

На правах рукописи

Пазиненко Ксения Андреевна

**ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ
УМЕРЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ И КОРРЕКЦИИ
ТАУТОМЕРАМИ ОРОТАТ-АНИОНА**

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.22 – Клеточная биология

Москва

2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Чучкова Наталья Николаевна, доктор медицинских наук профессор, заведующая кафедрой медицинской биологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант:

Канунникова Ольга Михайловна, доктор физико-математических наук, профессор кафедры агрохимии, почвоведения и химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия».

Официальные оппоненты:

Банин Виктор Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой морфологии человека Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Петрова Маргарита Борисовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына».

Защита диссертации состоится «__»_____2022 г. в ____ часов на заседании специализированного совета 21.2.058.02 при ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (117997 Москва, ул. Островитянова, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (117997 Москва, ул. Островитянова, 1) и на сайте ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России: <https://rsmu.ru/research/dissertations>.

Автореферат разослан «__»_____2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Леонова Людмила Васильевна

Актуальность и степень разработанности темы

Исследования последних лет доказывают, что повышенный уровень гомоцистеина является маркером развития сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний (Kim J. et al., 2018; Cordaro M. et al., 2021). Повышение уровня гомоцистеина в плазме крови свыше 15 мкмоль/л приводит к формированию гипергомоцистеинемии (ГГЦ) (Son P., Lewis L., 2020). Наиболее часто встречающимся вариантом ГГЦ является ее умеренная форма (уровень гомоцистеина 15-30 мкмоль/л).

Гомоцистеин представляет собой серосодержащую аминокислоту, которая является промежуточным продуктом в метаболизме метионина и цистеина. Превращение метионина в гомоцистеин путем трансметилирования происходит в печени. Было показано, что повышенный уровень гомоцистеина является критическим фактором патогенеза неалкогольной жировой болезни печени (Ai Y. et al., 2017, 2020). Это обуславливает необходимость и актуальность коррекции нарушенных функций печени при длительном состоянии ГГЦ. Имеющиеся на фармацевтическом рынке апробированные, хорошо зарекомендовавшие себя лекарственные препараты солей оротовой кислоты (ОК), оказывают широкий спектр воздействий на клеточный метаболизм в целом и клетки печени в частности, не всегда эффективны из-за, например, низкой растворимости и скорости растворения, малого объема абсорбции в желудочно-кишечном тракте, вида изомера (таутомера) оротат-аниона ОК, входящего в состав препарата (Aljamali N.M., 2018; Smith R.L., Mitchell S.C., 2018). Поэтому задача повышения терапевтической эффективности лекарственных форм на основе известных препаратов является актуальной. Для модификации физических и химических свойств лекарственных веществ, определяющих их биологическую активность и устойчивость, применим метод механической активации (Болдырев В.В., 2006; Chow E.H., Strobbridge F.C., Friscić T., 2010; de Melo C.C., da Silva C.C., Pereira C.C. et al., 2016; Li J., Nagamani C., Moore J.S., 2015; Канунникова О.М. и др., 2014; Чучкова Н.Н. и др., 2018).

Цели и задачи исследования

Цель исследования – установление морфогенетических особенностей клеточных популяций и микрогемоциркуляторного русла печени крыс в условиях умеренной гипергомоцистеинемии и при введении таутомеров оротовой кислоты.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать биохимические и гематологические показатели крови крыс при умеренной форме гипергомоцистеинемии.
2. Оценить морфофункциональное состояние клеточных популяций и

микрогемоциркуляторное русло печени крыс при умеренной форме гипергомоцистеинемии.

3. Получить таутомеры оротовой кислоты методом механоактивации в шаровой планетарной мельнице; оценить физико-химические свойства таутомеров оротат-аниона.

4. Провести анализ цитологических и биохимических показателей крови экспериментальных животных с умеренной гипергомоцистеинемией при введении различных таутомеров оротат-аниона.

5. Дать морфофункциональную характеристику клеточных популяций и микрогемоциркуляторного русла печени экспериментальных животных с умеренной гипергомоцистеинемией при введении различных таутомеров оротат-аниона.

Научная новизна

Впервые проведен комплексный анализ клеточных популяций на фоне умеренной ГГЦ. Установлено, что умеренная ГГЦ приводит к снижению объема популяции гепатоцитов, повышению пролиферативного индекса (на основании выявления Ki-67-клеток), активации звездчатых макрофагов (клеток Купфера) с фенотипом CD-68+, активации жиронакапливающих звездчатых клеток Ито. Впервые показано развитие феномена «ядрышкового стресса» при ГГЦ. Впервые выявлено, что реакция кровеносного микрососудистого русла печени при повышенном уровне гомоцистеина в крови представлена выраженной дилатацией сосудов печени.

Впервые методом механоактивации получены препараты оротовой кислоты с преимущественным содержанием различных таутомерных форм оротат-аниона (гидрокси- и дигидрокси-формы) в твердотельном варианте. Показано, что механоактивация приводит к: уменьшению частиц порошка до наноразмеров, аморфизации структуры, последовательным таутомерным превращениям в зависимости от длительности обработки: оксо-форма (исходный вариант таутомера, без обработки) переходит в гидроксид-форму (при механоактивации в течение 1 часа) с дальнейшим образованием дигидрокси-формы (при механоактивации в течение 6 часов). Впервые показаны различия ряда физико-химических свойств препарата оротовой кислоты в зависимости от его таутомерной структуры.

Впервые проведена сравнительная оценка действия на организм таутомеров оротовой кислоты. Показано, что эффективность действия препаратов оротовой кислоты на организм экспериментальных животных определяется формой таутомера. Установлено, что наиболее выраженное действие на организм

оказывает гидроксид-форма оротовой кислоты, установлен ее значимый гепатопротекторный, противовоспалительный, антитромботический и антифиброгенный ответы. Доказано, что эффективность дигидроксид- и оксо-форм сопоставима и ниже, чем гидроксид-формы.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, направленное на оценку морфофункционального состояния печени при умеренной форме ГЦ с использованием гистологических и иммуногистохимических методов исследования; получение таутомеров оротат-аниона методом механоактивации с различной длительностью обработки оротовой кислоты, исследование ряда физико-химических свойств полученных препаратов с помощью спектроскопических методов исследования (сканирующая зондовая микроскопия, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия), проведение оценки растворимости и скорости растворения в воде, липофильности в модели «октанол-вода». Анализ эффекта действия полученных препаратов, содержащих различные формы оротат-аниона на организм экспериментальных животных, проводился с помощью цито- и биохимического анализов крови, гистологических, иммунофлуоресцентных и морфометрических методов исследования клеточных популяций печени и ее кровеносного микрососудистого русла на фоне умеренной ГЦ. Для обобщения полученного цифрового материала и выявления степени внутригрупповых различий в группах животных, получавших различные формы оротовой кислоты, использовались методы анализа на нормальность распределения данных по Шапиро-Уилка, статистического анализа по Стьюденту, Тьюки-теста, ANOVA и MANOVA.

