

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

На правах рукописи

Пазиненко Ксения Андреевна

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

Специальность 1.5.22 – Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Н.Н. Чучкова

Научный консультант:
доктор физико-математических наук,
профессор О.М. Канунникова

Ижевск

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Гипергомоцистеинемия как фактор патологии человека и животных	11
1.1.1 Определение, стадии и механизмы развития гипергомоцистеинемии	11
1.1.2 Модели формирования гипергомоцистеинемии в эксперименте	14
1.1.3 Клеточные популяции печени	16
1.1.4 Механизмы повреждения печени при гипергомоцистеинемии	25
1.2 Оротовая кислота, механизмы действия, медицинское применение	27
1.3 Механохимия и механоактивация лекарственных препаратов	30
ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Дизайн эксперимента	36
2.2. Экспериментальная модель умеренной гипергомоцистеинемии	37
2.3. Цитологические и биохимические исследования крови	39
2.4. Гистологические и иммуногистохимические методы исследования	40
2.5. Подготовка и аттестация образцов оротовой кислоты	44
2.6. Математические и статистические методы исследования	47
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
ГЛАВА 3.1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ	48
3.1.1. Биохимические пробы печени и цитологические показатели крови процессе формирования гипергомоцистеинемии	48
3.1.2. Морфометрическая характеристика клеточных популяций печени	55
3.1.3 Морфометрическая характеристика кровеносного микрососудистого русла печени	77
ГЛАВА 3.2. ВЛИЯНИЕ МЕХАНОАКТИВАЦИИ НА СТРУКТУРУ ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ (ОРОТАТА КАЛИЯ)	83
3.2.1 Морфология частиц образцов оротата калия	83

3.2.2 Влияние механоактивации на химическое строение оротата калия	84
3.2.3 Физико-химические свойства растворов оротата калия.....	86
ГЛАВА 3.3. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТАУТОМЕРНЫХ ФОРМ ОРОТАТА-АНИОНА (ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ) НА ОРГАНИЗМ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С УМЕРЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ	91
3.3.1. Биохимические пробы печени и цитологические показатели крови	91
3.3.2. Морфометрическая характеристика клеточных популяций печени.....	99
3.3.3. Морфометрическая характеристика микрогемоциркуляторного русла печени.....	122
ГЛАВА IV ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	151
ВЫВОДЫ	156
РАСШИФРОВКА АББРЕВИАТУР И СОКРАЩЕНИЙ	158
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы

Исследования последних лет доказывают, что повышенный уровень гомоцистеина является маркером развития сердечнососудистых заболеваний и нейродегенеративных заболеваний (Kim J. et al., 2018; Cordaro M. et al., 2021). Гомоцистеин представляет собой аминокислоту сульфгидрильной группы, которая является промежуточным продуктом в метаболизме метионина и цистеина. Повышение уровня гомоцистеина в плазме крови свыше 15 мкмоль/л приводит к формированию гипергомоцистеинемии (Son P., Lewis L., 2020). Основной причиной гипергомоцистеинемии является дисфункция ферментов и кофакторов, связанных с процессом биосинтеза гомоцистеина (Perla-Kaján J., Jakubowski H., 2019; Zaric B.L., 2019). Основанием для повышения уровня гомоцистеина также могут быть: чрезмерное потребление добавок или продуктов, содержащих метионин (Sjoberg K.A. et al., 2020), некоторые заболевания (Koller A., Szenasi A., 2018; Lima A., Ferin R., 2020; Peng Y.P., Huang M.Y., 2020), побочные эффекты применения ряда лекарственных препаратов (метформин, инсулин, противосудорожные препараты) (Reznik E.V., Shcherbakova E.S., 2019; Hussein J., El-Naggar M., Badawy E., 2020; Zhao Q., Song W., Huang J., 2020).

Наиболее часто встречающимся вариантом гипергомоцистеинемии является ее умеренная форма (уровень гомоцистеина 15-30 мкмоль/л). 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). В связи с этим, коррекция нарушенной функции печени при длительном состоянии гипергомоцистеинемии является необходимой и актуальной. Имеющиеся на фармацевтическом рынке апробированные, уже зарекомендовавшие себя лекарственные препараты, в том числе соли оротовой кислоты, оказывают широкое воздействие 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), входящего в состав препарата (Nagham Mahmood Aljamali, 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., Strobridge 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.
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 гидрокси-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 гидрокси-форма оротовой кислоты, установлен ее значимый гепатопротекторный, противовоспалительный, антитромботический и антифиброгенный ответы. Доказано, что эффективность дигидрокси- и оксо-форм сопоставима и ниже, чем гидрокси-формы.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, направленное на оценку морфофункционального состояния печени при умеренной форме ГГЦ 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 ГГЦ. 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 ГГЦ, 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 гидроксиформы препарата оротовой кислоты перед его таутомерными оксо- и дигидроксиформами. Работа закладывает основу для возможного практического использования (после клинической апробации) модифицированного препарата гидроксиформы 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, гомотеинин-индуцированной 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 октаноле (в среднем на 30%); последовательным таутомерным превращениям оротат-аниона: оксо-→гидрокси-→дигидрокси-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 16 печатных работ, включая 10 публикаций в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 6 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).

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гипергомоцистеинемия как фактор патологии человека и животных

1.1.1. Определение, стадии и механизмы развития гипергомоцистеинемии

В шестидесятых годах 20 века известный американский патологоанатом Мак Калли (McCully K.S., 1969) впервые выдвинул гипотезу о том, что повышенный уровень гомоцистеина в крови может являться фактором риска для развития атеросклероза.

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) устанавливается, когда уровень гомоцистеина в плазме или сыворотке крови превышает 15 мкмоль/л (Refsum H., Ueland P.M., Nygård O. et al., 1998; Kang S.S., Rosenson R.S., 2018). При уровне гомоцистеина более 15 мкмоль/л диагностируют умеренную, более 30 мкмоль/л – среднюю, более 100 мкмоль/л – тяжелую ГГЦ. Чаще всего тяжелая ГГЦ наблюдается у пациентов вследствие генетических дефектов ферментов, участвующих в метаболических путях гомоцистеина (Лебедева А.Ю, Михайлова К.В., 2006; Son P., Lewis L., 2020).

Гипергомоцистеинемия является сопутствующим фактором риска в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза и его осложнений, таких как инфаркт, инсульт, тромбоз коронарных, церебральных и периферических артерий. Последние данные свидетельствуют о том, что гипергомоцистеинемия также связана с заболеваниями, затрагивающими другие органы (Long Y., Zhen X., Zhu F., 2017; Djuric D. et al., 2018; Hasan T. et al., 2019; Murray B. et al., 2019; Reddy V.S., Trinath J., Reddy G.B., 2019; Kowluru R.A., Mohammad G., Sahajpal N., 2020; Son P., Lewis L., 2020; Muzurović E. et al., 2021). Повышенный уровень гомоцистеина является дополнительным тестом на отсутствие витамина B12 при скрининге врожденных нарушений метаболизма метионина (Djuric D. et al., 2018).

Гомоцистеин – это аминокислота сульфгидрильной группы, которая является промежуточным продуктом в метаболизме метионина и цистеина. Гомоцистеин – это непротеиногенная аминокислота, которая ведет себя одновременно как субстрат и как продукт метионина. Он играет ключевую роль в метилировании, при котором метильная группа перемещается к различным субстратам. Образованный гомоцистеин может утилизироваться двумя путями: 1. реметилированием до метионина посредством каталитической активности фермента N5, N10-метилентетрагидрофолат редуктазы; 2. превращением в цистеин в реакции, которую катализирует цистатионин β-синтаза (Hannibal L., 2016; Djuric D. et al., 2018; Poddar R., 2021). Пути превращения метионина представлены на Рисунке 1.1.1.1.

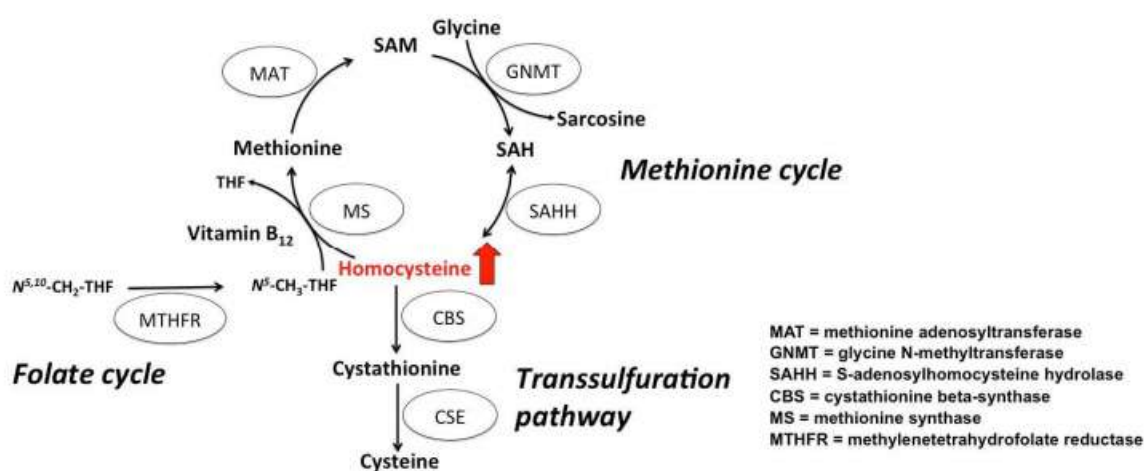


Рисунок 1.1.1 – Пути метаболизма гомоцистеина (Hannibal L., Henk J., 2016)

Негативное воздействие гомоцистеина достигается за счет различных механизмов, таких, например, как сверхактивация рецепторов N-метил-D-аспартата, активация TLR-4, нарушение транспорта Ca^{2+} , повышение активности оксидазы восстановленного никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФН) и последующего повышения продукции активных форм кислорода, повышение активности синтазы оксида азота и как результат нарушение синтеза NO и

повышение синтеза реактивных форм кислорода (Familtseva A. et al., 2017; Martínez Y. et al., 2017; Wang L., Niu H., Zhang J., 2020). Повышение продукции реактивных форм кислорода при гипергомоцистеинемии соотносят с повышением экспрессии некоторых провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, фактор некроза опухоли, фактор хемотаксиса моноцитов и внеклеточная адгезионная молекула-1 (Al Mutairi F., 2020; Elsherbiny N.M. et al., 2020; Stanisic D. et al., 2021). Все эти механизмы способствуют появлению заболеваний, таких как атеросклероз, инфаркт миокарда, инсульт, аневризма аорты, болезнь Альцгеймера и другие (Djuric D. et al., 2018; Reddy V.S., Trinath J., Reddy G.B., 2019; Kowluru R.A., Mohammad G., Sahajpal N., 2020; Son P., Lewis L., 2020; Muzurović E. et al., 2021).

Как отмечают А.Ю. Грабан и Д. Рыглевич Д., (2013), образование тиолактона способствует накоплению в клетках свободных радикалов и потери реактивных электрофильных мест при окислительном фосфорилировании, что активирует белки и ненасыщенные жирные кислоты. Кроме того, гомоцистеин уменьшает активность внеклеточной перекисной дисмутаза. Было установлено, что гипергомоцистеинемия способствует тромбообразованию вследствие нарушения процесса синтеза NO в эндотелиальных клетках, следовательно, уменьшается количество S-нитрогомоцистеина, нарастают процессы оксидации, агрегации тромбоцитов и нарушается вазодилатация (Грабан А.Ю., Рыглевич Д., 2013; Jiang Y. et al., 2008; Kamiya T., Machiura M., Makino J., 2013).

Гипергомоцистеинемия может индуцировать окислительный стресс, инициировать эндотелиальное и перекисное окисление липидов, повреждать эндотелиальные клетки и митохондриальную ДНК, дополнительно вызывать дисфункцию эпителиальных клеток и способствовать их апоптозу, образованию бляшек за счет ингибирования активности антиоксидантных ферментов и высвобождения активных форм кислорода путем собственного окисления (Guo G. et al, 2018; Wang H. et al., 2020).

Витамины, такие как фолиевая кислота и витамин B12, являются кофакторами трансметилазы в метаболизме гомоцистеина. Фолиевая кислота снижает уровень гомоцистеина, и ее рекомендуется принимать при гипергомоцистеинемии (Tian H., Tian D., Zhang C., 2017; Kang S.S., Rosenson R.S., 2018), однако метаанализ показывает, что витаминные добавки не могут уменьшить частоту сердечно-сосудистых заболеваний в должной мере. Таким образом, необходим поиск методов лечения ГГЦ, которые могут быть использованы в повседневной медицинской практике и иметь наименьшее количество побочных эффектов (Maron B.A., Loscalzo J., 2009; Wang H. et al., 2020; Poddar R., 2021).

1.1.2. Модели формирования гипергомоцистеинемии в эксперименте

На данный момент существует несколько биологических моделей формирования гипергомоцистеинемии, которые включают генетические варианты и модели с использованием различных диет.

