процессы синтеза ДНК в миокарде новорожденных крыс [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед наук / Н. П. Мельникова. – Владивосток, 1998. – 18 с.

111. Мехрякова, И. А. Физиологическая и неонатальная гипербилирубинемии у доношенного новорожденного в условиях свободного грудного вскармливания [Текст] : автореф. дисс. ... канд. мед. наук / И. А. Мехрякова. – Пермь, 2008. – 19 с.

112. Мешкова, Е. М. Влияние антенатальной гипоксии на содержание биогенных аминов в головном мозге и печени плода и новорожденных в эксперименте [Текст] / Е. М. Мешкова, И. К. Томилова, И. В. Абрамова // Фундаментальные исследования. – 2014. - № 10. – С. 1769-1772.

113. Морфологические особенности почек у потомства крыс, подвергшихся влиянию хронической внутриутробной, острой постнатальной и смешанной гипоксии [Текст] / В. Д. Марковский, И. В. Сорокина, М. С. Мирошниченко, А. А. Адейеми // Якутский медицинский журнал. - 2015. – Т. 50, № 2. – С. 94-97.

114. Нагаева, Е. В. «Внутриутробное программирование» гормонально-метаболических процессов и синдром задержки внутриутробного развития [Текст] / Е. В. Нагаева, Т. Ю. Ширяева // Проблемы эндокринологии. - 2010. - № 6. – С. 32-40.

115. Надеев, А. П. Вариантность структурной организации печени, системы мононуклеарных фагоцитов в норме, при инфекционной патологии в перинатальном и постнатальном периоде [Текст] : дисс. ... док. мед. наук / А. П. Надеев. - Новосибирск, 2006. – 245 с.

116. Надеев, А. П. Печень и плацента в перинатальном и постнатальном периодах при патологии: клинично-экспериментальное исследование [Текст] / А. П. Надеев, В. А. Шкурупий, И. О. Маринкин. - Новосибирск: Наука, 2014. – 244 с.

117. Нейропептиды, их роль в физиологии и патологии [Текст] / В. Д. Слепушкин, Г. К. Золоев, В. А. Виноградов, М. И. Титов. - Томск, 1988. - 143 с.

118. Некоторые механизмы участия опиоидных пептидов в регуляции углеводного обмена [Текст] / Г. К. Золоев, И. В. Бобров, Н. И. Хабарова, Н. А. Абисова // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1992, в. - № 3. - С. 257-259.

119. Никольская, Л. А. Медико-социальное значение и программа снижения фетоинфантильных потерь [Текст] / Л. А. Никольская // Росс. вест. перинат. и педиатрии. – 1999. - № 5. - С. 15-18.

120. Новикова, В. П. Неалкогольная жировая болезнь печени в детском возрасте [Текст] : руководство. Библиотека врача-специалиста / В. П. Новикова, Е. И. Алешина, М. М. Гурова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 184 с.

121. О роли синусоидных клеток печени и клеток костного мозга в обеспечении регенераторной стратегии здоровой и поврежденной печени [Текст] / А. В. Ляндуп, Н. А. Онищенко, М. Е. Крашенников, М. Ю. Шагидулин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. - Т. XII, № 1. - С. 78-85.

122. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков [и др.]. – М.: Фирма “Слово”, 2006. – 556 с.

123. Окислительный стресс и антиоксидантная способность у недоношенных новорожденных с перинатальной гипоксией при рождении и на седьмые сутки жизни [Текст] / Ю. В. Кореновский, Е. В. Горбено, О. В. Ремнева [и др.] // Сибирский медицинский журнал. - 2007. - Т. 22, № 1. – С. 19-22.

124. Окислительный стресс и замедление цитохром Р-450-зависимого печеночного метаболизма у больных с приобретенными пороками сердца [Текст] / Л. Г. Князькова, С. С. Михайлов, В. А. Непомнящих [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. - 2009. - № 2. - С. 38-41.

125. Опиатергическое звено антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии на модели ишемии и реперфузии *in vivo* [Текст] / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов [и др.] // Пат. физиол. exper. тер. – 2003. – № 1. – С. 19–21.

126. Опиоиды - триггеры адаптивного феномена ишемического preconditionирования сердца [Текст] / Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, Ю. К. Подоксенов [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2014. - Т. 100, № 9. – С. 993-1007.

127. Орлова, Е. А. Роль NO-синтазы в стимуляции опиатных рецепторов и устойчивости почек к окислительному стрессу [Текст] / Е. А. Орлова, И. А. Комаревцева // Укр. биохим. журн. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 97-102.

128. Особенности обмена катехоламинов в головном мозге и печени плодов и новорожденных крысят, развивавшихся в условиях нарушения маточно-плацентарного кровообращения [Текст] / Е. М. Мешкова, И. К. Томилова, И. В. Абрамова, Т. В. Кислякова // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2015. - Т. 20, № 1. – С. 18-22.

129. Острая гипоксия в период органогенеза изменяет баланс вегетативной регуляции сердца у беременных самок крыс [Текст] / М. В. Маслова, А. В. Граф, А. С. Маклакова [и др.] // Бюлл. exper. биологии и медицины. - 2005. – Т. 139, № 2. - С. 147-149.

130. Паюшина, О. В. Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени [Текст] / О. В. Паюшина, Е. И. Домарацкая, В. И. Старостин // Цитология. - 2012. – Т. 54, № 5. – С. 369-380.

131. Перинатальная смертность в Российской Федерации. Возможные пути ее снижения [Текст] / О. Г. Фролова, М. П. Шувалова, Т. К. Гребенник, Н. В. Долгушина // Акушерство и гинекология. - 2012. - № 6. – С. 47-51.

132. Пинаева, О. Г. Влияние опиоидных пептидов на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени новорожденных белых крыс [Текст] / О. Г. Пинаева, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Дальневост. медицин. журнал. - 2014. - № 2. - С. 85-89.

133. Подымова, С. Д. Болезни печени [Текст] : руководство. — 4-е изд., перераб. и доп. / С. Д. Подымова. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — 768 с.

134. Полонский, В. М. Протективное действие даларгина и гексапептида П-156 при экспериментальном поражении печени у крыс и мышей [Текст] / В. М. Полонский, В. А. Тищенко, Г. И. Позднякова // Нейропептиды в экспериментальной и клинической практике : сб. науч. труд. - Томск, 1989. – С. 69-73.

135. Полячикова, О. Л. Клинико-биохимические критерии диагностики задержки развития плода [Текст] / О. Л. Полячикова, Г. М. Бордули // Акушерство и гинекология. – 2009. - № 2. – С. 34.

136. Пренатальный гипоксический стресс: физиологические и биохимические последствия, коррекция регуляторными пептидами [Текст] / Н. А. Соколова, М. В. Маслова, А. С. Маклакова, И. П. Ашмарин // Успехи физиол. наук. – 2002. – Т. 33, № 2. - С. 56-67.

137. Пролиферативная активность и генерация супероксид-анион-радикала в первичной культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию [Текст] / Е. Н. Сазонова, О. А. Лебедько, Ю. Б. Малофей [и др.] // Дальневост. мед. журнал. – 2012. - № 4. – С. 99-102.

138. Протопопова, Н. В. Состояние фетальной гемодинамики и закономерности ее изменений в условиях антенатальной гипоксии и задержки внутриутробного развития плода [Текст] / Н. В. Протопопова, Е. В. Одареева, Н. Н. Бондаренко // Сибирский медицинский журнал. – 2012. - № 7. – С. 39-42.

139. Пятышкина, Н. А. Характеристика морфофункционального состояния системы мать-плацента-плод у экспериментальных животных в процессе адаптации к гипоксиям различного генеза [Текст] : дис. ... канд. Биол. наук / Н. А. Пятышкина. - Екатеринбург, 2008. – 157 с.

140. Радивоз, М. И. Влияние дерморфина на процессы клеточного деления в эпителии роговицы и языка белых крыс [Текст] / М. И. Радивоз, Е. И. Мельник, С. С. Тимошин // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1991. - № 8. – С. 162-164.

141. Радивоз, М. И. Участие лигандов опиоидных рецепторов в регуляции клеточного деления в эпителиальных тканях организма [Текст] : автореф. дис. ... докт. мед. наук / М. И. Радивоз. - Владивосток, 1999. – 48 с.

142. Распределение эмбриональных фибробластов крысы по фазам клеточного цикла в присутствии ингибиторов образования активных форм кислорода и N-ацетилцистеина [Текст] / И. А. Гамалей, Ю. С. Полозов, К. М. Кирпичникова [и др.] // Цитология. – 2001. – Т. 43, № 7. – С. 633-637.