Дизайн исследования отражен в протоколе, одобренном локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (регистрационный номер 656 от 23.04.2019).

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные результаты имеют теоретическое значение, т.к. представляют новые данные, отражающие морфофункциональное состояние печени при умеренной ГЦ, углубляют представления о постнатальном гистогенезе клеточных популяций печени в условиях патологии, обусловленной повышенным уровнем гомоцистеина на организм. Методом механоактивации получены и апробированы препараты оротовой кислоты, содержащие различные таутомерные формы оротат-аниона, что дополняет и расширяет представления о влиянии измененного

структурного состояния вещества на клетки и организм в целом. Доказано преимущество механомодифицированной гидроксид-формы препарата оротовой кислоты перед его таутомерными оксо- и дигидроксид-формами. Работа закладывает основу для возможного практического использования (после клинической апробации) модифицированного препарата гидроксид-формы оротовой кислоты в связи с его более активным биологическим действием для, например, снижения дозы лекарства и/или длительности курса его применения. Результаты работы показывают возможность применения технологии механоактивации для обработки лекарств с целью повышения дисперсности препаратов без изменения химического состава, получения препаратов с максимально высокой биологической активностью. Подобная обработка, например, малых объемов лекарственного вещества возможна на уровне отдельного медицинского учреждения (больницы).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в процесс обучения на кафедрах гистологии, эмбриологии и цитологии, нормальной физиологии ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России при чтении лекций и проведении практических занятий у студентов лечебного и педиатрического факультетов; в ФГБОУ ВО УдГУ для обучающихся в магистратуре «Биология клетки» по предмету «Цитопатология». Оформлено рацпредложение «Способ моделирования умеренной формы гипергомоцистеинемии» (№ 01.21 от 17 февраля 2021 г.)

Положения, выносимые на защиту

1. Длительное (в течение 4-х недель) введение метионина приводит к формированию умеренной гипергомоцистеинемии, развитию гепатопатии, сопровождается изменениями содержания печеночных ферментов, билирубина, цитологических показателей крови, липидного спектра.
2. Умеренная гипергомоцистеинемия сопровождается снижением количества гепатоцитов, формированием ядрышкового стресса, увеличением объема популяций Ki-67+, CD-68+ и перисинусоидных звездчатых клеток Ито, гомотеининдуцированной дилатацией микрососудистого русла печени.
3. Механообработка оротата калия (оротовой кислоты) в течение 1-6 часов приводит к формированию метастабильных устойчивых форм препарата, увеличению растворимости и скорости растворения в воде (на 30%), растворимости в октанолe (в среднем на 30%); последовательным таутомерным превращениям оротат-аниона: оксо-→гидроксид-→дигидроксид-формы.
4. Введение животным таутомеров оротовой кислоты сопровождается различными по выраженности эффектами действия на организм: механомодифицированная

гидрокси-форма обладает преимуществом по сравнению с исходной оксо-формой и механомодифицированной дигидрокси-формой оротат-аниона. Оксо- и дигидрокси-формы сопоставимы между собой.

Степень достоверности

Достоверность научных результатов исследования определяется изучением работ по теме диссертации зарубежных и отечественных авторов; достаточным объемом и репрезентативностью изучаемых выборок; соответствием выбранных методов исследования поставленным задачам; корректным обсуждением результатов работы. Сформулированные выводы и практические рекомендации аргументированы и вытекают из результатов исследования.

Апробация материалов диссертации

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, включая 12 публикаций в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 8 полнотекстовых статей, 1 статья в журнале Scopus.

Основные положения и результаты доложены на XIV конгрессе Международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции» (Рязань, 2019); Международной конференции «Инновационные исследования в области биомедицины» памяти академика В.Н. Ярыгина (Москва, 2019); Всероссийской конференции молодых ученых-химиков с международным участием (Нижний Новгород, 2019); VIII съезд Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); I Всероссийской морфологической конференции молодых ученых с международным участием (Тюмень, 2020); XV конгрессе Международной ассоциации морфологов (Ханты-Мансийск, 2020); X межрегиональной межвузовской научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Современные аспекты медицины и биологии» (Ижевск, 2018, 2019, 2021), XXII Всероссийской научной конференции студентов, молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы теоретической, экспериментальной и клинической медицины» (Ханты-Мансийск, 2021).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Для эксперимента были использованы крысы *Rattus norvegicus* Berk обоего пола массой 220±20г в количестве 149 штук, содержащиеся в виварии ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России, в осенне-зимний период (октябрь-декабрь). С целью

беспрепятственного проведения экспериментальных манипуляций и исключения формирования зоостресса крыс в течение 2-х недель приучали к рукам (процедура хэндлинга) (Cloutier S. et al., 2018).

Животных распределяли на 5 групп:

1. Контрольные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария.
2. Крысы с умеренной ГГЦ – группа сравнения (Рационализаторское предложение № 01.21 от 17 февраля 2021 г. «Способ моделирования умеренной формы гипергомоцистеинемии»).
3. Крысы с умеренной ГГЦ, получавшие ежедневно исходную оксо-форму (без механоактивации) оротовой кислоты в дозе 5 мг/кг массы тела в течение 21 дня.
4. Крысы с умеренной ГГЦ, получавшие ежедневно гидроксид-форму оротовой кислоты (препарат после механоактивации в течение 1 часа) в дозе 5 мг/кг массы тела в течение 21 дня.
5. Крысы с умеренной ГГЦ, получавшие ежедневно дигидроксид-форму оротовой кислоты (препарат после механоактивации в течение 6 часов) в дозе 5 мг/кг массы тела в течение 21 дня.

В крови животных всех групп определяли уровни: гомоцистеина, триглицеридов, общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности, холестерина липопротеинов низкой плотности, АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, общего и прямого билирубина. Проводили анализ цитологического состава крови. Содержание гомоцистеина определяли иммуноферментным методом с использованием тест-системы AxisShield (Великобритания), исследование показателей крови проводили с использованием автоматических биохимических анализаторов Olympus AU-480, гематологических анализаторов System XS-500i и Alifax Roller 10 Plus. Печень животных заливали в среду Histomix, готовили серийные срезы толщиной 5-7 мкм на микротоме SAKURA Tissue Tek Accu Cut SRM 200 Microtome. На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали: площадь гепатоцита и его ядра (мкм^2), ядерно-цитоплазматическое отношение, количество гепатоцитов, их ядер, приходящихся на 100 мкм^2 площади среза, долю двуядерных гепатоцитов (%). На срезах, окрашенных азотнокислым серебром для оценки ядрышкового организатора (Ag-ЯОр) клеток, подсчитывали: площадь Ag-ЯОр (мкм^2), количество Ag-ЯОр в ядре (шт/ядро), их расположение относительно ядерной мембраны, количество интра- и перинуклеолярных аргентофильных гранул. Для оценки состояния компонентов соединительной ткани проводилось окрашивание пикрофуксином по Ван Гизон.