Делеция гена CBS (цистатион-β-синтаза) – это генетическая модель формирования гипергомоцистеинемии, связанная с делецией гена, кодирующего фермент цистатион-β-синтазу, который катализирует реакцию превращения гомоцистеина в цистатион. Было обнаружено, что уровни гомоцистеина в плазме крови гомозиготных мышей с дефицитом CBS (CBS -/-) в 50 раз выше, чем у мышей дикого типа, у гетерозиготных по CBS-гену мышей (CBS +/-) уровень гомоцистеина в плазме крови примерно вдвое выше, чем у мышей дикого типа (Watanabe M. et al., 1995). Исходя из этих данных, гомозиготные мыши с CBS-дефицитом (CBS -/-) являются подходящими для изучения тяжелой формы гипергомоцистеинемии, а гетерозиготные мыши подходят для исследования ее умеренной формы.

Делеция гена MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза) – генетическая модель, связанная с нарушением синтеза соответствующего фермента, который в норме участвует в метаболизме витамина B9 (фолиевой кислоты). Фермент

катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который в свою очередь является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для реметилирования гомоцистеина в метионин. Гомозиготные мыши MTHFR (-/-) демонстрировали умеренную гипергомоцистеинемию: общий уровень гомоцистеина в плазме был равен примерно 30 мкмоль/л (Azad M.A. et al., 2018). Однако гипергомоцистеинемия, являющаяся следствием генетических дефектов, не является широко распространенной причиной заболевания у человека.

Формирование гипергомоцистеинемии с использованием диетических добавок – еще один подход к формированию ГГЦ. В большинстве исследований показано, что пищевые добавки с метионином могут регулировать метаболизм гомоцистеина. Ряд авторов описывают модель формирования ГГЦ при употреблении метионина в концентрации 12-20 г/кг массы тела, при которой формировалась умеренная форма гипергомоцистеинемии с концентрацией гомоцистеина в плазме от 18 до 60 мкмоль/л (Hofmann M.A. et al. 2001; Tan H. et al. 2006). Тяжелая форма гипергомоцистеинемии, при которой уровень гомоцистеина в плазме крови составляет свыше 200 мкмоль/л, может быть достигнута путем увеличения приема метионина до 24,6 г/кг (Werstuck G.H. et al. 2001; Wang L. et al. 2004). Однако потребление метионина более 20 г/кг может оказывать выраженные токсические эффекты и влиять на рост организма. Так, исследование диетических добавок метионина в концентрации 22 г/кг приводило к потере веса, а добавление метионина 44 г/кг показало тяжелую задержку роста и раннюю смерть у мышей с дефицитом аполипопротеина E (ApoE -/-) (Zhou J. et al., 2001). Учитывая эти данные был сделан вывод о том, что чрезмерное количество метионина может быть смертельным для человека (Cottingham E.M. 2002).

Модель формирования гипергомоцистеинемии может быть вызвана внутрибрюшинным введением гомоцистеина в дозе 0,001 мг на 1 мл циркулирующей крови в течение 10 дней. В данной модели уровень гомоцистеина

в плазме крови достигал $39,1 \pm 1,34$ мкмоль/л, что соответствует умеренной форме гипергомоцистеинемии (Смирнов А.В. и др., 2005; Кривошеева Е.М., 2011; Сметанина М.В., 2014). Основным преимуществом такой модели является исключение других факторов влияния на организм кроме гипергомоцистеинемии.

Моделирование гипергомоцистеинемии ежедневным (2 раза в сутки) внутрижелудочным введением суспензии метионина в дозе 1,5 г на кг массы тела животного демонстрируется в работе Д.В. Медведева (2014). Состав суспензии (по массе), согласно данным автора: 25% метионина, 65% 1%-го водного раствора крахмала и 10% твина-80. Помимо суспензии животные получают 1%-й раствор метионина вместо питьевой воды. При введении суспензии в течение одной-двух недель было отмечено повышение концентрации гомоцистеина в плазме крови, но его уровень не достигал 15 мкмоль/л (8,0–13,7 мкмоль/л), то есть формирования гипергомоцистеинемии не происходило. Однако уже при трехнедельном внутрижелудочном введении суспензии метионина с добавлением его в питьевую воду, уровень гомоцистеина поднимался до концентрации, соответствующей тяжелой форме ГГЦ у человека (225,8 – 334,4 мкмоль/л) (Медведев Д.В., 2014; Новгородская Я.И., Кравчук Р.И., Островская О.Б., 2019). Недостатком этого метода является достаточно травматичный способ введения препарата и моделирование тяжелой формы ГГЦ, редко встречающийся у человека.

1.1.3. Клеточные популяции печени

Клеточные популяции печени представлены клетками паренхимы – гепатоцитами (60%) и непаренхимальными клетками: звездчатые макрофаги (клетки Купфера), перисинусоидные клетки (звездчатые клетки Ито, перициты), эндотелиоциты, Pit-клетки, иммунные клетки, такие как лимфоциты и лейкоциты, которые расположены в разных зонах дольки (Godoy P., Hewitt N.J., Albrecht U. et al., 2013).

Гепатоциты – это клетки паренхимы печени, выполняющие большую часть метаболических функций и составляющие основную часть общей популяции

клеток печени (Цыркунов В.М., Андреев В.П., Кравчук Р.И., 2019; Kmiec Z., 2001; Godoy P. et al., 2013). Гепатоциты являются основной мишенью для альтерирующих агентов (биологических и химических), и их повреждение приводит к острым или хроническим заболеваниям печени (Kmiec Z., 2001).

Гепатоциты представляют собой полигональные клетки, диаметр которых варьирует от 25 до 30 мкм в длину и от 20 до 25 мкм в ширину. Клетки паренхимы печени млекопитающих могут быть одноядерными, двоядерными или многоядерными. Они имеют уникальную топографию: их апикальный домен образует трубчатую систему путем соединения двух соседних гепатоцитов плотными соединениями. Базолатеральный домен гепатоцитов образован синусоидальной и латеральной плазматической мембраной. На синусоидальной стороне гепатоциты непосредственно контактируют с плазмой крови, так как синусоидальные капилляры фенестрированы (перфорированы) и окружены прерывистой базальной мембраной. На боковой мембране гепатоциты контактируют с соседними гепатоцитами через десмосомы и щелевые соединения. Эта уникальная топография позволяет базолатеральной плазматической мембране опосредовать интенсивный обмен веществами с плазмой крови (Godoy P. et al., 2013).

Гепатоциты экспрессируют большинство циркулирующих белков плазмы, таких как альбумин, белки-транспортёры, ингибиторы протеаз, факторы свертывания крови, модуляторы иммунных комплексов и воспаления. Они контролируют гомеостаз таких молекул, как глюкоза/гликоген, холестерин, желчные кислоты, витамины А и D, метаболизируют аминокислоты, металлы и эндогенные продукты такие как гем и билирубин. Для детоксикации аммиака и регуляции pH необходим синтез мочевины, который осуществляется гепатоцитами, поэтому метаболизм аммиака часто используется в качестве функционального маркера печеночного фенотипа (Michalopoulos G.K., 2007; Tanaka M. et al., 2011). Реактивность клеток паренхимы печени по отношению к большому количеству гормональных, паракринных и аутокринных сигналов

имеет важное значение для контроля функций печени. Печень представляет собой, вероятно, наиболее интенсивно изучаемый орган организма в отношении механизмов трансдукции гормональных сигналов, в гепатоцитах выявлены внутриклеточные гормональные рецепторы для многих гормонов и других сигнальных молекул. Кроме того, гепатоциты синтезируют и высвобождают некоторые прогормоны, и многие другие межклеточные медиаторы, которые поступают в кровоток.

Непаренхимальные участки печени в основном представлены эндотелиальными клетками (около 19% от общей массы клеток печени). Остальные основные типы клеток печени – это перисинусоидные клетки (6%) (Kmieć Z., 2001) и звездчатые макрофаги (15%) (Godoy P. et al., 2013).

Печеночные синусоидальные эндотелиальные клетки являются высокоспециализированными эндотелиальными клетками на границе между кровью, полученной из висцеральной жировой ткани и кишечника, с одной стороны, и печеночными звездчатыми клетками и гепатоцитами, с другой (Hammoutene A., Rautou P.E., 2019). Это плоские, удлинённые клетки с небольшим телом и многочисленными тонкими цитоплазматическими отростками из выстилки синусоидальной стенки. Клетки содержат множество мелких пор, или фенестраций, с приблизительным диаметром от 100 до 150 нм (Sørensen K.K. et al., 2015; Poisson J. et al., 2017), которые распределены в кластеры из 10-50 пор, называемых ситовыми пластинами, и занимают 6-8% поверхности эндотелия – это означает, что около 93% синусоидальной выстилки представлено непрерывным эндотелием. Фенестры имеют цитоскелетное кольцо, состоящее из актина, миозина и актин-связывающих белков (Kmieć Z., 2001). Поры обеспечивают открытые каналы между синусоидальной кровью и субэндотелиальным пространством Диссе (Sørensen K.K. et al., 2015). Эта открытая поровая система облегчает перенос субстратов между кровью и паренхимой печени и регулирует движение липопротеинов к гепатоцитам и от них. Ядра эндотелиальных клеток относительно малы, содержат агрегаты

гетерохроматина и ядрышко. Помимо обычных клеточных органелл, таких как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, микротрубочки, микрофиламенты, аппарат Гольджи и несколько пероксисом, имеется большое количество лизосом, фагосом, покрытых оболочкой, таким образом компоненты лизосомальной и эндосомальной систем составляют 12,4% объема клетки (Kmieć Z., 2001).

Печеночные синусоидальные эндотелиальные клетки – это не просто барьерные клетки, ограничивающие доступ переносимых кровью соединений в паренхиму, это функционально специализированные клетки, выполняющие сложные функции и проявляющие некоторое сходство с эндотелием лимфатических сосудов, что подтверждает мнение о том, что печень также проявляет особенности лимфатического органа. Это включает в себя не только рецептор-опосредованный клиренс эндотоксинов, бактерий и других соединений, но и регуляцию воспаления, иммунные реакции на патогенные микроорганизмы. Помимо того, что синусоидальные эндотелиальные клетки снабжены скэвенджер-рецепторами, которые способствуют эффективному поглощению потенциальных антигенов, они также обладают уникальной способностью функционировать как антигенпрезентирующие клетки (Limmer A., Knolle P.A., 2001). Эндотелиальные клетки играют ключевую роль в ангиогенезе (образование новых кровеносных сосудов из уже существующих) и васкулогенезе (организация эндотелиальных клеток в сосудистые структуры печени) (Semela D., Shah V., 2008).

Также в печени присутствует группа клеток мезенхимального происхождения – звездчатые макрофаги (клетки Купфера). Клетки Купфера являются резидентными макрофагами печени и играют важную роль в ее гомеостазе, а также участвуют в острых и хронических реакциях печени на токсические соединения. Активация клеток Купфера токсическими агентами прямо или косвенно приводит к высвобождению целого ряда медиаторов воспаления, факторов роста и активных форм кислорода (Roberts R.A., Ganey P.E., Ju C., 2006; Tacke F., 2017). Провоспалительные цитокины такие как фактор некроза опухоли α (TNF α) и IL-1b потенциально могут вызывать гибель

гепатоцитов путем активации сигнальных путей трансдукции, приводящих к апоптозу, таких как p38, JNK и генерацию активных форм кислорода (Godoy P. et al., 2013).

Клетки Купфера очень похожи на другие макрофаги: они имеют многочисленные микроворсинки, пузырьки. Во многих случаях их цитоплазматические процессы осуществляются через фенестры эндотелиальных клеток и выходят в субэндотелиальное пространство Диссе, находясь в непосредственном контакте с печеночными звездчатыми клетками и гепатоцитами. Звездчатые макрофаги имеют бобовидное ядро и обильную цитоплазму, содержащую множество хорошо развитых гетерогенных лизосом и пиноцитозных везикул. Эти ультраструктурные особенности отражают значительную роль этих клеток в деградации частиц и веществ, взятых из кровотока. Стереологический анализ клеток Купфера в перфузионно-фиксированной печени крыс выявил следующий объемный состав: ядро – 19%, цитоплазма – 61%, митохондрии – 4,5%, лизосомы – 13,5%, пиноцитарные везикулы – 2% (Kmieć Z., 2001).

Морфологически клетки Купфера отличаются от других макрофагов тем, что они демонстрируют характерную картину при эндогенном пероксидазном окрашивании гранулярного эндоплазматического ретикулума и перинуклеарной оболочки. Они экспрессируют ряд антигенов, характерны для моноцитов/макрофагов, такие как антиген CD-68; однако они обладают также клеточно-специфическими антигенами, например рецептором галактозы/фукозы (Ельчанинов А.В. и др., 2019; Kmieć Z., 2001).