143. Реброва, Т. Ю. Регуляторное влияние опиоидных пептидов на активность антиокислительных ферментов и систему простаноидов в миокарде

при стрессе [Текст] / Т. Ю. Реброва, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов // Биомедицинская химия: научно -практический журнал (НИИ биомед. химии РАМН г. Москва). – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 177-184.

144. Регуляция гомеостаза кислорода. Фактор, индуцированный гипоксией (HIF) и его значение в гомеостазе кислорода [Текст] / А. А. Левина, А. Б. Макешова, Ю. И. Мамукова [и др.] // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 4. – С. 92-97.

145. Резников, А. Г. Участие эндогенных опиоидов в патогенезе ранних нейроэндокринных проявлений синдрома пренатального стресса [Текст] / А. Г. Резников, Н. Д. Носенко, Л. В. Тарасенко // Бюл.экспер. биол. и медицины. - 2003.- Т. 135, № 5. - С. 497-499.

146. Ретровирусные репортерные системы для оценки активности стрессовых сигнальных путей контролируемых факторами транскрипции p53, HIF-1 и HSF-1 [Текст] / О. В. Разоренова, Л. С. Агапова, А. В. Буданов [и др.] // Молекул. биол. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 286–293.

147. Роль  $K_{ATP}$ -каналов в реализации кардиопротекторного действия агонистов мю-опиоидных рецепторов при острой ишемии и реперфузии изолированного сердца / Л. Н. Маслов, Т. В. Ласукова, Н. В. Соленкова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2001. – Т. 64, № 5. – С. 23-27.

148. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе [Текст] / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, Н. Ю. Часовских [и др.] // Цитология. – 2009 – Т. 51, № 4. - С. 329-334.

149. Рудин, И. В. Влияние даларгина на желчеотделительную функцию печени [Текст] / И. В. Рудин // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - № 1. - С. 21-25.

150. Рудин, И. В. Опиоидные пептиды модулируют секрецию основных детерминант желчотока [Текст] / И. В. Рудин, М. А. Медведев // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1997. – Т. 123, № 5. – С. 498-500.

151. Рудин, И. В. Роль опиоидных пептидов в регуляции желчеотделения при интактной и изолированной печени [Текст] / И. В. Рудин, М. А. Медведев // Бюлл. сибирской медицины. - 2006. - № 3. - С. 125-127.

152. Рыжавский, Б. Я. Состояние важнейших систем в эмбриогенезе: отдаленные последствия [Текст] / Б. Я. Рыжавский. - Хабаровск: Издательство Хабаровского краевого центра психического здоровья, 1999. – 203 с.

153. Саватеев, А. В. Апоптоз - универсальный механизм гибели и выживания при ишемии и реперфузии. Пути фармакологического контроля [Текст] / А. В. Саватеев, Т. Н. Саватеева-Любимова // Эксперим. клин. фармакол. - 2010. – Т. 73, № 12. – С. 44-49.

154. Савченков, Ю. И. Очерки физиологии и морфологии функциональной системы мать–плод [Текст] / Ю. И. Савченков, К. С. Лобынцев. – М. : Медицина, 1980. - С. 72-105.

155. Сазонова, Е. Н. Влияние регуляторных пептидов на процессы пролиферации в различных клеточных популяциях белых крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза [Текст] : дис. д-ра мед. наук : 03.00.25 / Е. Н. Сазонова. - Хабаровск, 2004. – 284 с.

156. Сакута, Г. А. Клеточные механизмы регенерации циррозной печени крыс. I. Соотношение процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток после прекращения хронического воздействия СС14 [Текст] / Г. А. Сакута, Б. Н. Кудрявцев // Цитология. - 1996. – Т. 38, № 11. – С. 1158-1171.

157. Сакута, Г. А. Клеточные механизмы регенерации циррозной печени крыс. II. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов [Текст] / Г. А. Сакута, Б. Н. Кудрявцев // Цитология. - 2005. – Т. 47, № 5. – С. 379-387.

158. Самарина, Е. Ю. Коррекция опиоидным пептидом седативных постгипоксических нарушений тканевого гомеостаза различных клеточных популяций белых крыс [Текст] / Е. Ю. Самарина, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Дальневосточный медицинский журнал. - 2016. - № 2. – С. 89-92.

159. Саркисов, Д. С. Морфология компенсаторно-приспособительных процессов [Текст] / Д. С. Саркисов, Л. И. Аруин, В. П. Туманов // Итоги науки и техники: Сер. Патологическая анатомия / ВИНТИ. – 1983. – Т. 4. – С. 1-135.

160. Саркисов, Д. С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций [Текст] : руководство / Д. С. Саркисов; под ред. Д. С. Саркисова. - М.: Медицина, 1987. - 448 с.

161. Свободные радикалы в живых системах [Текст] / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев [и др.] // Биофизика (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). - 1991. - Т. 29. – С. 28-31.

162. Сепетлиев, Д. А. Статистические методы в научных медицинских исследованиях [Текст] / Д. А. Сепетлиев. – М.: Медицина, 1968. – 419 с.

163. Сергеев, П. В. Рецепторы физиологически активных веществ [Текст] / П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский. - М. : Медицина, 1987. – 400 с.

164. Серов, В. Н. Практическое акушерство: руководство для врачей [Текст] / В. Н. Серов, А. Н. Стрижаков, С. А. Маркин. - М.: Медицина, 1989. – 512 с.

165. Сигнальный механизм кардиопротекторных эффектов опиоидов [Текст] / Л. Н. Маслов, Л. Хануш, А. В. Крылатов [и др.] // Эксперим. и клин. фармакол. – 2013. - Т. 76, № 3. – С. 41-48.

166. Симанкова, А. А. Влияние регуляторных пептидов семейства опиоидов на ранние постнатальные церебральные последствия антенатальной гипоксии [Текст] / А. А. Симанкова, О. А. Лебедько, Е. Н. Сазонова // Дальневосточн. мед. журнал. – 2014. - № 4. – С. 76–80.

167. Система неопиатных пептидов в раннем неонатальном периоде [Текст] / Т. К. Набухотный, Т. В. Колесник, В. П. Павлюк [и др.] // Охрана материнства и детства. – 1992. – № 10-11. – С. 16-18/

168. Слепушкин, В. Д. Использование даларгина в отечественной онкологии [Текст] / В. Д. Слепушкин, А. А. Николаев // Паллиативная медицина и реабилитация. - 2004. - № 1. - С. 5-10.

169. Смагин, В. Г. Лиганды опиатных рецепторов [Текст] / В. Г. Смагин, В. А. Виноградов, С. А. Булгаков. – М.: Медицина, 1983. – 272 с.

170. Смахтин, М. Ю. Влияние регуляторных пептидов на гепатоцеллюлярные и иммунную функции организма [Текст] : дисс. ... докт. биол. наук / М. Ю. Смахтин. - Курск, 2004. –290 с.

171. Солин, А. В. Влияние опиоидных пептидов на изменения липидного обмена у крыс, перенесших плавательный стресс [Текст] / А. В. Солин, А. Ю. Ляшев, Ю. Д. Ляшев // Бюл. exper. биол. и медиц. – 2016. - Т. 162, № 9. – С. 291-294.

172. Солин, А. В. Влияние опиоидных пептидов на перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных ферментов у крыс, перенесших плавательный стресс [Текст] / А. В. Солин, Ю. Д. Ляшев // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101, № 8. - С. 929-935.

173. Солин, А. В. Влияние опиоидных пептидов на процессы перекисного окисления липидов при длительном стрессе [Текст] / А. В. Солин, Ю. Д. Ляшев // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. – № 8. – С. 1016-1020.

174. Солин, А. В. Гепатопротективное действие регуляторных пептидов при иммобилизационном стрессе [Текст] / А. В. Солин, В. И. Корозин, Ю. Д. Ляшев // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 20, Вып. 22 (141). – С. 123-126.

175. Соловьева, Н. Б. Нарушение гемокоагуляции и их коррекция у новорожденных, перенесших острую и хроническую гипоксию [Текст] / Н. Б. Соловьева // Педиатрия. - 1986. - № 7. - С. 20-22.

176. Стародубов, В. И. Репродуктивные потери как медико-социальная проблема демографического развития России [Электронный ресурс] / В. И. Стародубов, Л. П. Суханова, Ю. Г. Сыченков // Социальные аспекты здоровья населения : электронный научный журнал. (Дата обращения: 01.02.2012).