Иммуногистохимическое исследование было проведено с использованием моноклональных антител к маркерам: клеточной пролиферации (Ki-67), клеток моноцитарно-макрофагального ряда (клетки Купфера – CD-68+), активированных перисинусоидальных клеток Ито (α SAM). Срезы изучали с помощью люминесцентного микроскопа Nikon ECLIPSE E200. Результаты исследования оценивали с учетом локализации клеток, их количества (шт/поле зрения), интенсивности свечения (μ e). Измерение интенсивности свечения иммунореактивного продукта проводили на фронтальных срезах при помощи морфометрических программ Image ProInsite 8.0 (MediaCybernetics).

Работу по подготовке и аттестации образцов препарата оротовой кислоты (оротат калия, ОАО АВВА РУС, Россия) проводили на базе Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН (г. Ижевск). Механоактивация образцов препарата осуществлялась в шаровой планетарной мельнице АГО-2С. Размеры и форма частиц порошков была исследована методом атомной силовой микроскопии (АСМ) с помощью сканирующей лаборатории Интегра-Прима. Анализ атомной структуры проводился на спектрометре ЭС-2401 с использованием CuK α -излучения. Был проведен анализ растворимости и скорости растворения препарата в воде, распределение вещества в системе «октанол-вода». Количество растворенного вещества в растворах определялось методом эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной (аргоновой) плазмой на спектрометре Spectroflame Modula S.

Статистический анализ данных проводили в компьютерной программе «SPSS». Результаты исследований проверяли на нормальность распределения значений с помощью W-теста Шапиро-Уилка. Различия в показателях между группами животных анализировали при помощи метода многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA), однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), апостериорные сравнения проводились с использованием теста Тьюки, критерия Стьюдента для независимых групп. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфофункциональная характеристика печени экспериментальных животных при умеренной ГГЦ

Концентрация гомоцистеина в крови интактных составляла $8,5 \pm 0,6$ мкмоль/л, через 4 недели содержания на рационе, обогащенном метионином – $28,9 \pm 2,65$ мкмоль/л, что в 3,4 раза выше исходных данных ($p > 0,05$). Формирование умеренной ГГЦ сопровождалось повышением уровня аспаратаминотрансферазы

(АСТ) (в 1,46 раза, $p<0,05$), аланинаминотрансферазы (АЛТ) (в 1,5 раза, $p<0,05$), общего и прямого билирубина – на 62,25% и 25% соответственно ($p<0,05$), уровень щелочной фосфатазы (ЩФ) достоверно не изменялся. Корреляционный анализ по Пирсону данных ферментного состава при умеренной форме ГГЦ выявил следующие статистически значимые положительные взаимосвязи между уровнями: АЛТ и ЩФ ($r=1$, $n=10$, $p=0,0001$); АСТ и ЩФ ($r=1$, $n=10$, $p=0,0001$). Сильная отрицательная корреляция наблюдалась между уровнями билирубина и щелочной фосфатазы ($r=-1$, $n=10$, $p=0,0001$).

Показатели липидного спектра при умеренной ГГЦ не испытывали значительных колебаний. Достоверно повышалась только фракция триглицеридов (в 1,78 раз, $p<0,05$).

При умеренной ГГЦ на 27,43% увеличивалось абсолютное количество лейкоцитов, на 37,73% – гранулоцитов, в 3,05 раза было повышено число моноцитов ($p<0,05$).

Основные морфометрические данные гепатоцитов контрольной и экспериментальной группы с умеренной ГГЦ представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Морфометрические характеристики гепатоцитов интактных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Показатели	Экспериментальные группы	
	Контроль	Умеренная ГГЦ
Количество гепатоцитов, рассчитанное на площадь среза 100 мкм ²	448,1±23,3	256,2±15,5*
Площадь гепатоцита (мкм ²)	378,57±14,5	266,82±12,8*
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	328,1±14,17	235,51±11,02*
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	52,51±4,5	56,68±5,58
Количество ядер на площадь среза (100 мкм ²)	505,91±30,2	270,55±21,4*
Доля двуядерных клеток (%)	12,5±2,52	5,67±0,48*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,197±0,12	0,236±0,11

Примечание: * – различия достоверны при $p<0,05$

При умеренной ГГЦ резко падала плотность расположения клеток (в 1,75 раз, $p<0,05$) и количество ядер (в 1,86 раз, $p<0,05$), снижался объем популяции двуядерных гепатоцитов (в 2,2 раза, $p<0,05$). Было отмечено появление клеток с очень крупными ядрами (12,5%), площадь которых превосходила среднепопуляционные параметры на 40% и достигала 78,6 мкм², а ядерно-цитоплазматическое отношение было увеличено в 3,8 раз ($p<0,05$).

Функциональная активность клетки (белоксинтетические процессы) тесно связана с биогенезом рибосом, формирование которых происходит в ядрышковом организаторе (ЯОр) – участке хромосом, в котором располагаются рибосомные гены. При умеренной ГГЦ снижались количество выявляемых областей Ag-ЯОр в ядре в 1,71 раза ($p<0,05$) и совокупная площадь Ag-ЯОр (в 2,31 раз, $p<0,05$) (Таблица 2). В 22,96% ядер содержалась только одна область Ag-ЯОр, тогда как у контрольных животных одноядрышковых ядер не было отмечено совсем. При умеренной ГГЦ в 5,45 раз ($p<0,05$) снижалось количество Ag-ЯОр неактивного типа (микроядрышек), так что практически вся популяция содержала активные Ag-ЯОр (97,3%). Можно предположить, что пул микро-ЯОр контрольной популяции активизируется при изменении условий существования клетки для обеспечения ее белковыми продуктами. Учитывая факт снижения количества гепатоцитов при умеренной ГГЦ и уменьшения в них числа ядер и ядрышек, повышение активности Ag-ЯОр может быть компенсаторным ответом на стрессовый стимул (гипергомоцистеинемия).