Клетки Купфера сосредоточены в перипортальной области печени, что является выгодным положением для контроля крови, поступающей в печень (Красовский В.С. и др., 2020). В дольке печени крысы 43% звездчатых макрофагов являются перипортальными, 32% находятся в средней зоне, 25% – в перивенозной зоне. Было описано, что макрофаги могут вносить вклад в индукцию гепатотоксичности, продуцируя провоспалительные цитокины, такие

как TNF α и IL-1 β (Элбакидзе Г.М., 2012; Лазарева Е.Ю., Колосков А.В., 2019; Goldin R.D. et al., 1996). Однако макрофаги также могут секретировать IL-10, TGF- β и IL-18 – связывающие белки, которые являются противовоспалительными цитокинами (Gordon S., 2003; Ip W.K., Hoshi N., Shouval D.S., 2017; Kaplanski G., 2018). Кроме того, в последние годы был достигнут огромный прогресс в идентификации различных подтипов макрофагов с помощью проточной цитофлуориметрии – метода, позволяющего количественно выявлять поверхностные антигены, отражающие различные популяции макрофагов (Geissmann F., Manz M.G., Jung S. et al, 2010). Определение фенотипа макрофагов основано на выявлении их про- или противовоспалительных свойств, определяемое набором цитокинов, которые они выделяют: M1 или классически активированные макрофаги, индуцированные липополисахаридом и Th1 цитокинами (например, IFN γ , ИЛ-1); M2 или альтернативно активированные макрофаги, индуцированные апоптотическими тельцами или Th2-цитокинами (например, Ил-4, Ил-10 и Ил-13) (Ельчанинов А.В. и др., 2019; Лазарева Е.Ю., Колосков А.В., 2019; Gordon S., 2003; Geissmann F. et al., 2010; Guillot A., Tacke F., 2019).

Как и другие макрофаги, клетки Купфера активно участвуют в эндоцитозе и фагоцитозе, благодаря наличию многочисленных рецепторов клеточной поверхности (Лазарева Е.Ю., Колосков А.В., 2019).

Активированные макрофаги печени выделяют различные вещества, которые оказывают паракринный и аутокринный эффекты в ткани железы и эндокринные эффекты во всем организме. Клетки Купфера играют важную роль в элиминации как растворимых, так и переносимых кровью твердых частиц, полученных из портальной циркуляции, в отличие от гепатоцитов, которые поглощают только растворимые молекулы из кровяного русла. Например, клетки Купфера очищают кровь от IgG-комплексов путем их связывания с Fc-рецепторами (Johansson A.G., Sundqvist T., Skogh T., 2000).

Клетки Купфера могут играть важную роль во внутрипеченочной иммуносупрессии и индукции иммунологической толерантности. Поскольку активированные клетки Купфера действуют также как антигенпрезентирующие клетки по отношению к внутрипеченочным лимфоцитам из-за экспрессии высоких уровней МНС I и II классов, а также ко-стимулирующих молекул CD-80 и CD-40, они могут играть определенную роль в регуляции иммунных реакций печени. Подобно другим макрофагам, клетки Купфера обладают сильной цитотоксической активностью и могут также участвовать в противоопухолевой защите (Kmieć Z., 2001). Понимание роли клеток Купфера в этих разнообразных реакциях, является ключом к пониманию механизмов повреждения печени.

Специфичные для печени перисинусоидные клетки называются печеночными звездчатыми клетками (клетки Ито) (Цыркунов В.М. и др., 2016). Они находятся в субэндотелиальном пространстве Диссе, определяемом как пространство между синусоидальными эндотелиальными клетками печени и гепатоцитами. Клетки Ито были впервые описаны в 1876 году немецким анатомом Карлом фон Купффером, который визуализировал их с помощью препаратов хлорида золота. Он назвал эти клетки «sternzellen», что означает звездчатые клетки из-за их формы. В 1952 году Тоширо Ито описал перисинусоидные клетки как жировые клетки, основываясь на их способности накапливать липидные капли, названные позже липоцитами или клетками Ито (Цыркунов В.М. и др., 2016; Kostallari E., Shah V.H., 2019). Звездчатые клетки не покрыты истинной базальной мембраной, в отличие от типичных перицитов в кровеносных капиллярах. Клетки Ито содержат цитоскелет, ориентированный вдоль их длинных осей, и некоторые структуры, такие как митохондрии, везикулы, шероховатый эндоплазматический ретикулум и частицы гликогена. Одна звездчатая клетка может взаимодействовать более чем с одним соседним синусоидом и вступать в контакт с большим количеством гепатоцитов (Kmieć Z., 2001).

Наиболее характерной структурной особенностью звездчатых клеток является наличие в цитоплазме многочисленных крупных (до 8 мкм в диаметре) липидных капель, которые имеют или не имеют мембраны и содержат ретиноиды (главным образом ретинилпальмитат), триглицериды, холестерин и свободные жирные кислоты. Образование, размер и количество липидных капель зависят от физиологических условий, вида и пищевого потребления витамина А (Красовский В.С. и др., 2020; Kmiec Z., 2001). Хорошо охарактеризована ультраструктура звездчатых клеток печени. Ядро овальное и часто сжато липидными каплями. Цитоплазма характеризуется наличием большого количества диктиосом аппарата Гольджи, многочисленных микропиноцитарных везикул, хорошо развитого гранулярного эндоплазматического ретикулума и плохо – агранулярного эндоплазматического ретикулума, небольшого количества митохондрий и лизосом, редких пероксисом, незначительного количества частиц гликогена. Цитоплазматический матрикс содержит пучки микрофиламентов и микроканальцев, в том числе актиновых и промежуточных филаментов (Kmiec Z., 2001). В печени покоящиеся перисинусоидные клетки составляют ~10% от общего числа резидентных клеток. Хранение ретинола или витамина А в цитоплазматических липидных каплях является наиболее отличительной особенностью покоящихся клеток Ито. Эти липидные капли обычно используются для выявления звездчатых клеток и являются автофлуоресцентными при возбуждении светом ~328 нм (Kostallari E., Shah V.H., 2019).

Звездчатые клетки, активированные повреждением, их транс-дифференцировка в направлении коллаген-секретирующих миофибробластов, играют ключевую роль в инициации и прогрессировании фиброза печени (Лебедева Е. И., Мяделец О.Д., 2019; Киселева Я.В., Жариков Ю.О., Масленников Р.В., 2020; Krenkel O. et al., 2019; Gaul S. et al., 2021). Более того, при повреждении печени клетки Ито проявляют повышенную сократительную активность и, таким образом, могут влиять на синусоидальный кровоток

(Terkelsen M.K. et al., 2020). Секреция лептина активированными звездчатыми клетками может быть вовлечена в модуляцию действий многих провоспалительных цитокинов (Barry A. E. et al, 2020). Показано, что клетки Ито играют важную роль в регенерации печени после частичной гепатэктомии (Preziosi M.E., Monga S.P., 2017).

Ямочные клетки (Pit-клетки, печеночные НК-клетки) часто можно увидеть в синусоидальном просвете с синусоидальными эндотелиальными клетками. Они находятся в контакте с филоподиями клеток Купфера или с эндотелиоцитами; однако никаких соединительных комплексов исследователями не выявлялось. Они характеризуются низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, а цитоплазма содержит мало органелл. Форма их может быть различной: округлая с короткими, мелкими псевдоподиями, удлинённая или с уropодами, лишенными органелл, диаметр клетки составляет 8-17 мкм (Григорьева К.М., 2019). Pit-клетки – это клетки, которые обладают высоким уровнем естественной цитотоксической активности в отношении различных линий опухолевых клеток, что сопоставимо с уровнем цитотоксичности лимфокин-активированных киллерных клеток (Григорьева К.М., 2019). Они спонтанно убивают различные опухолевые клетки без участия антител или без активации цитокинами или другими сигналами. Вероятнее всего эта способность обусловлена выраженной экспрессией молекул адгезии CD11a/CD18. Pit-клетки могут усиливать противоопухолевую активность за счет секреции интерферона-гамма, многофункционального цитокина, который оказывает свое цитотоксическое действие непосредственно на опухоль или опосредованно через стимуляцию эффекторных клеток, таких как макрофаги.

Кроме того, Pit-клетки могут участвовать в повреждении гепатоцитов, поскольку было показано, что активированные интерлейкином-2 естественные киллерные клетки могут индуцировать как апоптоз, так и некроз в гепатоцитах крыс (Kmieciak Z., 2001).

1.1.4. Механизмы повреждения печени при гипергомоцистеинемии

Известно, что гипергомоцистеинемия является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. K.S. McCully (1969) в своих исследованиях наблюдал обширный атеросклероз у детей с тяжелой гипергомоцистеинемией и предположил патогенетическую связь между повышенным уровнем гомоцистеина в крови и атерогенезом. При вскрытии у этого пациента также была выявлена жировая дистрофия печени. Уровень гомоцистеина в плазме крови часто повышается у пациентов с циррозом или хроническим алкогольным поражением печени вследствие нарушения метаболизма гомоцистеина (Garcia-Tevijano E.R., 2001; Lu S.C., Tsukamoto H., Mato J.M., 2002).

Печень играет центральную роль в метаболизме метионина, метаболизируя почти половину суточного его потребления. Если метаболизм гомоцистеина нарушен, то гомоцистеин может высвобождаться в синусоидальную кровь, что приводит к гипергомоцистеинемии. Соотношение S-аденозилметионин к S-аденозилгомоцистеину в печени может уменьшиться, что приводит к торможению реакции трансметилирования (Lu S.C., Tsukamoto H., Mato J.M., 2002). Учитывая важную роль метилирования в различных клеточных процессах, эти изменения имеют негативные последствия, поскольку состояние гипергомоцистеинемии ассоциируется с повышенным риском развития атеросклеротических повреждений (Zhao J. et al., 2017; Djuric D. et al., 2018; Azarpazhooh M.R. et al, 2020; Tawfik A., Samra Y.A., Elsherbiny N.M., 2020).

Непосредственное повреждающее влияние гомоцистеина на печень является малоизученным аспектом. Лучшее понимание нарушений метаболизма метионина в печени имеет решающее значение как для патогенеза неалкогольного поражения печени, так и для атеросклеротических повреждений органов в целом (Ampuero J., Romero-Gómez M., 2012).

Результаты исследований последних лет подтверждают предположение о том, что гипергомоцистеинемия, являющаяся следствием измененного метаболизма метионина, может быть фактором риска фиброгенеза печени

(Lu S.C., Tsukamoto H., Mato J.M., 2002; Fujii H., Kawada N., 2014). Гипергомоцистеинемия может являться как результатом дефекта генетических факторов, таких как дефицит цистатион β -синтетазы, фолатов, дефицит витамина B6 и B12, так и быть результатом нарушения функций печени (Zaric B.L., 2019; Al Mutairi F., 2020). Хотя гоомцистеин эффективно метаболизируется в печени в нормальных условиях, ее избыток может высвобождаться гепатоцитами во внеклеточную среду. Считается, что гоомцистеин плазмы крови в значительной степени происходит от синусоидального высвобождения гоомцистеина по механизму, который пока плохо изучен. Повышенные уровни этой аминокислоты в плазме крови наблюдаются у пациентов с нарушением функции печени и экспериментальных животных после нагрузки метионином. Это свидетельствует о центральной роли печени в метаболизме метионина и последующем катаболизме гоомцистеина (Lu S.C., Tsukamoto H., Mato J.M., 2002).

Гоомцистеин оказывает активное воздействие на различные клетки, первично вызывая повреждение эндотелия (Zhang B., Qiu L., Fu M., 2012; Balint B., Jerchumba V.K., Guéant J.L., 2020), приводящее к нарушению активности тромбоцитов. В сосудах гладкомышечных клетках гоомцистеин способствует синтезу ДНК и усиливает выработку коллагена (Lei W., Long Y., Li S., 2015). Эти результаты подтверждают предположение о том, что гоомцистеин может служить прямым фиброгенным медиатором атеросклеротического повреждения сосудов, оказывая непосредственное влияние на сосудистое русло печени в том числе. Поскольку роль гладкомышечных клеток в развитии атеросклероза сосудов считается аналогичной роли клеток Ито при фиброзе печени, вопрос о том, оказывает ли гоомцистеин также стимулирующее воздействие на звездчатые клетки печени, является не раскрытым. Действительно, было показано, что гоомцистеин индуцирует синтез коллагена в первичных культурах клеток Ито (Zou C.G., Gao S.Y., Zhao Y.S., 2009; Lei W. et al., 2015). Эти данные предполагают потенциальную роль гоомцистеина в фиброгенезе печени. В

исследованиях Zou C.G., Gao S.Y., Zhao Y.S. (2009) на модели этанол-индуцированного повреждения печени было показано, что гомоцистеин способствует пролиферации клеток Ито. Гомоцистеин вызывал образование активных форм кислорода, которые активировали внеклеточную сигнально-регулируемую киназу и митогенактивированную протеинкиназу p38, вовлеченную в активацию NAD(P)H-оксидазы и генерацию большего количества активных форм кислорода. Активация NAD(P)H-оксидазы происходила в результате усиления регуляции экспрессии p22phox и фосфорилирования p47phox. АФК, полученные из NAD(P)H-оксидаз, активируют путь PI3K/Akt, тем самым способствуя клеточной пролиферации клеток Ито. Это исследование дает объяснение развитию и прогрессированию фиброза печени при гипергомоцистеинемии (Zou C.G., Gao S.Y., Zhao Y.S., 2009). Гипотеза авторов заключалась в том, что повреждение печени, вызванное этанолом, сопровождается высвобождением гомоцистеина гепатоцитами из-за аномального метаболизма метионина, который может оказывать паракринное воздействие на звездчатые клетки, индуцируя фиброгенез.