177. Студеникин, М. Я. Гипоксия плода и новорожденного [Текст] / М. Я. Студеникин. - М. : Медицина, 1984. – 222 с.

178. Субботина, Т. И. Ультраструктурные изменения гепатоцитов как показатель тяжести функциональных нарушений печени [Текст] / Т. И. Субботина // Вестник новых медицинских технологий. - 1997. – Т. IV, № 4 – С. 42-46.

179. Тимошин, С. С. Влияние даларгина на пролиферативные процессы и вертикальную миграцию клеток эпителия роговицы при стрессе [Текст] / С. С. Тимошин, С. И. Швец, Н. И. Бережнова // Бюл. exper. биол. и мед. – 1990. – Т. 109, № 2. – С. 189-191.

180. Terminologia Histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов [Текст] / под ред. чл.-корр. РАМН В.В. Банина и проф. В.Л. Быкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 272 с.

181. Урываева, И. В. Клеточное размножение и полиплоидия в печени [Текст] : автореф. дис. ... докт. мед. наук / И. В. Урываева. - М., 1988. - 31 с.

182. Усынин, И. Ф. Механизмы формирования фенотипической гетерогенности гепатоцитов [Текст] / И. Ф. Усынин, Л. Е. Панин // Биохимия. - 2008. - Т. 73, № 4. – С. 453-468.

183. Уткина, Л. И. Изменения в печени потомства белых крыс под влиянием внутриутробной хронической гипоксии [Текст] / Л. И. Уткина, С. С. Тимошин // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 1990. - № 11. – С. 541-543.

184. Уткина, Л. И. Профилактика и коррекция с помощью неопиатного аналога лей-энкефалина нарушений, индуцируемых в печени потомства белых крыс пренатальной гипоксией [Текст] / Л. И. Уткина, С. С. Тимошин // Бюл. exper. биол. и медиц. - 1991. - Т. СХII, № 9. - С. 296-298.

185. Участие опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии [Текст] / Н. В. Нарыжная, С. Ю. Цибульников, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов // Сибирский медицинский журнал. - 2013. – Т. 28, № 4. – С. 102-106.

186. Участие факторов транскрипции p53 и NF-κB в редоксзависимых механизмах нарушения апоптоза мононуклеарных лейкоцитов [Текст] / В. В.

Новицкий, Н. В. Рязанцева, Н. Ю. Часовских [и др.] // Вестник РАМН. – 2009. № 4. - С. 3-7.

187. Федорова, М. Ф. Патогенез гипоксии плода и асфиксии новорожденного [Текст] / М. Ф. Федорова // Акушерство и гинекология. – 1983. - № 1. – С. 12-15.

188. Фролова, О. Е. Морфофункциональная характеристика моноцитов. Значение исследования нуклеолярного аппарата [Текст] / О. Е. Фролова // Клинико-лабораторная диагностика. – 1998. - № 10. – С. 3-8.

189. Хазанов, А. И. Функциональная диагностика заболеваний печени [Текст] / А. И. Хазанов. - М.: Медицина, 1989. - 194 с.

190. Хачатурьян, М. Л. Влияние сезона года на устойчивость крыс к гипоксии [Текст] / М. Л. Хачатурьян, Л. А. Панченко // Бюлл. экспери. биол. и медицины. - 2002. – Т. 133, № 3. - С. 348-351.

191. Черкасская, Г. В. Оценка диагностических возможностей различных методов интранатального фетального мониторинга [Текст] : дис. ... канд. мед. наук / Г. В. Черкасская. – Екатеринбург, 2014. - 127 с.

192. Чижов, А. Я. Экологически обусловленный окислительный стресс как фактор онкогенеза [Текст] / А. Я. Чижов, С. К. Пинаев, С. З. Савин // Технологии живых систем. - 2012. - № 1. - С. 47-53.

193. Шарапова, О. В. Основные проблемы и задачи развития российской педиатрии на современном этапе [Текст] / О. В. Шарапова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2003. – № 1. – С. 3–4.

194. Шептулина, А. Ф. Ядерные рецепторы в регуляции транспорта и метаболизма желчных кислот [Текст] / А. Ф. Шептулина, Е. Н. Широкова, В. Т. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2013. – № 5. – С. 32–45.

195. Шмаков, А. Н. Даларгин в интенсивной терапии детей в критических состояниях [Текст] / А. Н. Шмаков, С. В. Данченко, В. А. Касымов // Детская медицина Северо-Запада. - 2012. - Т. 3, № 1. - С. 41-44.

196. Штейн, Г. И. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации [Текст] / Г. И. Штейн, М. В. Кудрявцева, Б. Н. Кудрявцев // Цитология. – 1999. – Т. 41, № 7. – С. 574-579.

197. Штейн, Г. И. Кинетика полиплоидизации гепатоцитов в процессе постнатального развития млекопитающих [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 1991. – 19 с.

198. Шулутко, Б. И. Болезни печени и почек [Текст] / Б. И. Шулутко. - СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского сан.-гиг. мед. ин-та, 1993. - 480 с.

199. Щербаков, Д. Л. Влияние олигопептида на изменения интенсивности перекисного окисления липидов и антиокислительной активности при мобилизационном стресс-воздействии в периферической крови крыс разного возраста [Текст] / Д. Л. Щербаков, В. Н. Мещанинов, С. В. Жарков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. - № 5. – С. 110-115.

200. Яснецов, В. В. Антигипоксические свойства эндорфинов, энкефалинов и их аналогов [Текст] / В. В. Яснецов // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1988. - № 5. - С. 554-558.

201. Яснецов, В. В. Отсроченный антигипоксический эффект лей-энкефалина у мышей [Текст] / В. В. Яснецов // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1988. - № 8. - С. 174-178.

202. Яценко, Т. В. Влияние регуляторных пептидов на синтез ДНК в эпителиях белых крыс в раннем периоде постнатального онтогенеза [Текст] : дисс. ... канд. биологических наук / Т. В. Яценко. - Хабаровск, 1997. – 133 с.

203. [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat [Text] / K. Yamanouchi, K. Yanaga, S. Okudaira [et al.] // J Surg Res. – 2003. - Vol. 114, N 1. – P. 72-77.

204. A bivalent ligand (KMN-21) antagonist for mu/kappa heterodimeric opioid receptors [Text] / S. Zhang, A. Yekkirala, Y. Tang, P. S. Portoghese // Bioorg Med Chem Lett. – 2009. - Vol. 19, N 24. – P. 6978–6980.

205. A pharmacological profile of the novel, peripherally-selective kappa-opioid receptor agonist, EMD 61753 [Text] / A. Barber, G. D. Bartoszyk, H. M. Bender [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 1994. - Vol. 113, N 4. – P. 1317-1327.

206. Activation of the  $\delta$ -opioid receptor inhibits serum deprivation-induced apoptosis of human liver cells via the activation of PKC and the mitochondrial pathway [Text] / B. Tang, Y. Zhang, R. Liang [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2011. - Vol. 28, № 6. - P. 1077-1085.

207. Al-Hasani, R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior [Text] / R. Al-Hasani, M.R. Bruchas // *Anesthesiology.* – 2011. – V. 115, № 6. – P. 1363-1381.

208. Allen, K. J. Liver cell transplantation: The road to clinical application [Text] / K. J. Allen, H. E. Soriano // *J. Lab. Clin. Med.* - 2001. - Vol. 138. - P. 298–312.

209. Allen, W. W. Fetal O<sub>2</sub> changes in response to hypoxic stress: a mathematical model [Text] / W. W. Allen, G. G. Power, L. D. Longo // *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* – 1977. - Vol. 42, N 2. – P. 179-190.

210. Ananthan, S. Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics [Text] / S. Ananthan // *AAPS J.* – 2006. - Vol. 8, N 1. – P. 118–125.

211. Angulo, P. Non-alcoholic fatty liver disease [Text] / P. Angulo // *N. Engl. J. Med.* - 2002. – Vol. 346, N 16. – P. 1221-1231.

212. Antenatal hypoxia induces epigenetic repression of glucocorticoid receptor and promotes ischemic-sensitive phenotype in the developing heart [Text] / F. Xiong, T. Lin, M. Song [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2016. - Vol. 91. – P. 160-171.

213. Anti-mitogenic action of opioid peptides on epidermal growth factor-stimulated uterine cells [Text] / J. L. Kornyei, A. Oszter, K. A. Kovacs [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* - 2001. – Vol. 414, № 2-3. – P. 155-163.