Таблица 2 – Морфометрические данные Ag-ЯОр гепатоцитов

Параметры Ag-ЯОр	Контроль	Умеренная ГГЦ
Количество Ag-ЯОр в ядре	4,28±0,17	2,5±0,1*
Совокупная площадь Ag-ЯОр в ядре	45,07±2,44	19,47±2,54*
Доля ядер, содержащих 1-3 Ag-ЯОр (%)	30,0±6,52	79,25±5,44*
Доля ядер, содержащих 4-6 Ag-ЯОр (%)	72,0±10,23	20,73±6,68*
Доля полинуклеолярных ядер, содержащих 7 и более Ag-ЯОр (%)	4,0±0,98	0*
Фенотипы Ag-ЯОр (%)		
Нуклеолонемный	77,1±12,23	79,29±9,68
Компактный	8,4±2,41	18,05±1,89*
Микро Ag-ЯОр	14,5±2,35	2,66±0,56*
Гранулярный компонент Ag-ЯОр (шт.)		
Общее количество гранул	2,72±0,52	1,62±0,51*
Интрануклеолярные гранулы	1,27±0,28	1,56±0,32
Экстрануклеолярные гранулы	0,16±0,06	0,06±0,01*

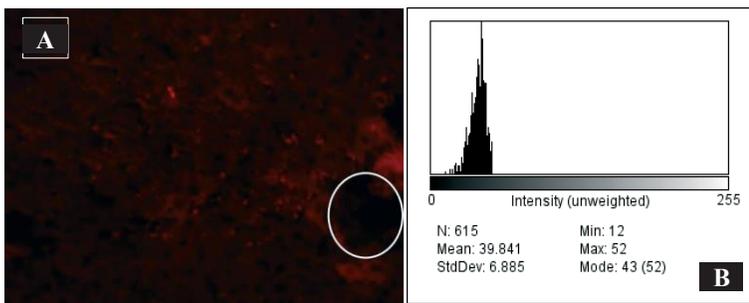
Примечание: * – различия достоверны при $p<0,05$

Ядрышко-ассоциированные гранулы, окрашивающиеся серебром, соотносят с рРНК-протеиновыми комплексами, субъединицами рибосом, количеством функционирующих в клетке РНК-полимераз. Они представлены интрануклеолярными и экстрануклеолярными гранулами, располагающимися в нуклеоплазме. Общее количество гранул при умеренной ГГЦ снижалось в 1,68 раз

($p < 0,05$), главным образом за счет экстрануклеолярной составляющей, тогда как количество гранул, располагающихся внутри Ag-ЯОр, даже несколько увеличивалось (на 22,83%).

Определение белка Ki-67 показало, что у контрольной группы животных этот белок экспрессировался в незначительной части клеток ($11,5 \pm 1,11$ шт/поле зрения), тогда как при ГГЦ число клеток с соответствующим маркером увеличивалось в 2,63 раза ($30,3 \pm 4,09$, $p < 0,05$), значительно повышалась интенсивность его экспрессии (в 1,68 раз, с $39,85 \pm 1,86$ до $67,01 \pm 1,62$ уе на поле зрения, $p < 0,05$) и пролиферативный индекс (с $0,03 \pm 0,01$ до $0,12 \pm 0,07$, $p < 0,05$). Исследования активности Ki-67 показывают роль белка не только как маркера пролиферации, но и раскрывают его участие в регуляции клеточного цикла в целом, поддержании структуры гетерохроматина и сборке перихромосомного слоя на митотических хромосомах (Cuylen S. et al., 2016; Sun X. et al., 2017).

Звездчатые макрофаги (клетки Купфера) являются многочисленной популяцией клеток печени. Они выполняют в этом органе функции, направленные на поддержание гомеостаза железы, играют центральную роль в иницировании, сохранении и восстановлении после воспаления и повреждения печени. Звездчатые макрофаги с фенотипом CD-68+ в печени контрольных животных располагались одиночно либо цепочками, количество их незначительно возросло вблизи центральной вены (Рисунок 1А). При умеренной ГГЦ количество макрофагов CD-68+ значимо увеличивалось (в 1,36 раз, с $103,4 \pm 17,7$ до $140,31 \pm 11,5$) (Рисунок 1Б), повышалась интенсивность свечения продукта реакции (в 1,27 раз, с $38,87 \pm 0,39$ до $49,4 \pm 0,54$ уе).



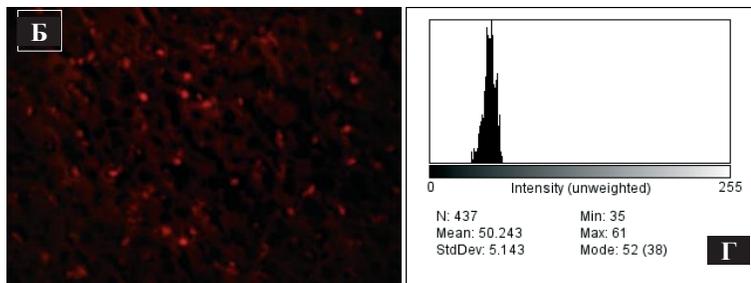


Рисунок 1 – CD-68+ звездчатые макрофаги. А – контроль, Б – умеренная ГГЦ. А – Интенсивность экспрессии иммуногистохимического продукта незначительна, количество клеток возрастает вблизи центральной вены (обведена). Б – количество и размер клеток увеличены, интенсивность свечения продуктареакции повышена. В – график интенсивности свечения продукта реакции, контроль. Г – график интенсивности свечения продукта реакции, умеренная ГГЦ. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68+, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Ок. x10, об. x40.

Перисинуоидные клетки (клетки Ито) у контрольных животных располагались одиночно, плотность расположения составляла $105,77 \pm 8,97$ шт/поле зрения, экспрессия маркера α SAM незначительна. При умеренной ГГЦ перисинуоидные клетки формировали группы, располагались цепочками. Количество клеток увеличивалось в 3,07 раза, составляя $324,33 \pm 13,21$ шт/поле зрения микроскопа. Тьюки-тест показал статистически значимое различие в количестве клеток Ито между исследуемыми группами: $F(4, 58) = 70,324$, $p < 0,0001$. Интенсивность свечения гистохимического продукта реакции при умеренной ГГЦ увеличивалась в 1,5 раза: с $24,45 \pm 0,11$ (интактная популяция) до $36,63 \pm 0,21$ уе. Тьюки-тест показал статистически значимые различия в интенсивности свечения иммунореактивного продукта между исследуемыми группами: $F(4, 8725) = 2100,06$, $p < 0,0001$.

Функциональная активность органа и составляющих его тканей и клеток определяется его полноценным кровоснабжением. При умеренной ГГЦ в печени крыс отмечалось расширение сосудов, вокруг вен формировались лимфоцитарно-лейкоцитарные инфильтраты. Площадь центральной вены в сравнении с контролем возрастала в 5,59 раз, ($p < 0,01$), артерии – в 3,51 раз ($p < 0,01$), междольковой вены – в 2,12 раза ($p < 0,05$), общая площадь синусоидных капилляров была увеличена в 1,62 раза ($p < 0,05$) (Таблица 3). Увеличивалась и площадь желчного протока с $152,50 \pm 27,88$ до $299,61 \pm 52,72$ μm^2 ($p < 0,05$).