1.2. Оротовая кислота, механизмы действия, медицинское применение

Оротовая кислота (ОК) известна как предшественник в биосинтезе пиримидинов. ОК является компонентом нормального рациона питания, содержится в молоке и молочных продуктах. Для использования в рециркуляции пиримидинов оротовая кислота преобразуется в уридин преимущественно в печени, почках и эритроцитах. Ранние исследования в области питания определили ОК как «витамин В13», ее использование в качестве комплекса с органическими катионами или ионами металлов было широко распространено в бодибилдинге и в терапии метаболических синдромов (Löffler M., Carrey E.A., Zameitat E., 2015, 2016). Еще одним, недооцененным, преимуществом ОК может

быть установление анаэробной ОК-деградирующей микрофлоры кишечника в рационе новорожденных.

Оротат калия, изучаемый нами, является нестероидным анаболическим средством, которое широко используется в медицине. Фармакологическое действие препарата основано на том, что под его воздействием в организме стимулируется синтез нуклеиновых кислот. Также данное лекарственное средство оказывает диуретическое и регенерирующее воздействие на организм. Под влиянием препарата улучшается переносимость сердечных гликозидов, активизируются регенеративные и репаративные процессы, стимулируется обмен веществ. Калия оротат способствует продукции альбуминов в печени, а также фиксации магния на АТФ в клетке, участвует в процессах обмена липидов и углеводов.

Существуют три изомера (таутомера) оротат-аниона: оксо-форма с двумя карбоксильными группами и одной двойной связью в гетероцикле; гидроксиформа с одной карбоксильной группой и двумя двойными связями в гетероцикле; дигидроксиформа с двумя гидроксильными группами и ароматическим гетероциклом. В твердом состоянии оротаты существуют в виде оксо-формы, все таутомерные превращения до сих пор наблюдались только в растворах при варьировании величины pH. Распространенный препарат «калия оротат» в качестве действующего вещества содержит оротовую кислоту преимущественно в оксо-форме, однако не известно, является ли эта форма предпочтительной по сравнению с гидроксиформами и дигидроксиформами. Именно этот аспект и являлся предметом нашего исследования.

Особенность калия оротата в отличие от простых солей калия заключается в том, что фармакологическое действие препарата определяется не столько катионом калия, сколько оротат-анионом. Последний обладает собственным биологическим действием, влияя на обмен нуклеотидов. Молекула оротовой кислоты необходима для регуляции генов, важных в развитии клеток, тканей и организмов (Classen H.G., 2004; Löffler M.,

Carrey E.A., Zameitat E., 2015, 2016). Тесная связь оротовой кислоты с обменом нуклеиновых кислот объясняет ее влияние на кроветворение, показанное в ряде экспериментов (Jellinek H., Takács E., 1998; Pôrto L.C. et al., 2012). Основной массив работ, посвященных оротовой кислоте, датируется до 2000г. Показано, в частности, что влияние ее распространяется на образование эритроцитов, лейкоцитов, энергетический статус кардиомиоцитов (Rosenfeldt F.L., 1998). В исследованиях было показано, что введение калия оротата в концентрации 100 мг/кг повышает пролиферативную активность гепатоцитов без существенного влияния на внутриклеточную регенерацию (Баїbekova E.M., Sultanova L.I., 1990).

Оротовая кислота, являясь промежуточным звеном в биосинтезе пиримидина, обеспечивает широкий спектр полезных эффектов, включая кардиопротекцию и адаптацию к физическим нагрузкам. Так, в скелетных мышечных волокнах она модулирует как воспалительную, так и метаболическую реакцию, вызванную острым сокращением (Beiter T. et al., 2018), но в экспериментальных условиях может вызвать развитие неалкогольной жировой болезни печени (Chang M. et al., 2018; Guo Y. et al., 2018). Однако в исследовании Matilainen J. С соавт. (2020) указывается, что клетки гепатоцеллюлярной карциномы, обработанные оротовой кислотой, противостоят стеатозу за счет модификации метаболизма жирных кислот.

Ее использование ограничено плохой растворимостью кристаллов кислоты в воде. De Cássia Zaghi Compri J. et al. (2018) предлагают способ обработки ее с помощью высокоэнергетического метода измельчения для преодоления этого свойства, что может раскрыть неиспользованный потенциал данного препарата. Hassani A. et al., (2019) предполагают более высокие антиоксидантные возможности у наночастиц оротовой кислоты.

1.3. Механохимия и механоактивация лекарственных препаратов

На основании исследования влияния различных видов энергии на химические процессы по аналогии с терминами «электрохимия», «фотохимия» и др. в конце 19 века В. Ф. Оствальд предложил термин «механохимия» (Ostwald W., 1891). Под этим термином подразумевались химические превращения реагентов (независимо от агрегатного состояния) в результате механических воздействий. Изначально объектами механохимии были неорганические вещества, а во второй половине 20 века ими стали превращения высокомолекулярных органических соединений при механических воздействиях. После того, как в этих исследованиях были получены лекарственные препараты, которые традиционно получали с помощью трудоемких химических методов, интерес к ним резко возрос и до сих пор не ослабевает. Механохимические методы получили широкое развитие как способы регулирования реакционной способности твердых веществ (механическая активация), вступающих в различные химические реакции, и инициирования самих химических реакций (механохимия) (Болдырев В.В., 2006; Авакумов Е.Г., Болдырев В.В., 2009; Андрюшкова О.В., Полубояров В.А., Паули И.А., 2010).

Механохимические методы разделяют на два подвида – механоактивация, которая используется для регулирования реакционной способности веществ, участвующих в химических реакций, и механохимия – химические реакции, катализируемые механическими воздействиями на реакционную смесь (Болдырев В.В., 2006; Авакумов, Е.Г., Болдырев В.В., 2009; Андрюшкова О.В., Полубояров В.А., Паули И.А., 2010). В результате механоактивации нередко формируются метастабильные соединения с более высокой химической и биологической активностью по сравнению с исходными (Дубинская А.М., 1989; Ломовский О.И., 2001; Шахтшнейдер Т.П., 2013; Dubinskaya A.M., 1998; Tan D., Lootsa L., Frišćić T., 2016; Syroeshkin A.V., Uspenskaya E.V., Pletneva T.V., 2019; Sarmah K.K., Nath N., Rao D.R., 2020), а в результате механохимии образуются

новые химические соединения. Причем соединения, получаемые как в результате механоактивации, так и в результате механохимии не всегда могут быть получены методами «мокрой химии» или другими традиционными синтетическими методами.

Механоактивация – процесс образования вещества с большей химической активностью вследствие предварительной механической обработки (Лякишев Н.П., 2000). Одно из главных положений механоактивации заключается в том, что механоактивация может быть без измельчения, но не может быть измельчения без активации. Отсюда следует, что, во-первых, нельзя разделить измельчение и активацию: любое измельчение есть активация, так как под действием внешних сил увеличивается запас энергии измельчаемого вещества хотя бы за счет увеличения поверхностной энергии; во-вторых, любой измельчающий аппарат является механоактиватором.

Первые исследования физико-химических превращений неорганических веществ в условиях интенсивных механических воздействий были проведены более 100 лет назад. В середине XX века начались исследования механохимических превращений высокомолекулярных органических соединений (полимеров), связанные с их практическим применением. Активное исследование механохимических превращений молекулярных кристаллов органических соединений началось во второй половине XX века в связи с тем, что наметилась тенденция к использованию механохимии и механической активации для малотоннажных дорогих производств. Использовать методы механической активации для модифицирования свойств фармацевтических препаратов с целью повышения их биодоступности и терапевтической активности было впервые предложено в 70-х годах прошлого столетия и эти исследования продолжаются (Дубинская А.М., 1989; Ломовский О.И., 2001; Шахтшнейдер Т.П. 2013).

К методам механоактивации относятся: действие гидростатического давления, интенсивная пластическая деформация и механоактивация в

высокоэнергетичных диспергирующих устройствах-мельницах разных конструкций. Во всех перечисленных методах механоактивации вещество подвергается двум видам воздействий – деформационным и термическим. Различие заключается в интенсивности деформационных воздействий и температур нагрева, неизбежно сопровождающего деформацию вещества.

В первую очередь, механоактивация приводит к диспергированию материалов. Этот эффект наблюдается как для неорганических, так и органических веществ. Кроме диспергирования органических веществ при механоактивации происходят их структурные и физико-химические изменения (изменения химической структуры).

Механоактивационные изменения подразделяются на две группы (Дубинская А.М., 1989). Первая группа процессов заключается в образовании новых химических соединений, эти процессы обусловлены разрывом внутримолекулярных водородных связей и формированием новых ковалентных внутримолекулярных связей, к которым относятся деструкция молекул, окисление, гидролиз, образование свободных радикалов, которые активно вступают в химические реакции. Вторая группа процессов проходит без изменений фазового состава, с разрывом межмолекулярных связей и образованием новых, более слабых межмолекулярных связей. В результате процессов второй группы структура разупорядочивается, происходит аморфизация или, наоборот, кристаллизация, полиморфные превращения кристаллической структуры, изомерные превращения. Именно процессы второй группы оказывают серьезное воздействие на биологическую активность лекарственных препаратов, поэтому они лежат в основе новых эффективных технологий улучшения свойств биологически активных веществ.

Механическая обработка твердых кристаллических веществ в различных мельницах, особенно в высокоинтенсивных шаровых мельницах, где реализуются условия «стесненного удара», ведет к уменьшению степени кристалличности и аморфизации веществ. Основное практическое применение этого явления –

увеличение растворимости труднорастворимых веществ. В некоторых случаях наблюдается прямая корреляция между количеством аморфной фазы и растворимостью препарата (Dubinskaya A.M., 1998).

Исследование полиморфизма биологически активных органических соединений и, прежде всего, лекарственных веществ, началось в конце 30-х годов прошлого столетия. В 1937 г. был обнаружен полиморфизм сульфаниламида. В настоящее время полиморфизм выявлен более чем у 70% лекарственных веществ практически всех фармакологических групп (Тулегенова А.У., 2002; Гильдеева Г.Н., Гуранда Д.Ф., 2009). Он оказался чрезвычайно важным фактором, определяющим лечебный эффект фармацевтических субстанций и лекарственных форм, существенно влияющим на параметры их биологической активности. В США тесты на полиморфизм включены в требования FDA для аналитического контроля новых лекарственных средств, утвержден набор методик его выявления и изучения (Рудакова И.П. и др., 2009).

Полиморфные модификации могут сильно отличаться по своим физико-химическим и биологическим свойствам. Новые полиморфные модификации получают различными способами: за счет варьирования условий кристаллизации или хранения, температуры и давления, твердофазных превращений в результате механического (деформационного) воздействия (Дубинская А.М., 1989; Леонидов Н.Б. и др., 1997; Шахтшнейдер Т.П., 2013).

В статье Г.Н. Коныгина с соавт. (2005) приведены экспериментальные доказательства образования молекулярных комплексов ряда лекарственных веществ со вспомогательными веществами при механических воздействиях. Полученные комплексы обладали повышенной скоростью растворения. Увеличение растворимости за счет полной или частичной аморфизации отмечено для таких препаратов как сульфамонометаксин, сульфален, сульфадимезин (Савицкая А.В., Езерский М.Л., 1990), аспирин (Полубояров В.А. и др., 1998), клонидин (Boldyrev V.V. et al., 1990), пироксикам (Мызь С.А. и др., 2007), индометацин (Болдырев В.В. и др., 2009), этионамид (de Melo C.C. et al., 2016). В

монографии под редакцией Зуева М.Г., Ларионова Л.П. (2006) рассматриваются возможности механохимической технологии для получения быстрорастворимых лекарственных средств и биологически активных добавок.

Кроме изменения кристаллической структуры в результате механоактивации наблюдаются изомерные превращения. Так, например, механоактивация в шаровой планетарной мельнице лактата и глюконата кальция приводит к формированию новых оптических изомеров с повышенной биологической активностью (Душкин А.В., 2005). Механохимически индуцированные структурные превращения в глюконатах калия, натрия и кальция показаны рядом авторов (Рыбин Д.С. и др., 2013; Kanunnikova O. et al., 2017).

Образование молекулярных комплексов лекарственных веществ с полимерами (гликозидами и полисахаридами) может приводить изменению растворимости и фармакологической активности препаратов. Так, с помощью совместной механической активации микроцеллюлозы и пироксикама приготовлены композиции, обладающие повышенной скоростью растворения лекарственного вещества (Мызь С.А. и др., 2007).

Экспериментальные и клинические исследования показали выраженную фармакологическую активность механохимически обработанных веществ. Так, результаты экспериментальных исследований лимфосаркомы Плисса свидетельствуют, что противоопухолевое действие наночастиц доксорубина, полученного механоактивированным способом, более эффективно, чем действие официального препарата, а использование его в схемах лечения ограничивает осложнения и повышает пятилетнюю выживаемость пациентов (Сивкович С.А., Орел В.Э., Дзятковская Н.Н., 2007). Наночастицы, получаемые при обработке препаратов используются в качестве адресной доставки лекарств в клетки (Zevak E.G. et al., 2014; Achkasov A.F. et al., 2014; An'kov S.V. et al., 2016). Отмечено усиление биоактивности при механической обработке гормона тималина (Ломовский О.И., Болдырев В.В., 2006), антигельминтных препаратов

(Халиков С.С. и др., 2015), антибиотиков (Дзятковская Н.Н. и др., 2004; Сивкович С.А. и др., 2007), магния оротата (Чучкова Н.Н. и др., 2018).