214. Barry, U. Opioids: old drugs for potential new applications [Text] / U. Barry, Z. Zuo // *Curr Pharm Des.* – 2005. - Vol. 11, N 10. – P. 1343–1350.

215. Bartolome, J. V. Role of the spinal cord in intracisternal beta-endorphin-evoked suppression of liver DNA synthesis in 10-day-old rats [Text] / J. V. Bartolome, M. B. Bartolome // *Brain Res.* – 1994. – Vol. 642, № 1-2. – P. 311-315.
216. Bataller, R. Liver fibrosis [Text] / R. Bataller, D. A. Brenner // *J Clin Invest.* – 2005. - Vol. 115, N 2. – P. 209-218.
217. Beath, S. V. Hepatic function and physiology in the newborn [Text] / S. V., Beath // *Semin Neonatol.* - 2003. - Vol. 8, № 5. - P. 337-346.
218. Beckingham, I. J ABC of liver, pancreas and bladder; ed. I. J. Beckingham [Text]. - BMJ Books, 2001. – 56 p.
219. Berkson, B. M. Reversal of signs and symptoms of a B-cell lymphoma in a patient using only low-dose naltrexone [Text] / B. M. Berkson, D. M. Rubin, A. J. Berkson // *Integr Cancer Ther.* – 2007. - Vol. 6, № 3. – P. 293-296.
220. Berlett, B. S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress [Text] / B. S. Berlett, E. R. Stadtman // *J Biol Chem.* – 1997. - Vol. 272, N 33. – P. 20313–20316.
221. Beverley, C. L. The effect of methadone and naloxone on cultured rat liver cells [Text] / C. L. Beverley, P. J. Higgins, E. Borenfreund // *Exp. Cell. Biol.* - 1984. - Vol. 52, N 3. - P. 170-175.
222. Biochemical and morphological alterations of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption [Text] / M. Arai, M. A. Leo, M. Nakano [et al.] // *Hepatology.* - 1984, Vol. 4 (2). – P. 165-174.
223. Brief, intermittent hypoxia restricts fetal growth in Sprague-Dawley rats [Text] / J. E. Schwartz, A. Kovach, J. Meyer [et al.] // *Biol Neonate.* – 1998. - Vol. 73, N 5. – P. 313-319.
224. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period [Text] / E. Gitto, R. J. Reiter, M. Karbownik [et al.] // *Biol. Neonate.* – 2002. - Vol. 81, № 3. – P. 146.
225. Cell Signals Influencing Hepatic Fibrosis [Electronic resource] / M. Cong, K. Iwaisako, C. Jiang, T. Kisseleva // *Int J Hepatol.* – 2012. – DOI: 10.1155/2012/158547.

226. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS [Text] / A. B. Zepeda, A. Jr. Pessoa, R. L. Castillo [et al.] // Cell Biochem Funct. – 2013. - Vol. 31, N 6. – P. 451-459.

227. Central opiate mu-receptor-mediated suppression of tissue protein synthesis [Text] / Y. Hashiguchi, P. E. Molina, S. Dorton [et al.] // Am J Physiol. – 1997. - Vol. 273, N 3. – P. 920-927.

228. Chronic maternal hypoxia retards fetal growth and increases glucose utilization of select fetal tissues in the rat [Text] / F. L. Lueder, S. B. Kim, C. A. Buroker [et al.] // Metabolism. – 1995. – Vol. 44, № 4. – P. 532-537.

229. Chrzanowska, A. Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver [Text] / A. Chrzanowska, B. Gajewska, A. Baranczyk-Kuzma // Acta. Biochim. Pol. - 2009. - Vol. 56, № 3. - P. 465-469.

230. Chuang, L. F. Induction and activation of mitogenactivated protein kinases of human lymphocytes as one of the signaling pathways of the immunomodulatory effects of morphine sulfate [Text] / L. F. Chuang, K. F. Jr. Killam, R. Y. Chuang // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 43. – P. 26815-26817.

231. Croteau, D. L. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells [Text] / D. L. Croteau, V. A. Bohr // J Biol Chem. - 1997. - Vol. 272, N 41. – P. 25409–25412.

232. Decrease in enkephalin levels in psoriatic lesions after calcipotriol and mometasone furoate treatment [Text] / J. B. Nissen, W. W. Avrach, E. S. Hansen [et al.] // Dermatology. - 1999. – Vol. 198, № 1. – P. 11-17.

233. Delta opioid peptide DADLE and naltrexone cause cell cycle arrest and differentiation in a CNS neural progenitor cell line [Text] / S. Y. Tsai, C. T. Lee, T. Hayashi [et al.] // Synapse. – 2010. – Vol. 64, N 4. – P. 267-273.

234. Delta'-1 opioid receptor dependence of acute hypoxic adaptation [Text] / P. Kimberly, K. P. Mayfield, G. Louis, L. G. D'Alecy // The J.Pharmacol, and Exp. The. - 1994. – Vol. 268. N 1. - P. 74-77.

235. Derenzini, M. Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells [Text] / M. Derenzini, F. Farabegoli, D. Trerè // *Histochem J.* – 1992. - Vol. 24, № 12. – P. 951-956.

236. Derenzini, M. The AgNORs [Text] / M. Derenzini // *Micron.* – 2000. – Vol. 31. – P. 117-120.

237. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation [Text] / Theise ND, Badve S, Saxena R [et al.] // *Hepatology.* – 2000. - Vol. 31, N 1. – P. 235-240.

238. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study [Text] / A. P. Kiassov, P. Van Eyken, J. F. van Pelt [et al.] // *Differentiation.* – 1995. - Vol. 59, N 4. – P. 253-258.

239. Developmental changes of (3)H-labelled mu-opioid receptors in brain-stems of intra-uterine growth-restricted rats [Text] / J. Liu, C. Dong, L. Cazin [et al.] // *Brain Res Dev Brain Res.* - 2001.- Vol. 126, № 2. – P. 211-215.

240. Developmental response to hypoxia [Text] / S. T. Huang , K. C. Vo, D. J. Lyell [et al.] // *FASEB J.* - 2004. – Vol. 18. – P. 1348-1365.

241. Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala<sup>2</sup>,Leu<sup>5</sup>,Cys<sup>6</sup>] enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes [Text] / Q. Jiang, A. E. Takemori, M. Sultana [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1991. - Vol. 257, N 3. – P. 1069–1075.

242. Dual regulation of mu opioid receptors in SKNSH neuroblastoma cells by morphine and interleukin1 $\beta$ : evidence for opioid-immune crosstalk [Text] / S. Mohan, R. L. Davis, U. DeSilva, C. W. Stevens // *J. Neuroimmunol.* – 2010. – Vol. 227, № 1-2. – P. 26-34.

243. Durante, W. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function [Text] / W. Durante, F. K. Johnson, R. A. Johnson // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* - 2007. - Vol. 34, № 9. - P. 906-911.

244. Effects of ischemia-hypoxia induced by interruption of uterine blood flow on fetal rat liver and brain enzyme activities and offspring behavior [Text] / Z.

Binienda, R. R. Holson, F. X. Chen [et al.] // *Int J Dev Neurosci.* – 1996. - Vol. 14, N 4. – P. 399-408.

245. Effects of maternal starvation on hepatocyte proliferation in the late gestation fetal rat [Text] / P. A. Gruppuso, J. M. Boylan, P. Anand, T. C. Bienieki // *Pediatr Res.* – 2005. - Vol. 57, № 2. - P. 185-191.

246. Endogenous opioids modulate the growth of the biliary tree in the course of cholestasis [Text] / M. Marzioni, G. Alpini, S. Saccomanno [et al.] // *Gastroenterology.* - 2006. - Vol. 130. – P. 1831–1847.

247. Farías, J. G. Melatonin protects the heart, lungs and kidneys from oxidative stress under intermittent hypobaric hypoxia in rats [Text] / J. G. Farías, A. B. Zepeda, G. M. Calaf // *Biol Res.* – 2012. - Vol. 45, N 1. – P. 81-85.

248. Fetal iron and cytochrome c status after intrauterine hypoxemia and erythropoietin administration [Text] / M. K. Georgieff, R. L. Schmidt, M. M. Mills [et al.] // *Am J Physiol.* – 1992. - Vol. 262, N 3. – P. 485-491.

249. Fukumoto, T. Possible developmental interactions of hematopoietic cells and hepatocytes in fetal rat liver [Text] / T. Fukumoto // *Biomed. Res.* - 1992. - № 13. - P. 385-413.