Таблица 3 – Площади кровеносных микрососудов печени контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией ($M \pm m$)

Параметры	Центральная вена	Междольковая вена	Междольковая артерия	Синусоидные капилляры
Контроль				
Площадь, $\mu\text{м}^2$	4202,96 \pm 215,69	1009,91 \pm 104,28	886,13 \pm 111,10	1617,96 \pm 123,56
Умеренная гипергомоцистеинемия				
Площадь, $\mu\text{м}^2$	23499,51 \pm 3264,01**	2139,91 \pm 296,94*	3109,56 \pm 375,53*	3099,43 \pm 211,23*

Примечание: различия достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$

Подготовка и аттестация образцов оротовой кислоты

В исходном порошке частицы оротата калия имели камневидную форму и размер 1,5 – 3,0 $\mu\text{м}$. АСМ-изображения механоактивированных частиц порошков оротата калия представлены на Рисунке 2. После 1 часа механоактивации порошок представляет собой отдельные частицы сферической формы с преимущественным размером 60 нм. Через 3 часа механоактивации происходит агрегирование частиц с формой эллипсоида вращения и размером 80 – 150 нм и формирование неустойчивых агрегатов размером до 1,5 $\mu\text{м}$, которые разрушаются при сканировании кремниевым зондом. Через 6 часов механоактивации формируются слоистые агрегаты частиц размером 5 $\mu\text{м}$ и более. Отдельные слои собраны из частичек в форме дисков средней толщиной 100 нм и диаметром 400 – 900 нм.

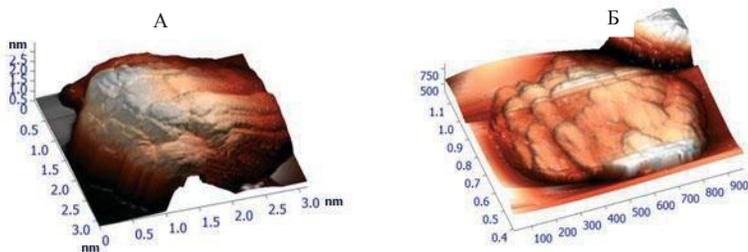


Рисунок 2 – АСМ-изображения механоактивированных порошков оротата калия: А – 1 час механоактивации, Б – 6 часов механоактивации.

Метод РФЭС позволяет установить элементный состав и присутствие в молекуле определенных функциональных групп. В спектрах РФЭС исходного образца доминировали пики от групп $-\text{NH}-$ и $\text{C}=\text{O}$, характерных для оксо-формы оротат-аниона. Механоактивация в течение 1 ч приводит к уменьшению

интенсивности пиков от С=О и –NH- групп, и появлению достаточно интенсивных пиков от С-ОН и –N= групп, что свидетельствует о формировании гидрокси-формы оротат-аниона. После 6 ч механоактивации в спектрах доминируют пики С-ОН и –N= групп, свидетельствуя о том, что в образце доминирует дигидрокси-форма оротат-аниона (Рисунок 3). Анализ РФЭС-спектра механоактивированных образцов показывает наличие изменений, характерных для органических соединений с ароматическими связями.

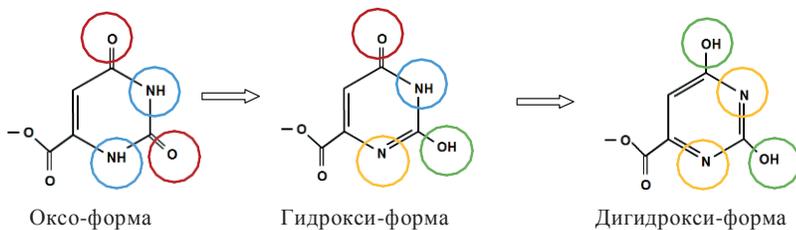


Рисунок 3 – Таутомерные формы оротат-аниона с различным составом функциональных групп

Эффективность ответа организма на лекарство зависит от его растворимости, поскольку именно она обеспечивает проникновение вещества в кровь, всасывание, фильтрацию, диффузию и др. Растворимость и скорость растворения механоактивированных оротатов повышаются. Так, скорость растворения оксо-формы ОК в воде с pH=6,7 составила $5,28 \pm 0,1$ мг/л/мин, ОК-1 – $6,89 \pm 0,1$ мг/л/мин (увеличение на 30,5%), ОК-6 – $5,83 \pm 0,1$ мг/л/мин (увеличение на 10,4%) (Рисунок 4). Растворимость препаратов (г/100гH₂O) составила: 0,04 (ИОК), 0,06 (ОК-1), 0,08 (ОК-6). Увеличение скорости растворения обусловлено повышением дисперсности механоактивированных препаратов.

Распределение в системе «октанол-вода» используется для оценки липофильности исследуемых соединений, поскольку октанол по полярности и строению близок к фосфолипидной мембране. Доля молекул, перешедших из водного раствора ИОК в октанол, составляет 18,5%, ОК-1 – 27%, ОК-6 – 32,5%. Таким образом, растворимость в октанолу возрастает в ряду оксо- < гидрокси- < дигидрокси-форм оротовой кислоты. Снижение липофильности и, соответственно, повышение гидрофобности препаратов обеспечивает более активный трансцеллюлярный перенос молекул растворенного вещества.

Исследование эффектов действия таутомеров оротовой кислоты на животных с умеренной формой гипергомоцистеинемии

Уровень гомоцистеина в крови после коррекции умеренной ГГЦ препаратами оротовой кислоты, содержащими различные формы оротат-аниона снижался во всех группах экспериментальных животных независимо от формы введенного таутомера и составлял (мкмоль/л): 20,2±2,01 при ИОК, 15,6±1,45 при ОК-1, 16,2±1,06 при ОК-6.

Данные анализов крови, отражающих биохимический спектр крови животных, получавших оротовую кислоту в различных таутомерных формах представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Уровни маркерных ферментов печени и билирубина экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

Показатели	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	БЛБ общий, мг/дл	ЩФ, мккат/л
Введение оксо-формы ОК	43,5±4,5	172,5±15,16	3,44±0,87	5,18±0,30
Введение гидрокси-формы ОК	36,5±8,69	119,5±2,69*	2,86±0,56	4,23±0,31
Введение дигидрокси-формы ОК	30,5±5,5*	143,0±2,16*#	3,43±1,01	4,98±0,30

Примечание: * – различия между группами достоверны при $p < 0,05$ в сравнении с ИОК, # – в сравнении с ОК-1

Статистический анализ MANOVA показал, что наблюдалась статистически значимая разница в уровнях ферментов в зависимости от группы $F(12, 81) = 3,638$, $p < 0,0001$, след Пиллаи = 1,051, частичная эта-квадрат = 0,350. Принадлежность к группе оказывала статистически значимое влияние на уровень АЛТ: $F(3, 32) = 2,930$, $p = 0,05$, частичная эта-квадрат = 0,239; АСТ: $F(3, 32) = 6,779$, $p = 0,001$, частичная эта-квадрат = 0,421. Для АЛТ различия между оксо- и гидрокси- формами оротат-аниона составляли 19,2%, оксо-формой и дигидрокси-формой 42,6%; по АСТ – 44,3% и 20,6%, соответственно ($p < 0,05$).

После введения ИОК по сравнению с механомодифицированными формами было выше количество: триглицеридов в 2,4 и 2,3 раза, общего холестерина – в 1,2 и 1,4 раза, чем при введении ОК-1 и ОК-6, соответственно ($p < 0,05$). Количество холестерина ЛПВП было сравнимо в группах с введением ИОК и ОК-1, тогда как у животных, которым коррекция проводилась с применением ОК-1, ЛПВП снижены на 30% (Рисунок 4).