К настоящему времени оформлено новое направление в медицинской химии, предметом которого является медицинская химия твердого тела, изучающая новые материалы медицинского назначения: диагностические и лекарственные средства, их формы и способы получения (Зуев М.Г., Ларионов Л.П., 2006).

Таким образом, при механоактивации и других деформационных воздействиях на биологически активные вещества при сохранении химического состава могут происходить изменения атомной и химической структуры:

- диспергирование и агрегация;
- аморфизация или кристаллизация; переход в новую кристаллическую модификацию;
- полиморфные превращения;
- изомерные превращения.

Изменения кристаллической и атомной структуры приводят к изменению физико-химических и биологических свойств механоактивированных веществ. Имеющиеся в настоящее время данные не позволяют прогнозировать, какие именно метастабильные состояния формируются при механоактивации или других деформационных воздействиях, продолжительность жизни и биологическую активность этих метастабильных состояний. Следовательно, накопление экспериментальных данных по результатам влияния механоактивации и деформационных воздействий на биологически активные органические вещества является актуальным.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн эксперимента

1 этап Формирование модели умеренной гипергомоцистеинемии на животных и ее экспериментальная оценка		
Название этапа	Количество животных	Методы исследования
Контроль	25	• Цитологические и биохимические исследования крови
Экспериментальная модель умеренной гипергомоцистеинемии	70	• Гистологические и иммуногистохимические методы исследования
2 этап Подготовка и аттестация образцов оротовой кислоты (оротат калия)		
• Получение таутомеров оротовой кислоты. • Исследование морфологии и структурно-фазового состава частиц порошков оротата калия в исходном состоянии и после механоактивации.		• Атомно-силовая микроскопия • Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия • Определение растворимости и скорости растворения таутомеров в воде • Оценка липофильности препаратов в модели «октанол-вода» • Определение концентраций вещества в липидной и водной фазах методом эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной (аргоновой) плазмой на спектрометре Spectroflame Modula S
3 этап Исследование таутомеров оротовой кислоты на животных с умеренной формой гипергомоцистеинемии		
Название этапа	Количество животных (всего 54)	Методы исследования
• Коррекция умеренной гипергомоцистеинемии исходной оксо-формой ОК (препарат без	18	• Цитологические и биохимические исследования

механоактивации)		крови
• коррекция умеренной гипергомоцистеинемии гидрокси-формой ОК (после 1 часа механоактивации)	18	• Гистологические и иммуногистохимические методы исследования
• коррекция умеренной гипергомоцистеинемии дигидрокси-формой ОК (после 6 часов механоактивации)	18	
Всего животных в эксперименте:	149	

2.2. Экспериментальная модель умеренной гипергомоцистеинемии

Для отработки модели умеренной гипергомоцистеинемии и последующих экспериментов были использованы крысы *Rattus norvegicus Berk* обоего пола в количестве 149 штук, содержащихся в виварии ФГБОУ ВО ИГМА, в осенне-зимний период (октябрь-декабрь). С целью беспрепятственного проведения экспериментальных манипуляций и исключения формирования зоостресса, крыс в течение 2-х недель приручали к рукам (процедура хэндлинга) (Cloutier S., et al., 2018) массой 220 ± 20 г. Для устранения влияния сезонной циркадной зависимости эксперименты проводились в осенне-зимний период во второй половине дня. Крысы находились в одинаковых условиях содержания (температура воздуха 18–22°C, относительная влажность 70%, при естественно-искусственном освещении), в клетках размером В (0,5м) × Ш (0,4м) × Д (0,6м) по 5 штук, подстилкой служили древесные опилки. Все животные получали экструдированный корм ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5, со свободным доступом к воде в стандартных поилках. Каждому животному индивидуально скармливали шарики из сырого свиного мясного фарша весом $15,0 \pm 0,5$ г. У контрольных животных прикорм не содержал добавок, у крыс экспериментальной группы с целью формирования

гипергомоцистеинемии в фарш добавляли пищевой метионин (кормовая добавка DL-метионин 99%, Бельгия) из расчета 0,15г/100г, одновременно они получали 1% раствора метионина в воде *ad libitum* в качестве питья. Создание модели умеренной гипергомоцистеинемии зафиксировано в виде рацпредложения № 01.21 от 17 февраля 2021 г. «Способ моделирования умеренной формы гипергомоцистеинемии».

Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.321814 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. В подготовке эксперимента учитывались требования к моделированию субхронической токсичности (Каркищенко Н.Н., 2006), забой и взятие материала осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.1984 г. №724) и Межгосударственного стандарта «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными (2016).

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (протокол №656 от 23.04.2019).

Животных распределяли на 5 групп:

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

2.3. Цитологические и биохимические исследования крови

Кровь забирали из сердца (транскардиально) перед началом эксперимента, через 2 и 4 недели метиониновой диеты, и через 21 день после употребления препарата, содержащего разные таутомерные формы калия оротата. Забор крови осуществлялся под эфирным наркозом. Для этого определяли место конечного толчка сердца (на 1 см краниальнее от установленного верхушечного толчка и на 1-2 мм латеральнее от левого края грудины), иглу вводили вертикально, одновременно вытягивая поршень шприца на себя, забирали по 4,5 мл крови: 4 мл на биохимический анализ и 0,5 мл на общий анализ. В крови животных определяли уровни гомоцистеина, триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), рассчитывали индекс атерогенности по формуле: $\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП} / \text{ХС ЛПВП}$; анализировали данные печеночных проб (АЛТ, АСТ, билирубин, щелочная фосфатаза). В общем анализе крови оценивали: количество лейкоцитов, гранулоцитов, моноцитов, тромбоцитов ($10^9/\text{л}$); эритроцитов (RBC, $10^{12}/\text{л}$), уровень гемоглобина (Hb, г/л), гематокрит (HCT, %), тромбоцитрит (PCT, %), эритроцитарные и тромбоцитарные индексы: средний объем эритроцита (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг), распределение эритроцитов по объему (RDW, %), средний объем тромбоцита (MPV, фл), ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW, фл).

Содержание гомоцистеина определяли иммуноферментным методом с использованием тест-системы AxisShield (Великобритания), исследование показателей крови определяли с использованием автоматического биохимического

анализатора Olympus AU-480, гематологических анализаторов System XS-500i и Alifax Roller 10 Plus.

2.4. Гистологические и иммуногистохимические методы исследования

Для гистологического исследования у крыс забирали кусочки печени, размером около 1 см³. Ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 7-10 дней, после чего отмывали в течение 24 часов в проточной воде и обезвоживали в восходящей батарее этиловых спиртов в концентрациях 60, 70, 80, 96, 100, заливали в готовую парафиновую среду Histomix (HISTOMIX №253466, БиоВитрум). Готовили серийные гистологические срезы толщиной 5-7 мкм на микротоме SAKURA Tissue Tek Accu Cut SRM 200 Microtome. Для исследования забирали каждый шестой гистологический срез печени крыс.

Световая микроскопия

1. Окраска гематоксилином и эозином.

При стандартных условиях проводили депарафинизацию срезов в ксилоле в течение 2 минут. Далее срезы помещали в дистиллированную воду на 2 минуты и наносили раствор гематоксилина на 10 минут (контроль под микроскопом). После этого использовали солянокислый спирт для дифференцировки окрашивания. Далее промывали в проточной воде, ополаскивали дистиллированной водой и наносили раствор эозина на 30 сек-1 мин (контроль под микроскопом). Промывали проточной водой в течение 2 минут и проводили обезвоживание по восходящей батарее этилового спирта в концентрациях 60, 70, 80, 96, 100 по 2 минуты в каждом растворе, осветляли в ксилоле и заключали в балъзам.

На серийных срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, при увеличении в 400 раз, оценивали гистоструктурные особенности и клеточный состав органа, морфометрические данные гепатоцитов анализировали при 1000-кратном увеличении. На единицу площади (100 мкм²) подсчитывали: количество клеток;

среднюю площадь среза гепатоцита (мкм^2); площадь функциональной паренхимы (произведение средней площади среза гепатоцита на среднее количество клеток, мкм^2); количество ядер и среднюю площадь среза ядра (мкм^2); совокупную площадь ядерного материала (мкм^2); рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение. В среднем анализировали не менее 500 клеток на каждом срезе.

Морфометрии подвергали следующие компоненты кровеносного микрососудистого русла печени: диаметры (мкм) и площади (мкм^2): центральной вены, междольковой вены, междольковой артерии, междолькового желчного протока, подсчитывали совокупную площадь синусоидных капилляров в 100 мкм^2 , рассчитывали коэффициент Визотто (Vizzotto L., et al., 1989).

2. Окрашивание азотнокислым серебром.

Окрашивание азотнокислым серебром проводили для оценки ядрышкового организатора гепатоцитов. При стандартных условиях проводили депарафинизацию срезов в ксилоле в течение 2 минут. Для окраски азотнокислым серебром использовался стандартный набор для окраски области ядрышкового организатора (Ag-ЯОр) (AgNORs – Argyrophylic Nucleolar organiser regions) (БиоВитрум, серийный номер 04-045801). Депарафинизированные срезы помещали в дистиллированную воду. Готовили рабочий раствор: смешивали раствор из флакона А (водный раствор желатина) и раствор из флакона В (концентрированный раствор нитрата серебра), перемешивали стеклянной палочкой, промытой в дистиллированной воде. Помещали исследуемый препарат в раствор и инкубировали в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре. Осторожно промывали в 3 порциях дистиллированной воды. Наносили на срез 10 капель реагента С (фиксирующий раствор), оставляли на 1 минуту. Промывали в дистиллированной воде. Дегидратировали срезы в спиртах возрастающей концентрации (60, 70, 80, 96, 100), просветляли в ксилоле и заключали под покровное стекло. На срезах рассчитывали количество Ag-ЯОр на ядро (на поле зрения), среднюю площадь одного Ag-ЯОр (мкм^2), совокупную площадь Ag-ЯОр на одно ядро ($S_{\text{яо/ядро}}$, мкм^2), определяли фенотипы Ag-ЯОр в

зависимости от степени окраски (нуклеолонемные, компактные, нуклеолонемно-компактные (переходные варианты), кольцевидные и микро-Ag-ЯОр) (Crocker J., 1990; Чучкова Н.Н., Кормилина Н.В., Смирнов П.В., 2016), оценивали расположение Ag-ЯОр в ядре (центральное, эксцентричное, прилежащее к кариолемме, %), количество гранул (шт.) и место их локализации в ядре (интрануклеолярное и экстрануклеолярное).

3. Состояние компонентов соединительной ткани оценивали по окраске пикрофуксином по Ван Гизону.

При стандартных условиях проводили депарафинизацию срезов в ксилоле в течение 2 минут. Далее стекла со срезами помещали в 96° этиловый спирт на 1-2 минуты, ополаскивали в воде, наносили гематоксилин Вейгерта (БиоВитрум), который состоит из растворов Вейгерта I (1% раствор гематоксилина на 96° спирте) и Вейгерта II (50% раствор хлорного железа 4 мл, крепкая соляная кислота 1 мл, вода дистиллированная 96 мл) в соотношении 1:1 на 2-3 минуты. Окрашенные срезы помещали в воду на 3-5 минут. Далее наносили пикрофуксин (насыщенный на холоде водный раствор пикриновой кислоты – 10 мл и 1% водный раствор кислого фуксина – 1 мл) на 2-3 минуты, после быстро ополаскивали в воде, помещали в 96° спирт на 1-2 минуты, просветляли в ксилоле в течение 1 минуты и заключали в бальзам. Результаты окраски подвергали качественной оценке.

Метод моноклональных антител

Парафиновые срезы печени толщиной 3-5 мкм окрашивали с использованием антител к Ki-67 (кроличьи IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, USA), CD-68 (мышинные IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, USA), антитела для определения экспрессии гладкомышечного α -актина (мышинные IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, USA). Для двойного иммунофлуоресцентного окрашивания использовали смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 488 (антикроличьи IgG 1:300; Abcam, USA) и Alexa Fluor 647 (антимышинные IgG 1:300; Abcam, USA).

- Ki-67 – маркер пролиферации, белок-антиген, появляющийся в период деления клеток, ассоциирован с хромосомами, находящимися в состоянии митотического деления,
- CD-68 – маркер клеток моноцитарно-макрофагального ряда – звездчатых макрофагов (клеток Купфера),
- α SAM – гладкомышечный α -актин – маркер для определения активированных перисинусоидных клеток (клетки Ито).

Метод непрямой иммуногистохимии

При стандартных условиях проводили депарафинизацию срезов в ксилоле в течение 2 минут. Далее стекла со срезами помещали в забуференный физиологический раствор (ЗФР) (pH = 7,3) на 5 минут. После наносили преинкубирующий раствор, который состоял из забуференного физиологического раствора, 1% раствора тритона на ЗФР и БСА. Проводили инкубацию во влажной камере 20-30 минут. По окончании инкубации стряхивали преинкубирующий раствор на фильтровальную бумагу. Далее наносили раствор первых антител в концентрации 1:200 (раствор готовили на ЗФР, 1 % растворе тритона на ЗФР и БСА). Проводили инкубацию во влажной камере 2 суток при комнатной температуре. По окончании инкубации стекла промывали в растворе ЗФР 3 раза по 5 минут. После этого наносили раствор вторых антител (ассоциированных с Alexa Fluor 488 (антикроличьи IgG 1:300; Abcam, USA) или Alexa Fluor 647 (антимышинные IgG 1:300; Abcam, USA)) на ЗФР в соотношении 1:300. Проводили инкубацию во влажной камере в течение ночи. По окончании инкубации стекла промывали в растворе ЗФР 3 раза по 5 минут без доступа к свету. Готовый препарат заключали в глицерин.