250. Genomic analysis of [d-Ala<sup>2</sup>, d-Leu<sup>5</sup>] enkephalin preconditioning in cortical neuron and glial cell injury after oxygen deprivation [Text] / H. Kim, S. W. Lee, J. S. Park [et al.] // *Brain Res.* – 2012. - Vol. 4, № 1447. - P. 91-105.

251. Gluckman, P. D. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease [Text] / P. D. Gluckman, M. A. Hanson // *Science.* - 2004. - Vol. 305, N. 5691. – P. 1733-1736.

252. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore [Text] / M. Juhaszova, D. B. Zorov, S. H. Kim [et al.] // *J Clin Invest.* – 2004. - Vol. 113, № 11. - P. 1535-1549.

253. Golub, M. S. Effect of intrapartum meperidine on behavioral consequences of neonatal oxygen deprivation in rhesus monkey infants [Text] / M. S.

Golub, J. H. Eisele, J. M. Donald // *Dev. Pharmacol. Ther.* - 1991. - Vol. 16, № 4. - P. 231-240.

254. Gorla, G. R. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells [Text] / G. R. Gorla, H. Malhi, S. Gupta // *J Cell Sci.* – 2001. - N. 114. - P. 2943-2951.

255. Gross, J. Influence of prenatal hypoxia on brain development: effect on body weight, brain weight, DNA, protein, acetylcholinesterase, 3- quinuclidinyl benzilate binding, and in vivo incorporation of lysine into subcellular fraction [Text] / J. Gross, R. D. Burgoyne, S. P. Rose // *Pediatr Res.* – 1999. – Vol. 46, № 2. – P. 41-45.

256. Growth inhibition of thyroid follicular cell-derived cancers by the opioid growth factor (OGF) – opioid growth factor receptor (OGFr) axis [Text] / P. J. McLaughlin, I. S. Zagon, S. S. Park [et al.] // *BMC Cancer.* – 2009. – № 9. – P. 369.

257. Gujabidze, N. Influence of experimental hyperthyreosis on hepatocytes' cell cycle in white mice [Text] / N. Gujabidze, R. Rukhadze // *Georgian Med News.* – 2006. – № 131. – P. 112-115.

258. Gupta, R. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese children [Text] / R. Gupta // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* - 2011. - Vol. 24, № 11–12. - P. 907–911.

259. Hales, C. N. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis [Text] / C. N. Hales, D. J. Barker // *Diabetologia.* - 1992. - Vol. 35, N. 7. – P. 595—601.

260. Hausenloy, D. J. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion [Text] / D. J. Hausenloy, D. M. Yellon // *Pharmacol Ther.* – 2007. - Vol. 116, N 2. - P. 173-191.

261. Hematopoietic support and cytokine of murine-stable hepatocyte cell lines (MMH) [Text] / A. Aiuti, C. Cicchini, S. Bernardini [et al.] // *Hepatology.* - 1998. Vol. 28. - P. 1645-1654.

262. Hepatic injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia and the effect of tempol [Text] / Q. F. Jiang, B. Y. Chen, L. X. Dong [et al.] // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. – 2012. - Vol. 35, N 3. – P. 189-192.

263. Hepatic Met-enkephalin immunoreactivity is enhanced in primary biliary cirrhosis [Text] / N. V. Bergasa, S. Liau, P. Homel, V. Ghali // *Liver*. – 2002. - Vol. 22, №2. – P. 107–113.

264. Hexapeptides from human milk prevent the induction of oxidative stress from parenteral nutrition in the newborn guinea pig [Text] / K. Miloudi, A. Tsopmo, J. K. Friel [et al.] // *Pediatr Res*. - 2012. - Vol. 71, № 6. - P. 675-681.

265. Higgins, V. Pediatric Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Laboratory Assessment [Text] / V. Higgins, K. Adeli // *EJIFCC*. – 2017. - Vol. 28 N 1. – P. 25-42.

266. Hypoxia inducible factor signaling and experimental persistent pulmonary hypertension of the newborn [Text] / S. Wedgwood, S. Lakshminrusimha, P. T. Schumacker, R. H. Steinhorn // *Front Pharmacol*. – 2015. – Vol. 11, № 6. – P. 47.

267. Hypoxia/reoxygenation up-regulated the expression of death receptor 5 and enhanced apoptosis in human hepatocyte line [Text] / L. Cao, Y. Li, F. Cheng [et al.] // *Transplant Proc*. – 2006. - Vol. 38, N 7. – P. 2207-2209.

268. Hypoxia-Inducible Factor 2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism [Text] / B. Rankin Erinn, Rha Jennifer, A. Selak Mary [et al.] // *Molecular and cellular biology*. - 2009. - Vol. 29, N. 16. - P. 4527–4538.

269. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system [Text] / C. J. Gao, L. Niu, P. C. Ren [et al.] // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 202. – P. 352-362.

270. IDF Consensus Group. The metabolic syndrome in children and adolescents — an IDF consensus report [Text] / P. Zimmet, G. Alberti, F. Kaufman [et al.] // *Pediatric Deabetes*. - 2007. - Vol. 8, № 5. - P. 299–306.

271. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation [Text] / S. Dinant, R. L. Veteläinen, S. Florquin [et al.] // *J. Surg. Res*. – 2007. – Vol.

141, № 2. – P. 176-182.

272. Immunohistochemical study of the phenotypic change of the mesenchymal cells during portal tract maturation in normal and fibrous (ductal plate malformation) fetal liver [Text] / J. Villeneuve, F. Pelluard-Nehme, C. Combe [et al.] // *Comparative Hepatology*. – 2009. – Vol. 14. – P. 8-5.

273. In vivo and in vitro effects of beta-endorphin on glucose metabolism in the rat [Text] / M. Matsumura, T. Fukushima, H. Saito, S. Saito // *Horm. Metab. Res.* - 1984. – Vol. 16, N 1. - P. 27-31.

274. Influence of labor and neonatal hypoxia on sympathoadrenal activation and methionine enkephalin release in calves [Text] / J. E. Aurich, I. Dobrinski, A. Petersen [et al.] // *Am. J. Veterinary Res.* - 1993. – Vol. 54, № 8. - P. 1333-1338.

275. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro [Text] / D. A. Siwik, J. D. Tzortzis, D. R. Pimental [et al.] // *Circ. Res.* - 1999. – Vol. 85, № 2. – P. 147-153.

276. Insulin secretion defects in liver cirrhosis can be reversed by glucagon-like peptide-1 [Text] / E. G. Siegel, A. Seidenstucker, B. Galwitz [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 164 (1). - P. 13-19.

277. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. [Text] / B. N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghobar [et al.] // *Pharmacol. Rev.* - 1996. – Vol. 48, № 4. - P. 576-592.

278. Intrauterine growth restriction increases fetal hepatic gluconeogenic capacity and reduces messenger ribonucleic acid translation initiation and nutrient sensing in fetal liver and skeletal muscle [Text] / S. R. Thorn, T. R. Regnault, L. D. Brown [et al.] // *Endocrinology*. – 2009. - Vol. 150, N 7. – P. 3021-3030.

279. Iqbal, W. Effect of maternal chronic intermittent hypoxia during gestation on offspring growth in the rat [Text] / W. Iqbal, J. Ciriello // *Am J Obstet Gynecol.* – 2013. - Vol. 209, N6. – P. 564.

280. Jungerman, K. Functional specialization of different hepatocyte populations [Text] / K. Jungerman, N. Katz // *Physiol. Rev.* - 1989. - Vol. 69, N 3. – P. 708–764.

281. Kappa opiate receptor multiplicity:evidence for two U50, 488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype [Text] / J. A. Clark, L. Liu, M. Price [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1989. – Vol. 251 (2). – P. 461–468.

282. Kappeler, L. Regulation of growth: Epigenetic mechanisms? / L. Kappeler, M. Clemessy, S. Saget // *Ann Endocrinol.* - 2017. - Vol. 78, № 2. –P. 92-95.

283. Kappa-Opioid agonist modulation of [3H]thymidine incorporation into DNA: evidence for the involvement of pertussis toxin-sensitive G protein-coupled phosphoinositide turnover [Text] / J. Barg, M. M. Belcheva, J. Rowiński, C. J. Coscia // *J. Neurochem.* – 1993. – Vol. 60, № 4. – P. 1505-1511.

284. Kato, Y. Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver [Text] / Y. Kato, J. Tanaka, K. Koyama // *J. Surg. Res.* – 2001. – Vol. 95. – P. 99–106.