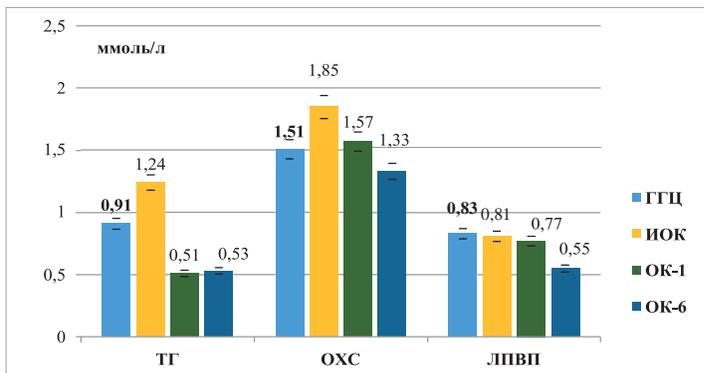


Рисунок 4 – Показатели липидного спектра в экспериментальных группах

При введении препарата содержащего гидроксид-форму оротат-аниона, снижалось количество лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов и тромбоцитов. Количество эритроцитов и гемоглобина восстанавливалось во всех экспериментальных группах. Количество моноцитов в группах с введением ИОК и ОК-6 даже увеличивалось в сравнении с показателями, полученными при умеренной ГГЦ (Таблица 5).

Таблица 5 – Цитологические показатели крови экспериментальных животных

Группы животных Показатели	Контроль	Умеренная ГГЦ	Введение оксо-формы ОК	Введение гидроксид-формы ОК	Введение дигидроксид-формы ОК
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	10,79±2,24	13,75±1,76*	16,62±2,3*	10,02±1,09	18,25±2,62*
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	6,51±0,90	5,26±0,69	6,96±0,98	6,8±1,04	11,9±2,08*
Моноциты (10 ⁹ /л)	0,63±0,23	1,92±0,24*	2,99±0,99*	1,7±0,36*	2,01±0,51*
Эритроциты (10 ¹² /л)	6,75±0,71	5,54±0,49*	6,35±0,91	7,04±0,38	7,05±0,32
Гемоглобин (г/л)	120,62±4,13	110,0±4,94*	123,4±13,78	132,0±1,4	129,0±4,24
Тромбоциты (10 ⁹ /л)	660,75±93,18	933,27±83,42*	607,0±146,76	657,25±72,78	900,5±176,07*

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с контролем, p<0,001

Проведенный дисперсионный анализ MANOVA показал статистически значимые различия в цитологических параметрах белой крови в зависимости от группы F (10, 70) = 35,531, p < 0,0001; след Пиллаи = 1,671, частичная эта-квадрат

= 0,835. Принадлежность к группе оказывала статистически значимое влияние на уровень лейкоцитов: $F(2, 41) = 64,164$, $p = 0,0001$, частичная эта-квадрат равна 0,772; гранулоцитов: $F(2, 41) = 48,843$, $p = 0,001$, частичная эта-квадрат равна 0,720; лимфоцитов: $F(2, 41) = 91,010$, $p = 0,001$; частичная эта-квадрат равна 0,827; тромбоцитов: $F(2, 41) = 17,800$, $p = 0,001$; частичная эта-квадрат равна 0,484.

Таким образом, эффективность действия ОК с различными формами оротат-аниона на фоне гипергомоцистеинемии можно представить следующей последовательностью: гидроксид-форма > оксо-форма > дигидроксид-форма.

Введение таутомеров оротат-аниона сопровождалось восстановлением количества гепатоцитов, незначительным повышением количества ядер (на 19,3, 39,9 и 43,8% при введении оксо-, гидроксид- и дигидроксид-форм ОКсоответственно) (Таблицы 1, 6) и площади ядра, но не площади цитоплазмы клеток(Рисунок 5).

Таблица 6 – Морфометрические характеристики гепатоцитов экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

Показатели	Введение оксо-формы ОК	Введение гидроксид-формы ОК	Введение дигидроксид-формы ОК
Количество гепатоцитов	304,9±10,11	378,5±7,4*	389,0±17,19*
Количество ядер	322,74±15,09	405,9±18,4*	433,57±12,3*
Доля двуядерных клеток (%)	5,85±0,49	7,25±0,59	11,46±1,11*

Примечание: * – при сравнении с оксо-формой различия между группами достоверны при $p < 0,05$

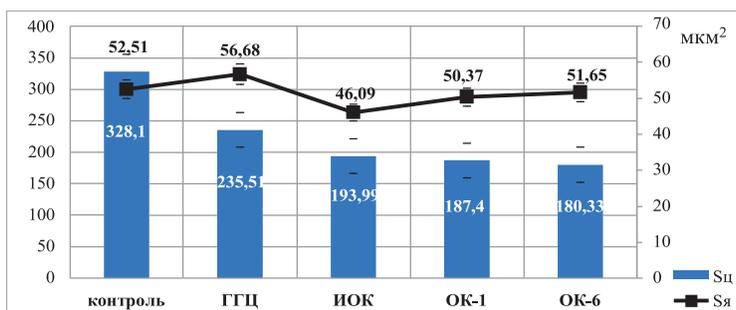


Рисунок 5 – Площади цитоплазмы (Sц) и ядра (Sя) в экспериментальных группах

Выявлено улучшение большинства морфометрических показателей Ag-ЯОр в группах с введением различных форм оротат-аниона независимо от варианта их таутомерной структуры. Увеличивалось среднее количество Ag-ЯОр в ядре, доля полинуклеоларных ядер (в 2,5 раза, 1,86 и 1,77 раз при введении ИОК, ОК-1 и ОК-6 соответственно). Увеличивалось, в сравнении с группой умеренной ГЦ, количество гранул в Ag-ЯОр: в 2,02 раза при введении оксо-таутомера, в 1,82 раза – при введении гидрокси-формы, и в 1,73 раза – при введении дигидрокси-формы ОК ($p < 0,05$).

Введение таутомеров оротовой кислоты сопровождалось снижением числа Ki-67-положительных клеток и пролиферативного индекса (Рисунок 6). При оценке введения различных таутомеров оротовой кислоты между группами наблюдалась статистически значимая разница, определяемая по однофакторному ANOVA: $F(4,750) = 79,994$, $p = 0,0001$.