Срезы изучали с помощью люминесцентного микроскопа Nikon ECLIPSE E200, измерение интенсивности свечения иммунореактивного продукта в границах определенной области проводили на фронтальных срезах при помощи морфометрических программ Image ProInsight 8.0, Image ProPlus 6.0 (MediaCybernetics). Результаты исследования оценивали с учетом локализации

клеток, их количества, степени окраски (интенсивность свечения маркера). Рассчитывались: средняя суммарная площадь клеток на поле зрения микроскопа в 10 случайных полях зрения на каждом из 6 срезов препарата при увеличении 400 крат (представлена в усл. ед.); интенсивность свечения гистохимического продукта реакции представлена для всей популяции клеток (в усл.ед). При использовании маркера Ki-67 рассчитывался пролиферативный индекс: число Ki-67-положительных клеток/количество гепатоцитов в поле зрения.

2.5. Подготовка и аттестация образцов оротовой кислоты

Работу по подготовке и аттестации образцов оротовой кислоты (оротат калия) проводили на базе Удмуртского федерального исследовательского центра УрО РАН (г. Ижевск). Механоактивация образцов проводилась в шаровой планетарной мельнице АГО-2С. Планетарная шаровая мельница АГО-2С предназначена для быстрого ультрадисперсного измельчения порошковых материалов разной природы и механоактивации материалов. В конструкцию мельницы АГО-2С входит 2 барабана. Высокоэнергетическое механическое воздействие в шаровой планетарной мельнице основано на вращении барабанов, в которых находится образец и шары. Барабаны вращаются вокруг собственной оси и вокруг центра платформы мельницы (Рисунок 2.1.1). Температура в системе «органический образец + шары» составляет порядка 200°C, вращающаяся конструкция охлаждается с помощью системы водяного охлаждения.

В шаровой планетарной мельнице АГО-2С, используемой в работе, барабаны изготовлены из стали 40Х13. Объем каждого барабана составляет 150 мл. Шары изготовлены из стали ШХ15, диаметр шаров 8 мм, масса каждого шара 2 г. Масса образца составляла 10 г. Скорость вращения валика 600 об/мин. Энергонапряженность мельницы при этих режимах работы составляла 2 Вт/г. Для предотвращения окисления образца в процессе измельчения барабан вместе с образцом и шарами продували аргоном.

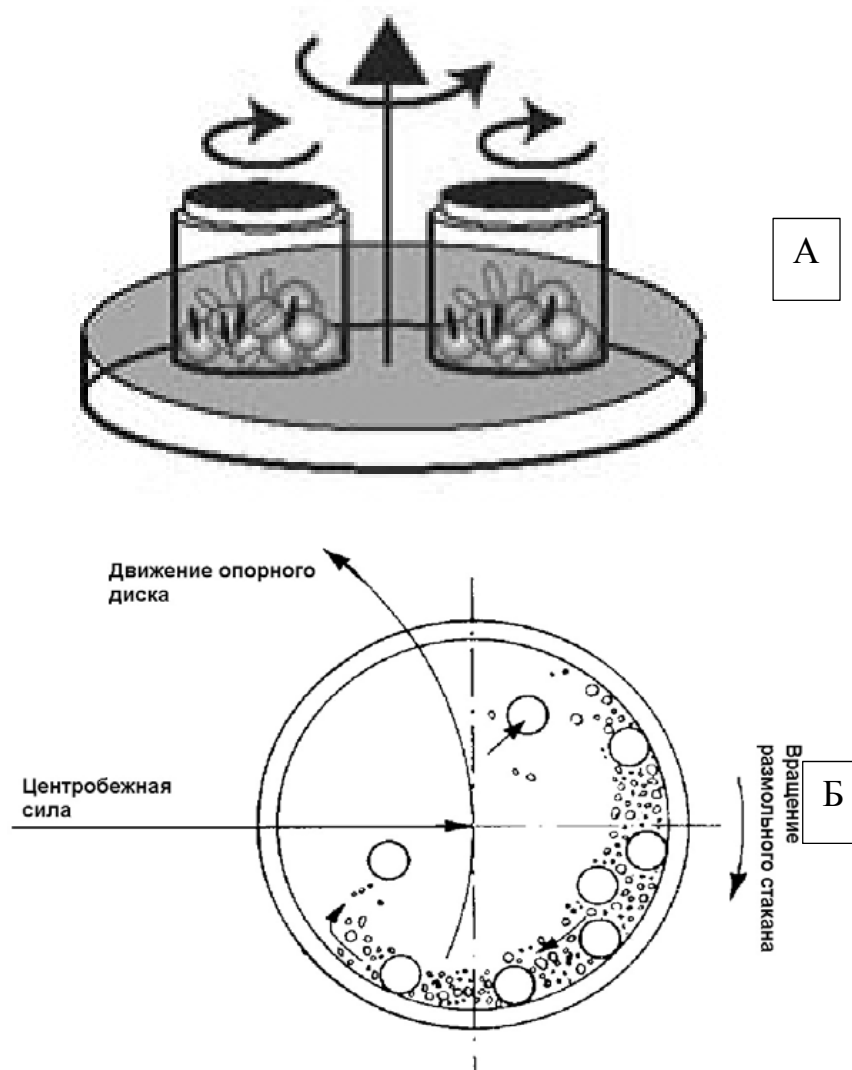


Рисунок 2.1 – Изображение рабочей части шаровой планетарной мельницы АГО-2С (А) и схема движения шаров в барабане (Б).

Природа процессов, протекающих при механоактивации, значительно сложнее термических, и эти превращения, как правило, носят атермический характер (Болдырев В.В., 2006). Поэтому предполагается, что из двух термодинамических параметров, реализующихся при механоактивации – температуры и давления/деформации, – именно последние часто играют решающую роль в изменении структуры и свойств обрабатываемого вещества, являясь причиной активации структурных и химических превращений.

Объектом исследования являлся препарат «Калия оротат. Оротовая кислота» (ОАО АВВА РУС, Россия). Исследование структуры образцов включало в себя:

- анализ размеров и формы частиц порошков;
- исследование химического строения (изомерия);
- исследование растворимости и скорости растворения в воде и растворимости в октаноле

Размеры и форма частиц порошков исследовались методом атомной силовой микроскопии (АСМ) с помощью сканирующей лаборатории Интегра-Прима. Атомно-силовая микроскопия позволяет получить трехмерное изображение частиц порошков с высоким разрешением. В основе метода лежит регистрация силы взаимодействия острия зонда с поверхностью исследуемых частиц. Зонд расположен на конце консольной балки, способной упруго изгибаться под действием небольших молекулярных сил, возникающих между исследуемой поверхностью и вершиной зонда. Величина упругой деформации зонда зависит от размеров частиц и их морфологии (Карпухин С.Д., 2012). Исследования проводились с использованием кремниевого кантилевера в полуконтактном режиме на воздухе. Порошки крепились к ситталовой подложке на полистироловой пленке. Раствор полистирола в этилацетате наносился на подложку, а затем пленка полимеризовалась под действием УФ-излучения. Порошок наносился на полимерную пленку и закреплялся на ней.

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия. Рентгенофазовый анализ проводился на спектрометре ЭС-2401 с использованием $\text{CuK}\alpha$ -излучения. В основе метода рентгеноэлектронной спектроскопии лежит явление фотоэффекта. При облучении образца рентгеновским излучением в вакууме из поверхностного слоя образца вылетают электроны. Скорость выбитых электронов определяется энергией связи электрона в атоме и зависит от положения в атоме (номера электронной оболочки) и эффективного заряда на атоме, который зависит от окружения и характера связи этого атома с окружающими атомами (Осьмушко И. С., 2010). Толщина анализируемого слоя определяется глубиной выхода электронов без потерь энергии. Метод рентгеноэлектронной

спектроскопии использовался в данной работе для определения формы таутомеров на основании анализа состава функциональных групп.

Важным моментом при исследовании твердотельных лекарственных веществ является анализ растворимости и скорости растворения в воде, а также распределение вещества в системе «октанол-вода».

Для определения растворимости и скорости растворения в воде навеску образца в 1 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды, раствор термостатировали при 25°C, а затем определяли количество растворенного вещества в растворе методом эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной (аргоновой) плазмой на спектрометре Spectroflame Modula S. Повторяемость опыта – пятикратная.

Способность оротата калия проходить через плазмолемму анализировалась в бинарной системе «октанол-водный раствор», поскольку полярность и строение октанола (н-Октанол, ГОСТ ТУ 6-09-3506-78) близки к фосфолипидной характеристике клеточной мембраны. Определение концентраций вещества в липидной и водной фазах определяли методом эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной (аргоновой) плазмой на спектрометре Spectroflame Modula S.

2.6. Математические и статистические методы исследования

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 $p < 0,05$.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3.1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

3.1.1. Биохимические пробы печени и цитологические показатели крови в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии

Количество аминокислоты в крови интактных животных составило $8,5 \pm 0,6$ мкмоль/л, через 14 дней после начала эксперимента – $8,9 \pm 0,8$ мкмоль/л ($p > 0,05$), через 4 недели – $28,9 \pm 2,65$ мкмоль/л, что в 3,4 раза выше исходных данных контроля ($p > 0,05$). Интервальные значения гомоцистеина у экспериментальных животных колебались от 15,2 до 32,8 мкмоль/л. Таким образом, содержание животных на рационе, обогащенном метионином, привело к повышению уровня гомоцистеина до умеренных значений через 4 недели после начала эксперимента. Дальнейшее содержание животных на «метиониновой диете» (в течение 8 недель) не привело к существенным изменениям количества гомоцистеина в крови ($30,2 \pm 5,33$ мкмоль/л).

Динамика биохимических показателей, отражающих функциональное состояние печени у животных в процессе эксперимента, представлена в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1 – Уровни маркерных ферментов печени и билирубина контрольных и экспериментальных животных в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии

Показатели	АЛТ	АСТ	БЛБ общий	БЛБ прямой	ЩФ
Единицы измерения	ед/л	ед/л	мг/дл	мкмоль/л	ед/л
контроль	$43,56 \pm 4,88$	$111,33 \pm 3,84$	$3,02 \pm 1,50$	$1,2 \pm 0,20$	$238,0 \pm 15,64$
2 недели	$47,2 \pm 6,37$	$193,1 \pm 28,15^*$	$3,14 \pm 0,95$	$1,22 \pm 0,44$	$245,5 \pm 23,32$
4 недели	$65,3 \pm 7,70^*$	$162,08 \pm 29,17^*$	$4,9 \pm 0,89^*$	$1,5 \pm 0,31^*$	$229,5 \pm 20,56$

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с показателями интактного контроля при $p < 0,05$

Проведенный корреляционный анализ по Пирсону для определения взаимосвязи между уровнем ферментов и количеством гепатоцитов в контрольной популяции (Таблица 3.1.7), показал наличие сильной отрицательной корреляции, которая была статистически значимой ($r = -0,688$, $n = 10$, $p = 0,04$) для аспартатаминотрансферазы. Выраженная отрицательная корреляция наблюдалась также между значениями АСТ и уровнем щелочной фосфатазы $r = -0,956$ $n = 10$ ($p = 0,044$). Определение взаимосвязи между уровнем билирубина в крови животных и ЩФ показало сильную положительную корреляцию, которая была статистически значимой ($r = 0,955$, $n = 10$, $p = 0,045$).

Нагрузка пищевым метионином в течение 2 недель привела к повышению только уровня аспартатаминотрансферазы (в 1,73 раза, $p < 0,05$), через 4 недели – аланинаминотрансферазы (в 1,5 раза, $p < 0,05$), общего и прямого билирубина – на 62,25% и 25%, соответственно ($p < 0,05$). Уровень щелочной фосфатазы 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 ЩФ ($r = -1$, $n = 10$, $p = 0,0001$).

Таким образом, показатели печеночных проб (АЛТ, АСТ, билирубин), указывают на сформированную гепатопатию к 4-й неделе эксперимента.

Показатели липидного спектра через 2 и 4 недели формирования умеренной ГГЦ нагрузкой метионином не испытывали значительных колебаний. Достоверно повышалась только фракция триглицеридов (в 1,78 раз, $p < 0,05$), однако выявлялась тенденция ($p < 0,1$) к повышению холестерина ЛПНП: на 12,76% через 2 недели, на 10, 64% – через 4 недели эксперимента. (Таблица 3.1.2).