285. Kim, J. S. Opioid receptor-independent protection of ischemic rat hepatocytes by morphine [Text] / J. S. Kim, J. J. Lemasters // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2006. - Vol. 351, № 4. - P. 958–964.

286. Kraczkowski, J. J. Comparison of changes in optical density of mu-opioid receptors in the brain of adult rats after prenatal and postnatal hypoxia [Text] / J. J. Kraczkowski, M. Semczuk // *Ginekol Pol.* – 1998. - Vol. 69, № 12. - P. 963-967.

287. Kraczkowski, J. J. Influence of chronic hypoxia on optical density of  $\mu$ -opioid receptors in fetal rat brain [Text] / J. J. Kraczkowski, K. Karwasik-Kajszczarek, J. M. Robak // *Ginekol Pol.* – 2014. - Vol. 85, № 10. - P. 730-737.

288. Kraczkowski, J. J. Sex and changes in mu-opioid receptor density under hypoxia [Text] / J. J. Kraczkowski, M. Semczuk // *Ginekol Pol.* - 2000. - Vol. 71, № 8. - P. 927-930.

289. Kullak-Ublick, G. A. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease [Text] / G. A. Kullak-Ublick, B. Stieger, P. J. Meier // *Gastroenterology*. – 2004. – № 126. – P. 322–342.

290. Lahiri, A. New tricks new ways: exploitation of a multifunctional enzyme arginase by pathogens [Text] / A. Lahiri, P. Das, D. Chakravortty // *Virulence*. - 2010. - Vol. 1, № 6. - P. 563-565.

291. Lambert, D. G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential [Text] / D. G. Lambert // *Nature Rev Drug Disc*. – 2008. - Vol. 7, N 8. – P. 694–711.

292. Law, P. Y. Regulation of Opioid Receptor Activities [Text] / P. Y. Law, H. H. Loh // *J Pharmacol Exp Ther*. – 1999. - Vol. 289, N. 2. – P. 607–624.

293. Leach, P. P. The stimulation of glycogenolysis in isolated hepatocytes by opioid peptides [Text] / P. P. Leach, E. H. Allan, M. A. Titheradge // *Biochem. J*. - 1985. - Vol. 227, N 1. - P. 191-197.

294. Li, G. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat [Text] / G. Li, Y. Xiao, J. L. Estrella // *J Soc Gynecol Investig*. – 2003. – Vol. 10, № 5. – P. 265-274.

295. Li, Y. Inhibitory effects of L-ENK on the proliferation of cultured smooth muscle cells of rats [Text] / Y. Li, S. X. Lin, R. Wang // *Sheng Li Xue Bao*. - 1997. – Vol. 49, № 4. – P. 452-454.

296. Liu, D. W. Effects of leucine-enkephalin on catalase activity and hydrogen peroxide levels in the haemolymph of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) [Text] / D. W. Liu, Z. W. Chen, H. Z. Xu // *Molecules*. – 2008. – Vol. 13, № 4. – P. 864–870.

297. Liu, I. M. Mediation of beta-endorphin by isoferulic acid to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats [Text] / I. M. Liu, W. C. Chen, J. T. Cheng // *Pharmacol Exp Ther*. – 2003. - Vol. 307, N 3. – P. 1196-1204.

**298.** Liver Cell Polyploidization: A Pivotal Role for Binuclear Hepatocytes [Text] / J. E. Guidotti, O. Brégerie, A. Robert [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2003. – Vol. 278. – P. 19095-19101.

299. Liver development, regeneration, and carcinogenesis [Text] / J. W. Kung, I. S. Currie, S. J. Forbes, J. A. Ross // *J Biomed Biotechnol.* - 2010. - doi: 10.1155/2010/984248. Epub 2010 Feb 7.

300. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis [Text] / Germain Margall-Ducos, Celton-Morizur Séverine, Couton Dominique [et al.] // *Journal of Cell Science.* - 2007. - Vol. 120. – P. 3633-3639.

301. Malhotra A., Ditchfield M., Fahey M.C., Castillo-Melendez M., Allison B.J., Polglase G.R., Wallace E.M., Hodges R., Jenkin G., Miller S.L. Detection and assessment of brain injury in the growth-restricted fetus and neonate // *Pediatr Res.* – 2017. - 82(2). – P.184-193.

302. Martin, P. The oxford textbook of clinical hepatology [Text] / P. Martin // *Gastroenterology.* – 2000. - Vol. 118, № 2. – P. 449.

303. Martin-Gronert, M. S. Experimental IUGR and later diabetes [Text] / M. S. Martin-Gronert, S. E. Ozanne // *J Intern Med.* – 2007. - Vol. 261, N 5. – P. 437-452.

304. McLaughlin, P. J. Human neuroblastoma cell growth in tissue culture is regulated by opioid growth factor [Text] / P. J. McLaughlin, I. S. Zagon, J. Skitzki // *Int. J. Oncol.* – 1999. – Vol. 14, № 2. – P. 373-380.

305. McLaughlin, P. J. Regulation of DNA synthesis of myocardial and epicardial cells in developing rat heart by [Met5]-enkefalin [Text] / P. J. McLaughlin // *Am J Physiol.* - 1996. – Vol. 271, № 1. - P. 122-129.

306. Mei, Y. Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice [Text] / Y. Mei, S. Thevananther // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 54, № 5. – P. 1777-1789.

307. Met-enkephalin plasma concentration and content in liver tissue in patients with primary biliary cirrhosis [Text] / D. Owczarek, M. Garlicka, K. Pierzchała-Koziec [et al.] // *Przegl Lek.* – 2003. - Vol. 60, № 7. – P. 461–466.

308. Molecular characterization and distribution of the opioid growth factor receptor (OGFr) in mouse [Text] / I. S. Zagon, M. F. Verderame, W. E. Zimmer, P. J. McLaughlin // *Brain Res Mol Brain Res.* – 2000. - Vol. 8, № 84 (1-2). – P. 106-114.

309. Moon, T. D. The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth [Text] / T. D. Moon // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – Vol. 153, № 2. P. 722-727.

310. m-Opioid receptor activation prevents acute hepatic inflammation and cell death [Text] / D. Chakass, D. Philippe, E. Erdual [et al.] // *Gut.* – 2007. - Vol. 56. N 7. – P. 974–981.

311. Morphine Suppresses Lung Cancer Cell Proliferation Through the Interaction with Opioid Growth Factor Receptor: An In Vitro and Human Lung Tissue Study [Text] / J. Y. Kim, H. J. Ahn, J. K. Kim [et al.] // *Anesth Analg.* – 2016. - Vol. 123, N 6. - P. 1429-1436.

312. Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes [Text] / M. M. Belcheva, A. L. Clark, P. D. Haas [et al.] // *Biol Chem.* – 2005. - Vol. 280, № 30. – P. 27662-92766.

313. Naltrexone changes the expression of lipid metabolism-related proteins in the endoplasmic reticulum stress induced hepatic steatosis in mice [Text] / A. Moslehi, F. Nabavizadeh, A. Zekri, F. Amiri // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2017. - Vol. 44, № 2. – P. 207-212.

314. Naltrexone suppresses the rejection of cardiac tissue transplantation [Text] / Y. F. Li, J. X. Wang, L. Shao [et al.] // *Int J Cardiol.* – 1998. - Vol. 30, N 64, Suppl. 1. – P. 23-27.

315. Neonatal coagulopathy in preterm, small-for-gestational-age infants [Text] / S. Hannam, C. Lees, R. J. Edwards, A. Greenough // *Biol Neonate.* - 2003. - Vol. 83, N 3. - P. 177-181.

316. Nicoll, J. The delta opioid receptor 1 is expressed by proliferating bile ductules in rats with cholestasis: implications for the study of liver regeneration and malignant transformation of biliary epithelium [Text] / J. Nicoll, C. A. Axiotis, N. V. Bergasa // *Med Hypotheses.* - 2005. - Vol. 65. № 6. – P. 1099–1105.

317. Nitou, M. Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver [Text] / M. Nitou, K. Ishikawa, N. Shiojiri // *J. Anat.* - 2000. - Vol. 197, Pt 4. – P. 635–646.

318. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance with mitochondrial abnormalities [Text] / A. J. Sanyal, C. Campbell-Sargent, F. Mirshahi [et al.] // *Gastroenterology.* - 2001. - № 120. - P. 1183-1192.