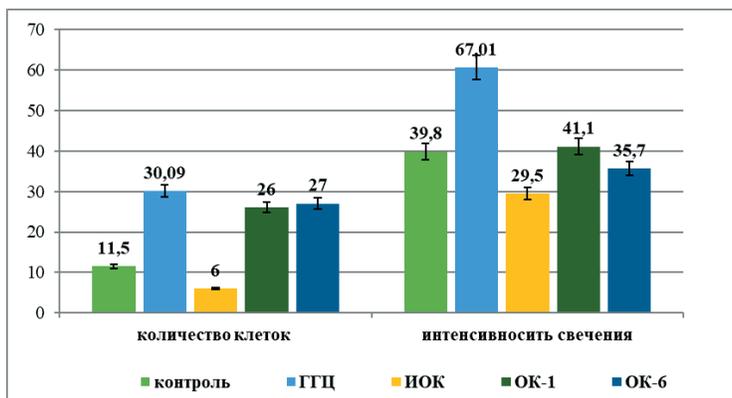


Рисунок 6 – Количество Ki-67-положительных клеток (шт/поле зрения) и интенсивность свечения (экспрессия маркера, уе) в экспериментальных группах

При сравнении количества макрофагов CD-68+ в группах, получавших различные формы таутомеров оротовой кислоты, наблюдалась статистически значимая разница, определяемая по однофакторному дисперсионному анализу ANOVA: $F(4,4019) = 462,819$, $p = 0,0001$. Иммуногистохимический анализ популяции звездчатых макрофагов CD-68+, на фоне введения различных таутомерных форм оротовой кислоты представлен в Таблице 7.

Таблица 7 – Количество звездчатых макрофагов CD-68+ (шт/поле зрения) и экспрессия маркера (в поле зрения, уе) в экспериментальных группах

Группы животных	Контроль	Умеренная ГГЦ	Введение оксо-формы ОК	Введение гидроксиформы ОК	Введение дигидроксиформы ОК
Показатели					
Количество клеток	104,0±13,13	140,31±11,5	149,17±31,31	106,0±14,6*	115,4±10,27
Интенсивность экспрессии маркера	38,87±0,39*	49,40±0,54	31,71±0,26*	24,54±0,36*#	25,68±1,25*#

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с группой умеренной гипергомоцистеинемии; # – с группой, получавшей оксо-форму оротовой кислоты

Количество перисинуоидальных клеток Ито в группе с введением оксо-формы оротовой кислоты в сравнении с группой ГГЦ снижалось в 1,5 раза (их количество составило 211,09±9,75), при введении гидроксиформы ОК – в 2,8 раза (их количество составило 116,75±9,34), дигидроксиформы – в 3,09 раза (их количество составило 105,06±8,09). При сравнении показателей количества клеток Ито в группах животных, получавших ИОК и ОК-1, ИОК и ОК-6 наблюдались достоверные различия, согласно тесту Тьюки ($p < 0,0001$).

Выраженность экспрессии α SAM в группе с введением гидроксиформы составила 20,19±0,19 уе, что в 1,8 раза ниже чем при умеренной ГГЦ (36,63±0,21 уе), и сравнима с контрольными показателями (24,45±0,11 уе). В группах животных, получавших оксо- и дигидроксиформы ОК, отличий от группы с умеренной ГГЦ не наблюдалось, и она оставалась выше исходных контрольных данных в 1,5 раза. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA интенсивности свечения показал статистически значимые различия между всеми группами ($F(4,8725) = 2100,06$, $p = 0,0001$), за исключением сравнения групп с умеренной ГГЦ и с введением ИОК ($p = 0,163$).

В группе с введением ИОК в сравнении с данными контроля площадь центральной вены оставалась выше исходных показателей на 61,18% ($p < 0,05$), площадь междольковой артерии при введении ОК-1 снижалась, но не до уровня контрольных показателей, оставаясь выше на 25% ($p < 0,05$). В группе животных, получавших ОК-6, наблюдалась тенденция к уменьшению показателей ниже контрольных уровней в системе притока крови (междольковые вена и артерия), площади синусоидов. Особенно это касается междольковых вен, площадь которых снижена в сравнении с данными интактного контроля на 37,4% ($p < 0,05$) (Таблицы 3, 8).

Таблица 8 – Площади кровеносных микрососудов печени животных при введении оротовой кислоты в различных формах (M±m)

Площади сосудов, (мкм ²)	Введение таутомеров оротовой кислоты		
	Оксо-форма	Гидрокси-форма	Дигидрокси-форма
Центральная вена	6800,13±1104,31*	5314,55±730,37*	3566,79±999,77* #
Междольковая вена	1161,45±105,52*	956,03±87,3*	852,58±133,2*#
Междольковая артерия	1262,27±101,04	946,11±71,8* #	644,84±53,35 #
Синусоидные капилляры	2642,89±78,64*	1525,28±64,32* #	1372,58±65,52 #

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с данными экспериментальной группы крыс с умеренной гипергомоцистеинемией, $p < 0,05$; # – различия достоверны в сравнении с данными экспериментальной группы крыс с введением исходной формы оротовой кислоты, $p < 0,05$

Таким образом, эффективность действия таутомеров оротовой кислоты на кровеносное микрососудистое русло у животных с гоцистеин-индуцированным поражением печени можно представить следующей последовательностью: гидрокси-форма > оксо-форма > дигидрокси-форма.

ВЫВОДЫ

1. Умеренная форма гипергомоцистеинемии с уровнем гоцистеина в крови $28,9 \pm 2,65$ мкмоль/л формируется добавлением в корм животным метионина в течение 4-х недель, сопровождается морфологической перестройкой клеточных популяций печени и развитием гепатопатии.
2. Умеренная гипергомоцистеинемия сопровождается увеличением содержания в крови ферментов печени, билирубина, триглицеридов, воспалительными изменениями в крови (лейко- и моноцитозом), снижением количества эритроцитов и гемоглобина, тромбоцитозом.
3. Умеренная гипергомоцистеинемия приводит к снижению объема функциональной паренхимы, дистрофическим изменениям клеток, появлению в популяции клеток с крупными ядрами (12,5%), изменению ядерно-ядрышковых взаимоотношений и формированию нуклеолярного стресса; увеличению количества Ki-67-положительных клеток и повышению коэффициента пролиферации; повышению количества и экспрессивности свечения звездчатых макрофагов CD-68+, клеток Ито; дилатации сосудов кровеносного микроциркуляторного русла печени.
4. Механообработка оротовой кислоты в течение 1-6 часов проводит к формированию метастабильных устойчивых форм препарата; к аморфизации препарата и переходу его в мелкодисперсное состояние; к увеличению скорости

растворения в воде, растворимости в воде и октаноле; последовательным таутомерным превращениям оротат-аниона: оксо-→ гидроксид- → дигидроксид-формы.

5. Таутомеры оротовой кислоты понижают содержание гомоцистеина в крови, оказывают противовоспалительный и антитромбоцитарный эффекты, цитопротекторное, митоз-ингибирующее, антифибротическое и ангиопротективное (способствуют нормализации параметров кровеносного микрососудистого русла) действия.