Таблица 3.1.2 – Показатели липидного спектра крови контрольных и экспериментальных животных в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии

Показатель (ммоль/л) Длительность эксперимента	Триглицериды	Общий холестерин	Холестерин ЛПВП	Холестерин ЛПНП
контроль	0,51±0,08	1,38±0,11	0,74±0,11	0,47±0,02
2 недели	0,47±0,07	1,32±0,04	0,82±0,21	0,53±0,05
4 недели	0,91±0,17*	1,51±0,12	0,83±0,09	0,52±0,08

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с показателями интактного контроля при $p < 0,05$

Рассчитываемый на основе показателей атерогенный индекс достоверно не изменялся, составляя у контрольных животных $0,86 \pm 0,1$, через 2 недели эксперимента – $0,71 \pm 0,1$, через 4 недели эксперимента – $0,87 \pm 0,05$ у.е.

Практически для всех показателей (за исключением холестерина ЛПНП) повышалась как верхняя, так и нижняя граница данных, при этом колебания между максимальным и минимальным значениями были менее выражены, чем у контрольных животных (Таблица 3.1.3).

Таблица 3.1.3 – Интервальные данные показателей липидного спектра крови в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии

Показатель (ммоль/л) Длительность эксперимента	Триглицериды	Общий холестерин	Холестерин ЛПВП	Холестерин ЛПНП
контроль	0,31 – 1,16	1,05 – 1,62	0,52 – 1,53	0,34 – 0,54
2 недели	0,38 – 0,56	0,2 – 1,6	0,7 – 1,95	0,35 – 0,6
4 недели	0,41 – 2,42	1,1 – 2,1	0,66 – 1,8	0,36 – 0,68

Изменения цитологических показателей белой крови экспериментальных животных представлены в Таблице 3.1.4.

Таблица 3.1.4 – Цитологические показатели белой крови контрольных и экспериментальных животных в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии

Контрольные показатели		
Показатели ($10^9/\text{л}$)	Интервальные значения	$M \pm m$
Лейкоциты	2,2 – 18,3	$10,79 \pm 2,24$
Гранулоциты	2,15 – 4,62	$3,79 \pm 0,42$
Лимфоциты	3,75 – 7,21	$6,51 \pm 0,90$
Моноциты	0,54 – 1,26	$0,63 \pm 0,23$
Гранулоциты (%)	21,5 – 46,7	$35,10 \pm 4,14$
Лимфоциты (%)	37,5 – 72,1	$59,39 \pm 5,65$
Моноциты (%)	6,4 – 23,6	$6,90 \pm 1,76$
Длительность эксперимента 2 недели		
Лейкоциты	8,2 – 12,8	$9,80 \pm 2,12$
Гранулоциты	1,5 – 3,2	$2,72 \pm 0,54^*$
Лимфоциты	5,8 – 7,5	$6,22 \pm 1,44$
Моноциты	0,50 – 0,82	$0,69 \pm 0,20$
Гранулоциты (%)	15,5 – 32,2	$27,74 \pm 3,21$
Лимфоциты (%)	55,8 – 70,1	$63,52 \pm 9,64$
Моноциты (%)	5,2 – 8,4	$7,01 \pm 1,56$
Длительность эксперимента 4 недели		
Лейкоциты	7,8 – 19,8	$13,75 \pm 1,76^*$
Гранулоциты	3,5 – 7,2	$5,22 \pm 1,03^*$
Лимфоциты	4,2 – 5,9	$5,26 \pm 0,69$
Моноциты	1,2 – 3,1	$1,92 \pm 0,24^*$
Гранулоциты (%)	25,8 – 56,9	$45,25 \pm 2,53$
Лимфоциты (%)	30,2 – 42,5	$38,23 \pm 1,86$
Моноциты (%)	10,5 – 20,1	$16,04 \pm 2,42$

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с показателями интактного контроля при $p < 0,05$

Изменения в составе белой крови появлялись только через 4 недели «метиониновой нагрузки». К этому времени на 27,43% увеличилось абсолютное количество лейкоцитов, на 37,73% – гранулоцитов, в 3,05 раза было повышено количество моноцитов ($p < 0,05$). Одновременно отмечалось некоторое снижение абсолютного содержания лимфоцитов – они составляли 80,78% от контрольных значений ($p < 0,1$), укладываясь, тем не менее, в референсные значения.

На 4 неделе эксперимента обнаруживается тенденция к повышению общего белка крови: с $64,82 \pm 2,52$ (контроль) до $77,90 \pm 2,19$ г/л (гипергомоцистеинемия), превышение показателя составило 20,18% ($p < 0,05$). Можно предположить, что превышение показателя маркирует начало активного воспалительного процесса, который в дальнейшем может перейти в хроническую фазу.

Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) – это параметр, который указывает на активность воспалительного процесса в организме и уровень эндогенной интоксикации. Лейкоцитарный индекс рассчитывается как отношение лимфоцитов к нейтрофилам (миелоциты, метамиелоциты — юные, палочкоядерные, сегментоядерные), отражает взаимоотношение гуморального (лимфоциты) и клеточного (нейтрофилы) звеньев иммунной системы. Рассчитанный параметр ЛИИ для контрольной и экспериментальной группы, получавшей метионин, увеличивается в 1,58 раз, составляя $0,31 \pm 0,05$ и $0,49 \pm 0,1$ у.е. соответственно.

Динамика показателей красной крови у экспериментальных животных в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии представлена в Таблице 3.1.5.

Таблица 3.1.5 – Цитологические показатели красной крови контрольных и экспериментальных животных в процессе формирования умеренной гипергомоцистеинемии

Контрольные показатели		
Показатели	Интервальные значения	M±m
RBC ($10^{12}/л$)	5,49-7,49	6,75±0,71
Hb (г/л)	105-148	120,62±4,13
HCT (%)	0,19-0,398	0,36±0,03
PLT ($10^9/л$)	507-948	660,75±93,18
PCT (%)	435-725	553,13±36,94
MCV (фл)	51-68	54,87±1,84
MCH (пг)	16,2-19,5	17,72±0,43
RDW (%)	15,1-18,4	17,11±0,33
MPV (фл)	5,2-6,8	6,1±0,18
PDW (фл)	3,2-12,6	9,45±1,10
Длительность эксперимента 2 недели		
RBC ($10^{12}/л$)	6,05-7,26	6,63±0,29
Hb (г/л)	103-133	116,33±7,20
HCT (%)	0,35-0,78	0,50±0,11
PLT ($10^9/л$)	481-766	641,23±68,74
PCT (%)	0,2-0,47	0,39±0,04
MCV (фл)	52-58,1	55,67±1,52
MCH (пг)	17-18,9	17,47±0,34
RDW (%)	16,3-17,8	16,67±0,16
MPV (фл)	6,1-6,6	6,16±0,05
PDW (фл)	6,9-13,3	9,13±1,70
Длительность эксперимента 4 недели		
RBC ($10^{12}/л$)	6,05-7,26	5,54±0,49*
Hb (г/л)	92-160	110,0±4,94*
HCT (%)	0,148-0,529	0,325±0,037
PLT ($10^9/л$)	488-1161	933,27±83,42*
PCT (%)	193-710	558,09±48,31
MCV (фл)	53-67,3	57,07±1,19
MCH (пг)	18,7-20,5	19,93±0,19*
RDW (%)	14,6-19,4	17,42±0,37
MPV (фл)	5,7-6,5	6,29±0,14
PDW (фл)	3,2-15,7	10,39±1,03

* – различия достоверны в сравнении с контролем, $p < 0,05$

Таким образом, умеренная гипергомоцистеинемия приводила к изменениям в составе красной крови четырех показателей: количества эритроцитов (снижались на 17,93%, $p<0,05$), уровня гемоглобина (снижался на 8,3%, $p<0,05$), средней концентрации гемоглобина в эритроците (повышался на 12,47%, $p<0,05$) и уровня тромбоцитов (повышался на 41,4%, $p<0,05$).

Нами были проверены массовые коэффициенты органов экспериментальных животных при формировании гипергомоцистеинемии. Данные анализа абсолютной массы тела и органов у животных с гипергомоцистеинемией, а также массовые коэффициенты органов представлены в Таблице 3.1.6.

Таблица 3.1.6 – Абсолютная масса и массовые коэффициенты органов контрольных животных и крыс с гипергомоцистеинемией ($M\pm m$)

		Общая масса тела	Печень	Сердце	Селезенка	Тимус
Контроль	Масса (г)	316,0 $\pm$ 1 3,31	11,15 $\pm$ 0,9 1	1,04 $\pm$ 0,0 8	1,288 $\pm$ 0,2	0,387 $\pm$ 0,0 4
	МКО	-	0,034 $\pm$ 0,0 015	0,0027 $\pm$ 0,0006	0,0032 $\pm$ 0,0 0097	0,0012 $\pm$ 0, 000095
Введение метионина 4 недели	Масса (г)	252,1 $\pm$ 2 1,81*	8,89 $\pm$ 0,34 *	0,81 $\pm$ 0,0 6	1,04 $\pm$ 0,1	0,410 $\pm$ 0,0 6
	МКО	-	0,037 $\pm$ 0,0 034	0,0032 $\pm$ 0,000023 *	0,0041 $\pm$ 0,0 00036*	0,0016 $\pm$ 0, 00026*

* – различия достоверны при $p<0,05$

МКО – массовый коэффициент органа

У экспериментальной группы животных достоверно ($p < 0,05$) снижались: общая масса тела (на 20,2%), масса печени (в 1,25 раза) и сердца (в 1,28 раза), повышается масса селезенки (на 33,3%), масса тимуса достоверно не изменялась. Коэффициенты массы (масса органа/масса тела) были повышены для печени на 8,8%, селезенки на 28,2%, тимуса на 33,3%, сердца на 18,5% ($p < 0,05$).

3.1.2. Морфометрическая характеристика клеточных популяций печени

Популяция гепатоцитов контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

В печени крыс нет четкого деления на доли в связи с незначительным развитием соединительной ткани в органе, но клеточные балки просматриваются отчетливо (Рисунок 3.1.1). Гепатоциты контрольных животных при окраске гематоксилином и эозином были представлены крупными полигональными клетками с четко контурируемой плазмолеммой, хорошо окрашивающимся ядром, в котором располагаются 1-2 ядрышка (Рисунок 3.1.2). Доля двуядерных гепатоцитов у интактных животных составляла $12,5 \pm 2,52\%$. Чаще двуядерные клетки формировали группы по 1-3, располагаясь вблизи сосудов.

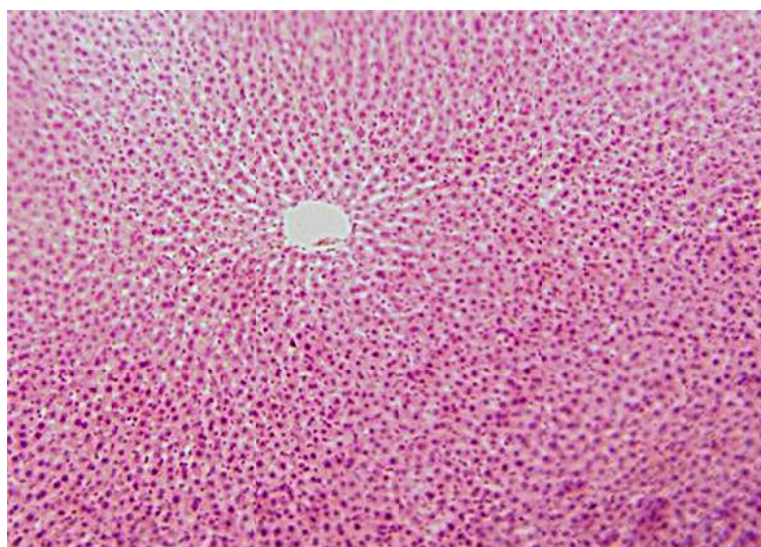


Рисунок 3.1.1 – Обзорный снимок печени контрольных крыс. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 10$ ок. $\times 7$

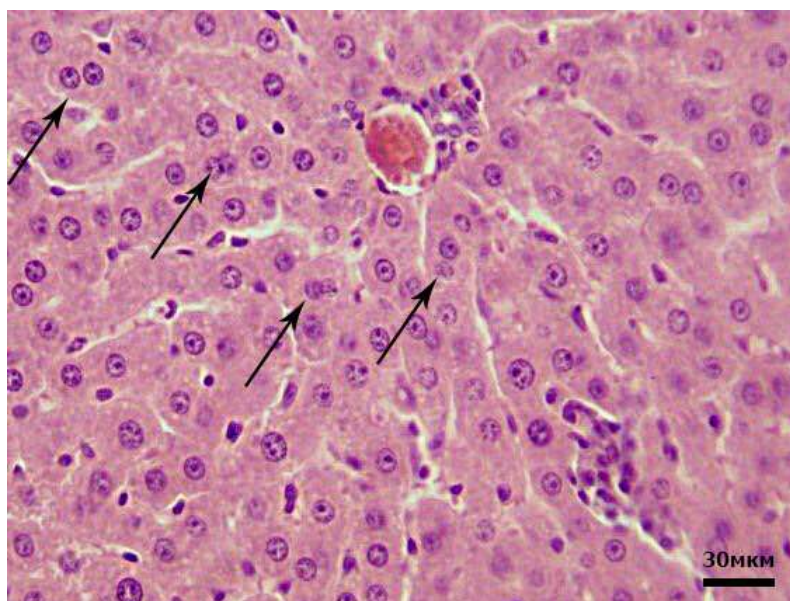


Рисунок 3.1.2 – Печень контрольных крыс. Двухъядерные гепатоциты (стрелки).
Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 40$ ок. $\times 10$

Основные морфометрические данные, отражающие размеры клеток, площади цитоплазмы, ядра отдельно взятой клетки, а также параметры, рассчитанные на их основе (ядерно-цитоплазматический индекс, площадь, занимаемая функциональной паренхимой, совокупная площадь ядерного материала) представлены в Таблице 3.1.7.