319. Non-alcoholic fatty liver disease: An early mediator predicting metabolic syndrome in obese children? [Text] / J. F. Fu, H. B. Shi, L. R. Liu [et al.] // *World J. Gastroenterol.* - 2011. - Vol. 17, N 6. – P. 735–742.

320. Obstructive cholestasis alters intestinal transit in mice: role of opioid system [Text] / K. Ghaffari, S. T. Savadkuhi, H. Honar [et al.] // *Life Sci.* – 2004. - Vol. 76, №4. – P. 397-406.

321. Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model [Text] / P. A. Zaki, E. J. Bilsky, T. W. Vanderah [et al.] // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 1996. - N 36. – P. 379–401.

322. Pasternak, G. W. Multiple opiate receptors: déjà vu all over again [Text] / G. W. Pasternak // *Neuropharmacology.* – 2004. - Vol. 47 (Suppl 1). – P. 312–323.

323. Peroxiredoxin 6 attenuates ischemia- and hypoxia-induced liver damage of brain-dead donors [Text] / Q. Tu, Y. Xiong, L. Fan [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2016. - Vol. 13, N 1. – P. 753-761.

324. Persson, A. I. Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors [Text] / A. I. Persson, T. Thorlin, C. Bull, P. S. Eriksson // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, № 3. – P. 360–372.

325. Peterside, I. I. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats [Text] / I. I. Peterside, M. A. Selak, R. A. Simmons // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 285, № 6. – P. 1258-1266.

326. Pham, T. D. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene mutilation in the full-term IUGR rat kidney [Text] / T. D. Pham, N. K. MacLennan, C. T. Chiu // *Am J Physiol Regul Int Comp Physiol.* - 2003. - Vol. 285, N. 5. – P. 962—970.

327. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4 [Text] / X. Wang, Y. Zhang, Y. Peng [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2016. - Vol. 173, № 5. - P. 856-869.

328. Piñeiro-Carrero, V. M. Liver [Text] / V. M. Piñeiro-Carrero, E. O. Piñeiro // *Pediatrics.* – 2004. - Vol. 113, N 4. - P. 1097-2106.

329. Plasma glucose-lowering effect of beta-endorphin in streptozotocin-induced diabetic rats [Text] / J. T. Cheng, I. M. Liu, T. F. Tzeng [et al.] // *Horm Metab Res.* – 2002. - Vol. 34, N 10. – P. 570-576.

330. Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth [Text] / C. Melchiorri, P. Chieco, A. I. Zedda [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1993. - Vol. 14, N 9. – P. 1825-1830.

331. Pretreatment with intrathecal or intravenous morphine attenuates hepatic ischaemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic rat liver [Text] / Y. Wang, G. T. Wong, K. Man, M. G. Irwin // *Br J Anaesth.* – 2012. - Vol. 109, N 4. – P. 529-539.

332. Protective effect of N-acetylcysteine on liver damage during chronic intrauterine hypoxia in fetal guinea pig [Text] / K. Hashimoto, G. Pinkas, L. Evans [et al.] // *Reprod Sci.* – 2012. – Vol. 19 (9). – P. 1001-1009.

333. Protein kinase C mediates the effects of delta-opioid receptor stimulation on survival and apoptosis in neonatal cardiomyocytes cultured in serum-deprived condition [Text] / D. Wang, H. Wang, G. Wu [et al.] // *Pharmazie.* – 2009. - Vol. 64, №7. - P. 466-471.

334. Quercetin attenuates lindane induced oxidative stress in Wistar rats [Text] / V. V. Padma, R. Baskaran, R. S. Roopesh, P. Poomima // *Mol. Biol. Rep.* - 2012. - Vol. 39, N 6. – P. 6895-6905.

335. Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis [Text] / G. Svegliati-Baroni, F. Ridolfi, Z. Caradonna [et al.] // *Hepatology.* – 2003. - Vol. 39, № 4. - P. 528-537.

336. Relation of cord serum levels of growth hormone, insulin-like 3. growth factors, insulin-like growth factor binding proteins, leptin, and interleukin-6 with birth weight, birth length, and head circumference in term and preterm neonates

[Text] / H. C. Lo, L. Y. Tsao, W. Y. Hsu [et al.] // Nutrition. — 2002. — Vol. 18. — P. 604—608.

337. Relationship between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles [Text] / Y. Guo, J. Zhang, Y. Zeng [et al.] // PLoS ONE. - 2009. — Vol. 4. — P. 7641.

338. Remifentanil Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Interleukin-18 Signaling [Text] / X. Liu, Z. Pan, D. Su [et al.] // Transplantation. — 2015. - Vol. 99, № 10. — P. 2109-2117.

339. Remifentanil preconditioning reduces hepatic ischemiareperfusion injury in rats via inducible nitric oxide synthase expression [Text] / L. Q. Yang, K. M. Tao, Y. T. Liu [et al.] // Anesthesiology. — 2011. — Vol. 114, № 5. — P. 1036-1047.

340. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo [Text] / S. De Minicis, C. Candelaresi, M. Marziani [et al.] // Gut. — 2008. - Vol. 57, № 3. — P. 352-364.

341. Role of nitric-oxide synthase, free radicals, and protein kinase C delta in opioid-induced cardioprotection [Text] / H. Y. Zhang, B. C. McPherson, H. Liu [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. — 2002. - Vol. 301, N 3. - P. 1012-1019.

342. Rolo, A. P. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [Text] / A. P. Rolo, J. S. Teodoro, C. M. Palmeira // Free Radic. Biol. Med. — 2012. — Vol. 1, N 1. — P. 59–69.

343. ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation [Text] / X. Wang, J. Z. Liu, J. X. Hu [et al.] // Free Radic Biol Med. — 2011. - Vol. 51, N 2. — P. 539-551.

344. Ryoo, S. Endothelial arginase II and atherosclerosis [Text] / S. Ryoo, D. E. Berkowitz, H. K. Lim // Korean J. Anesthesiol. - 2011. - Vol. 61. № 1. - P. 3-11.

345. Sasaki, K. Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo [Text] / K. Sasaki, Y. Sonoda // Arch. Histol. Cytol. - 2000. — Vol. 63. — P. 137–146.

346. Scholzen, T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [Text] / T. Scholzen, J. Gerdes // *J. Cell. Physiol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 311-322.
347. Scibior, D. Arginine – metabolism and functions in the human organism [Text] / D. Scibior, H. Czeczot // *Postepy Hig. Med. Dosw.* - 2004. - Vol 58. - P. 321–332.
348. Semenza, Gregg L. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1 [Text] / L. Semenza Gregg // *Exp. Physiol.* – 2006.– Vol. 91, № 5. – C. 803–806.
349. Simantov, R. (3H) Opiate binding: anomalous properties in kidney and liver membranes [Text] / R. Simantov, S. R. Childers, S. H. Snyder // *Mol Pharmacol.* – 1978. - Vol. 14, № 1. – P. 69-76.
350. Singh, R. Opioid and nonopioid receptor-mediated immunoregulatory role of leucine-enkephalin in teleost *Channa punctatus* [Text] / R. Singh, U. Rai // *Fish Shellfish Immunol.* – 2010. – Vol. 28, № 56. – P. 872 -878.
351. Sofuoglu, M. 7-Benzylidenenaltrexone (BNTX): A selective  $\delta 1$  opioid receptor antagonist in the mouse spinal cord [Text] / M. Sofuoglu, P. S. Portoghese, A. E. Takemori // *Life Sci.* – 1993. - Vol. 52, N 8. – P. 769–775.
352. Song, W. Changes of free radicals in fetal rats brain and liver following intrauterine fetal distress (Article in Chinese) [Text] / W. Song, Y. Han, T. Shang // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* – 1999. - Vol. 34, N 8. – P. 473-475.
353. Status of liver enzymes in babies with perinatal asphyxia [Text] / M. T. Islam, M. N. Islam, A. H. Mollah [et al.] // *Mymensingh Med J.* – 2011. - Vol. 20, N. 3. - P. 446-449.
354. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells [Text] / J. S. Sandhu, P. M. Petkov, M. D. Dabeva, D. A. Shafritz // *Am. J. Pathol.* - 2001. - Vol. 159. - P. 1323–1334.
355. Stimulation of retinal pigment epithelial cell growth by neuropeptides in vitro [Text] / H. Kishi, H. K. Mishima, I. Sakamoto, U. Yamashita // *Curr. Eye Res.* - 1996. – Vol. 15, № 7. – P. 708-713.