6. Эффективность действия препаратов оротовой кислоты на организм экспериментальных животных определяется формой таутомера оротат-аниона: механомодифицированные формы оротовой кислоты обладают преимуществом по сравнению с исходной оксо-формой оротата. Наиболее выраженный эффект проявляется для гидроксид-формы оротовой кислоты, оксо-форма и дигидроксид-форма оротат-аниона сопоставимы между собой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тукмачева К.А. Гипергомоцистеинемия, атерогенез и адвентициальное воспаление / Н.Н. Чучкова, Н.В. Кормилина, М.В. Сметанина, К.А. Тукмачева // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. – 2018. – № 1. – С. 75-78.
2. Тукмачева К.А. Сравнительная оценка действия таутомеров калия оротата на активность воспалительного процесса у крыс с гипергомоцистеинемией / К.А. Тукмачева, М.В. Сметанина, Н.Н. Чучкова // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции», Рязань, 11–12 апреля 2019 года / Под ред. О.В. Баковецкой. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2019. – С. 96-98.
3. Тукмачева К.А. Морфологические доказательства формирования лекарственного гепатита при избыточном поступлении экзогенного метионина / К.Э. Пантелеев, К.А. Тукмачева, О.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции», Рязань, 11–12 апреля 2019 года / Под ред. О.В. Баковецкой. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2019. – С. 131-132.
4. Тукмачева К.А. Влияние избыточного поступления метионина на белоксинтезирующую функцию гепатоцитов / К.А. Тукмачева // **Морфология**. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 283.
5. Тукмачева К.А. Морфофункциональная характеристика тимуса при введении таутомеров оротата магния / Н.Н. Чучкова, К.А. Тукмачева, О.М. Канунникова, Н.В. Кормилина // **Морфология**. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 317-318.

6. Пазиненко К.А. Изменение массовых коэффициентов органов крыс при избыточном потреблении метионина / К.А. Пазиненко, М.В. Сметанина, О.А. Пазиненко, К.Э. Пантелеев // Труды Ижевской государственной медицинской академии: Сборник научных статей. – Ижевск: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2020. – С. 3-4.
7. Пазиненко К.А. Влияние различных таутомеров оротовой кислоты на морфометрические параметры гепатоцитов и купферовских клеток при экспериментальной гипергомоцистеинемии / К.А. Пазиненко, К.Э. Пантелеев, М.В. Сметанина // Университетская медицина Урала. – 2020. – Т. 6. – № 1(20). – С. 19-21.
8. Пазиненко К.А. Метионин-индуцированная токсическая гепатопатия / К.Э. Пантелеев, К.А. Пазиненко, О.А. Пазиненко // Университетская медицина Урала. – 2020. – Т. 6. – № 1(20). – С. 21-22.
9. Пазиненко К.А. Таутомерные формы магния оротата в коррекции магниевого дефицита и липидного статуса у магнидефицитных животных / Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина, Н.В. Кормилина, К.А. Пазиненко, О.М. Канунникова // **Атеросклероз и дислипидемии.** – 2020. – № 2(39). – С. 49-55. – DOI 10.34687/2219-8202.
10. Пазиненко К.А. Морфофункциональная характеристика печени крыс при длительном введении метионина / К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова, К.Э. Пантелеев, О.А. Пазиненко // **Морфология.** – 2020. – Т. 157. – № 2-3. – С. 162-163.
11. Пазиненко К.А. Влияние экспериментальной гипергомоцистеинемии на экспрессию аргирофильных белков в клетках / М.В. Сметанина, К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова, Н.В. Кормилина // **Морфология.** – 2020. – Т. 157. – № 2-3. – С. 196.
12. Пазиненко К.А. Ядерно-ядрышковые взаимоотношения и нуклеолярный стресс в гепатоцитах при гипергомоцистеинемии / Н.Н. Чучкова, К.А. Пазиненко, М.В. Сметанина, Н.В. Кормилина // **Гены и Клетки.** – 2021. – Т. 16. – № 1. – С. 37-42. – DOI 10.23868/202104005
13. Пазиненко К.А. Механомодифицированная форма оротовой кислоты в коррекции гепатопатии, вызванной гипергомоцистеинемией / К.А. Пазиненко, М.В. Сметанина, Н.Н. Чучкова, О.М. Канунникова, Н.В. Кормилина // **Молекулярная медицина.** – 2021. – Т. 19. – № 1. – С. 35-40. – DOI 10.29296/24999490-2021-01-05.
14. Пазиненко К.А. Кровеносное микроциркуляторное русло печени при гипергомоцистеинемии и введении таутомерных форм оротовой кислоты / Н. Н. Чучкова, К. А. Пазиненко, М. В. Сметанина, О.А. Пазиненко, К.Э. Пантелеев, В.М. Чучков, Н.В. Кормилина, О.М. Канунникова // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2021. – Т. 10. – № 2. – С. 55-61. – DOI 10.18499/2225-7357-2021-10-2-55-61.
15. Пазиненко К.А. Характеристика таутомерных форм оротата калия, полученных методом механоактивации / Н.Н. Чучкова, О.М. Канунникова, К.А. Пазиненко, М.В. Сметанина, О.В. Карбань, О.Л. Полякова // **Волгоградский научно-медицинский журнал.** – 2021. – № 2. – С. 52-56.

16. Пазиненко К.А. Динамика биохимических и цитологических показателей крови крыс при моделировании хронической алиментарной метионин-обусловленной гомоцистеинемии / К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина, О.А., Пазиненко, К.Э. Пантелеев, Г.В. Иванов, Н.В. Кормилина // **Биомедицина**. – 2021. – т. 17, № 2. – №2. – С. 46-57.
17. Pazinenko K.A. Morphofunctional characterization of rat thymus mast cells after administration of magnesium orotate mechanically activated forms / N.N. Chuchkova, M.V. Smetanina, A.E. Shklyayev, K.A. Pazinenko, N.V. Kormilina, O.M. Kanunnikova // **RUDN Journal of Medicine**. – 2021. – V. 25. – № 3. – P. 248-255. – DOI: 10.22363/2313-0245-2021- 25-3-248-255.
18. Пазиненко К.А. Противовоспалительный эффект таутомеров оротат-аниона в коррекции лекарственно-обусловленного гепатита у крыс / К.А. Пазиненко, Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина // **Журнал медико-биологических исследований**. – 2021. – т. 9, №4. – С. 366-373.

РАСШИФРОВКА АББРЕВИАТУР И СОКРАЩЕНИЙ

Ag-ЯОр – ядрышковый организатор, окрашенный азотнокислым серебром
ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ
MANOVA – многофакторный дисперсионный анализ
 α SAM – гладкомышечный α -актин
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСМ – атомно-силовая микроскопия
АСТ – аспаратаминотрансфераза
БЛБ – билирубин
ГГЦ – гипергомоцистеинемия
ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, без механоактивации
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
ОК – оротовая кислота
ОК-1 – гидрокси-форма оротовой кислоты, 1 час механоактивации
ОК-6 – дигидрокси-форма оротовой кислоты, 6 часов механоактивации
ОХ – общий холестерин
РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
ЩФ – щелочная фосфатаза