356. Targeted overexpression of OGF $\alpha$  in epithelium of transgenic mice suppresses cell proliferation and impairs full-thickness wound closure [Text] / P. J. McLaughlin, C. L. Keiper, M. F. Verderame, I. S. Zagon // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2012. - Vol. 302, N 9. – P. 1084-1090.

357. The K<sub>ca</sub> channel as a trigger for the cardioprotection induced by kappa-opioid receptor stimulation – its relationship with protein kinase [Text] / C. M. Cao, M. Chen, T. M. Wong // *C. Br. J Pharmacol.* - 2005. - Vol. 145, N 7. - P. 984-991.

358. The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory investigation [Text] / B. Mathew, F. E. Lennon, J. Siegler [et al.] // *Anesth Analg.* – 2011. - Vol. 112, N 3. - P. 558-567.

359. The occurrence and receptor specificity of endogenous opioid peptides within the pancreas and liver of the rat [Text] / X. Z. Khawaja, I. C. Green, J. R. Thorpe, M. A. Titheradge // *Biochem. J.* – 1990. – Vol. 267, № 1. – P. 233-240.

360. The opioid growth factor, [Met<sup>5</sup>]-enkephalin, inhibits DNA synthesis during recornification of mouse tail skin [Text] / R. P. Wilson, P. J. McLaughlin, C. M. Lang, I. S. Zagon // *Cell Prolif.* - 2000. – Vol. 33, № 2. – P. 63-73.

361. The opioid peptide analog D-Ala<sup>2</sup>-Met-enkephalinamide decreases bile flow by a central mechanism [Text] / N. V. Bergasa, J. Zhou, J. Ravi, Q. Shi // *Peptides.* - 1999. - Vol. 20, N 8. - P. 979—986.

362. The opioids growth factor (OGF)OGF receptor axis uses the p 16 pathway to inhibit head and neck cancer [Text] / F. Cheng, I. S. Zagon, M. F. Verderame, P. J. McLaughlin // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 21. – P. 10511-10518.

363. The stimulative effects of endogenous opioids on endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro [Text] / X. Dai, H. J. Song, S. G. Cui [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 628, № 13. – P. 42–50.

364. Tormos AM, Taléns-Visconti R, Nebreda AR, Sastre J. p38 MAPK: a dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species [Text] / A. M. Tormos, R. Taléns-Visconti, A. R. Nebreda, J. Sastre // *Free Radic Res.* – 2013. - Vol. 47, N 11. – P. 905-916.

365. Traynor, J.  $\delta$ -opioid receptor subtypes and cross talk with  $\mu$ -receptors [Text] / J. Traynor, J. Elliot // Trends Pharmacol Sci. – 1993. - Vol. 14, N 3. – P. 84–85.

366. Tumorcelltargeted methionineenkephalin analogues containing unnatural amino acids: design, synthesis, and in vitro antitumor activity [Text] / S. Horvat, K. Mlinarić-Majerski, L. Glavas-Obrovac [et al.] // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49, № 11. – P. 3136-3142.

367. Upregulation of the  $\delta$  opioid receptor in liver cancer promotes liver cancer progression both in vitro and in vivo [Text] / B. Tang, Y. Li, S. Yuan [et al.] // International Journal of Oncology. - 2013. - Vol. 43, № 4. – P. 1281-1290.

368. Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats [Text] / X. Ke, Q. Lei, S. J. James [et al.] // Physiol Genomics. - 2006. - Vol. 25, N 1. – P. 16-28.

369. Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation [Text] / K. D. Nüsken, J. Dötsch, M. Rauh [et al.] // Endocrinology. – 2008. – Vol. 149, № 3. – P. 1056-1063.

370. Vinculin: a novel marker for quiescent and activated hepatic stellate cells in human and rat livers [Text] / S. Kawai, H. Enzan, Y. Hayashi [et al.] // Virchows Arch. - 2003. - Vol. 443, № 1. – P. 78–86.

371. Waldhoer, M. Opioid receptors [Text] / M. Waldhoer, S. E. Bartlett, J. L. Whistler // Annu Rev Biochem. – 2004. - N 73. – P. 953–990.

372. Wan, G. Serum concentration of insulin-like growth factor-I in cord blood [Text] / G. Wan, S. Yu, J. Liu // Zhonghua Fu Chan KeZaZhi. — 1998. — № 33. — P. 720—721.

373. Wang, K.C. Akt signaling as a mediator of cardiac adaptation to low birth weight [Text] / Wang KC, Botting KJ, Zhang S, McMillen IC, Brooks DA, Morrison JL // J Endocrinol. - 2017 Vol. 233 № 2. –P.81-94.

374. Watchko, J. F. Jaundice in low birthweight infants: pathobiology and outcome [Text] / J. F. Watchko, M. J. Maisels // Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. – 2003. - Vol. 88, № 6. - P. 455-458.

375. Weiss, R. Obesity and the Metabolic Syndrome in children and adolescents [Text] / R. Weiss, J. Dziura, T. Burgert // New Engl. J. Med. - 2004. - Vol. 350, № 23. - P. 2362–2374.

376. Wesolowski, S. R. Developmental origins of NAFLD: a womb with a clue / S. R. Wesolowski, K. C. Kasmi, K. R. Jonscher // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. – 2017. – Vol. 14(2). - P. 81-96.

377. Wittert, G. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat [Text] / G. Wittert, P. Hope, D Pyle // Biochem Biophys Res Commun. - 1996. - Vol. 218, N 3. – P. 877–881.

378. Wollemann, M. Recent developments in the research of receptor subtype molecular characterization [Text] / M. Wollemann // J. Neurochem. – 1990. – Vol. 54, № 4. – P. 1095-1101.

379. Wolozin, B. L. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system [Text] / B. L. Wolozin, G. W. Pasternak // Proc Natl Acad Sci USA. – 1981. – Vol. 78 (10). – P. 6181–6185.

380. Xiao, D. Chronic hypoxia and developmental regulation of cytochrome c expression in rats [Text] / D. Xiao, C. A. Ducsay, L. Zhang // J Soc Gynecol Investig. – 2000. - Vol. 7, N 5. – P. 279-283.

381. Yang, S. W. Relationship of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, insulin, growth hormone in cord blood and maternal factors with birth height and birthweight [Text] / S. W. Yang, J. S. Yu // PediatrInternat. — 2000. — Vol. 42. — P. 31—36.

382. Zagon, I. S. Nucleocytoplasmic distribution of opioid growth factor and its receptor in tongue epithelium [Text] / I. S. Zagon, T. B. Ruth, P. J. McLaughlin // Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. – 2005. - Vol. 282. – P. 24-37.

383. Zagon, I. S. Opioid antagonist (naltrexone) stimulation of cell proliferation in human and animal neuroblastoma and human fibrosarcoma cells in culture

[Text] / I. S. Zagon, P. J. McLaughlin // *Neuroscience*. – 1990. – Vol. 37, №1. – P. 223-226.

384. Zagon, I. S. Opioid antagonist modulation of DNA synthesis in mouse tongue epithelium in circadian dependent [Text] / I. S. Zagon, Y. Wu, P. J. McLaughlin // *Pharmacol. Biochem. And Behav.* – 1994. – Vol. 48, № 3. – P. 709-714.

385. Zagon, I. S. Opioid growth factor and the treatment of human pancreatic cancer: A review [Text] / I. S. Zagon, P. J. McLaughlin // *World J Gastroenterol.* – 2014. - Vol. 20, № 9. – P. 2218-2223.

386. Zagon, I. S. Opioid growth factor modulates corneal epithelial outgrowth in tissue culture [Text] / I. S. Zagon, J. W. Sassani, P. J. McLaughlin // *Am J Physiol.* - 1995. – Vol. 268, № 4. – P. 942-950.

387. Zagon, I. S. The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr) [Text] / I. S. Zagon, M. F. Verderame, P. J. McLaughlin // *Brain Res. Rev.* - 2002. – Vol. 38, № 3. – P. 351-376.

388. Zagon, I. S. Opioids growth factoropioids growth factor receptor axis is a physiological determinant of cell proliferation in diverse human cancers [Text] / I. S. Zagon, R. N. Donahue, P. J. McLaughlin // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2009. –Vol. 297, N 4. – P. 1154–1161.

389.  $\delta$ -Opioid receptor (DOR) signaling and reactive oxygen species (ROS) mediate intermittent hypoxia induced protection of canine myocardium [Text] / J. A. Estrada, A. G. Jr Williams, J. Sun [et al.] // *Basic Res Cardiol.* – 2016. - Vol. 111, № 2. - P. 17.