Таблица 3.1.7 – Морфометрические характеристики гепатоцитов интактных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Показатели	Экспериментальные группы	
	Интактный контроль	Гипергомоцистеинемия
Количество гепатоцитов, рассчитанное на площадь среза 100 мкм^2	$448,1 \pm 23,3$	$256,2 \pm 15,5^*$
Площадь гепатоцита (мкм^2)	$378,57 \pm 14,5$	$266,82 \pm 12,8^*$
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм^2)	$328,1 \pm 14,17$	$235,51 \pm 11,02$
Площадь, занимаемая функциональной паренхимой (мкм^2)	$169605,85 \pm 110,4$	$68354,16 \pm 112,8^*$
Площадь ядра (мкм^2)	$52,51 \pm 4,5$	$56,68 \pm 5,58$

Диаметр ядра (мкм)	8,75±0,18	9,28±0,18
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*
Совокупная площадь ядерного материала гепатоцитов на 100 мкм ²	26565,31±324,2	15334,77±125,8*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,197±0,12	0,236±0,11

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

При умеренной гипергомоцистеинемии резко падала плотность расположения клеток на единицу площади среза печени (в 1,75 раз, $p < 0,05$), количество ядер (в 1,86 раз, $p < 0,05$), доля двуядерных гепатоцитов (в 2,2 раза, $p < 0,05$). Гепатоциты уменьшались в размерах, преобладали мелкие клетки, практически исчезал класс гепатоцитов с большими размерами, площадь среза гепатоцита была снижена в 1,3 раза. Объем функциональной паренхимы снижался в 2,4 раза ($p < 0,05$). Наблюдалась дистрофия отдельных гепатоцитов (Рисунок 3.1.3).

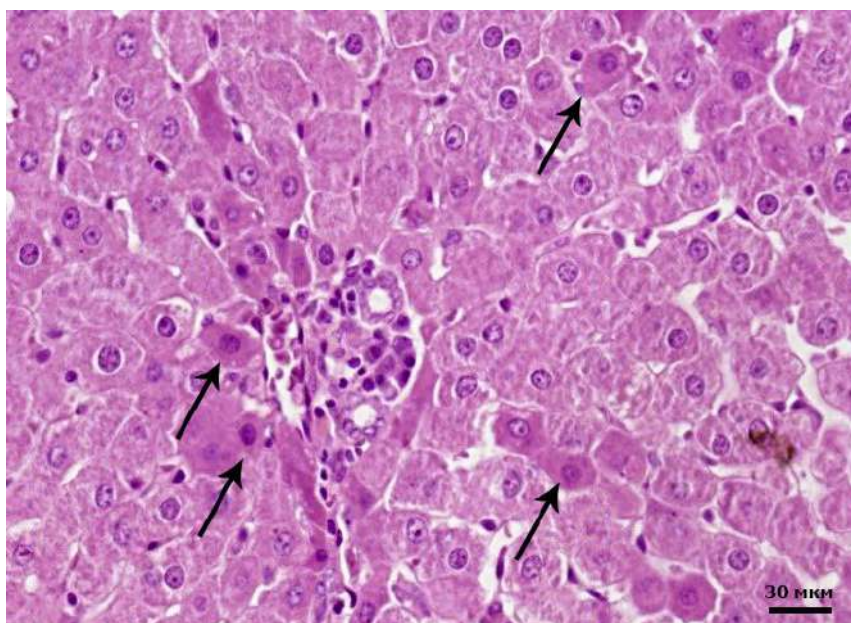


Рисунок 3.1.3 – Дистрофические изменения гепатоцитов (стрелки). Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. ×40 ок. ×10

Умеренная гипергомоцистеинемия сопровождалась формированием в печени лимфоцитарно-лейкоцитарных инфильтратов вокруг сосудов, отмечался застой крови в венах с элементами сладжирования эритроцитов (Рисунок 3.1.4).

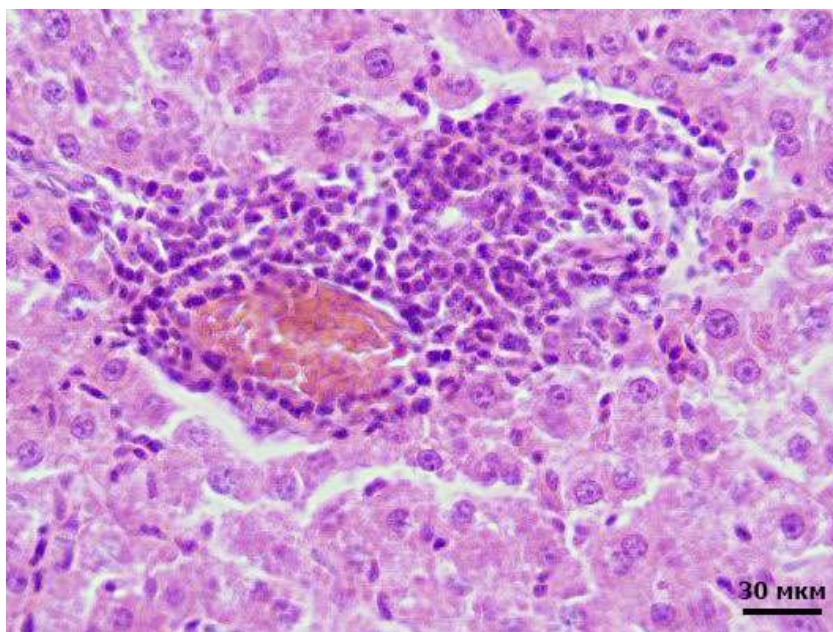


Рисунок 3.1.4 – Лимфоцитарно-лейкоцитарные инфильтраты. Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 40$ ок. $\times 10$

Общая площадь, занимаемая ядерным материалом, также была снижена (в 1,69 раз, $p < 0,05$), что объясняется уменьшением количества ядер, приходящихся на 100 мкм^2 печени. Средний диаметр ядра гепатоцитов незначительно повышался, что может быть связано с появлением клеток с очень крупными ядрами – они составляют 12,5% всей популяции (Рисунок 3.1.5, 3.1.6). Площадь ядра таких клеток превосходила среднепопуляционные параметры на 40% и достигала $78,6 \text{ мкм}^2$, а ядерно-цитоплазматическое отношение было увеличено в 3,8 раз ($p < 0,05$).

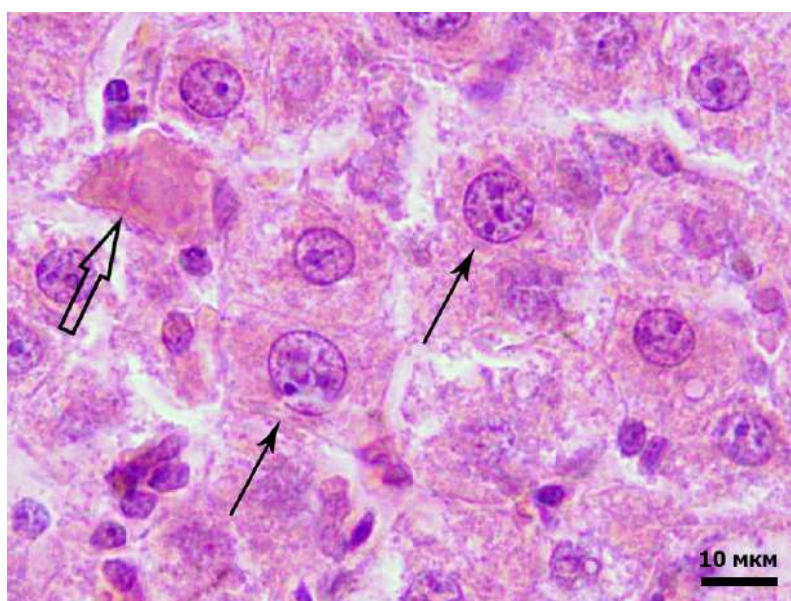


Рисунок 3.1.5 – Гепатоциты с крупным ядром (стрелки). Некроз гепатоцита (двойная стрелка). Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 100$ ок. $\times 10$

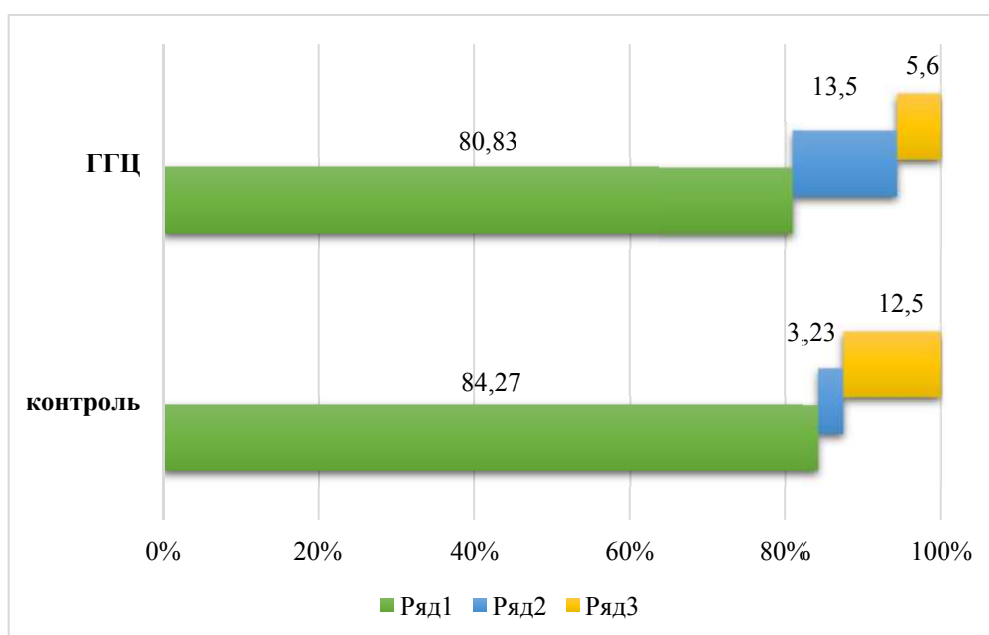


Рисунок 3.1.6 – Процентное соотношение клеток, имеющих среднюю площадь ядра (ряд 1) и крупные ядра (ряд 2), доля двуядерных гепатоцитов (ряд 3) у интактных животных и в группе с умеренной гипергомоцистеинемией

Функциональная активность клетки (белоксинтетические процессы) тесно связана с биогенезом рибосом, формирование которых происходит в ядре в области, называемой ядрышковым организатором (ЯОр). ЯОр – участок хромосом, в котором располагаются рибосомные гены. Для выявления этих областей в интерфазном ядре существует методика окраски азотнокислым серебром, при которой ЯОр специфически взаимодействуют с красителем, и выявляемая область обозначается как Ag-ЯОр (или AgNORs – *Argyrophilic Nucleolar organiser regions*). Характеристика Ag-ЯОр в гепатоцитах печени интактных животных представлена в таблице 3.1.8. В ядрах гепатоцитов контрольных крыс количество Ag-ЯОр могло быть различным: встречались как одноядрышковые, так и полинуклеолярные ядра (Таблица 3.1.8, Рисунок 3.1.7).

Фенотип Ag-ЯОр принято делить по степени восприимчивости серебра и размерам, что соответствует их функциональной активности. Крупные светлые (нуклеолонемные) и темные (компактные) Ag-ЯОр относятся к функционально-активному варианту, кольцевидные Ag-ЯОр и микроAg-ЯОр являются мало- и неактивными. Возможны переходные варианты (нуклеолонемно-компактные), также относящиеся к активным формам Ag-ЯОр. В гепатоцитах контрольных животных большая часть Ag-ЯОр имела активный фенотип (85,5%), но при этом и достаточно объемный пул составляли ядрышки с минимальной активностью (микроядрышки) – 14,5%.

При умеренной гипергомоцистеинемии ядрышковый субкомпаратмент ядра гепатоцитов животных претерпевал значительные преобразования (Таблица 3.1.8).

Таблица 3.1.8 – Морфометрические характеристики области ядрышкового организатора гепатоцитов интактных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Параметры Ag-ЯОр	Контроль	Гипергомоцистеинемия
Количество Ag-ЯОр / ядро	4,28±0,17	2,5±0,1*
Средняя площадь одного Ag-ЯОр (мкм ²)	9,63±0,48	7,79±0,48*
Совокупная площадь Ag-ЯОр на одно ядро (мкм ²)	45,07±2,44	19,47±2,54*
Соотношение площади Ag-ЯОр к площади ядра (у.е.)	0,858±0,06	0,343±0,05*
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 полинуклеоларных 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*
Активные фенотипы Ag-ЯОр	85,5±10,31	97,34±8,54
Расположение Ag-ЯОр (%)		
Центральное	2,8±0,66	12,72±1,87*
Эксцентричное	57,01±9,65	49,11±6,52
Прилежащее к кариолемме	40,19±5,52	38,17±6,21
Гранулярный компонент Ag-ЯОр (шт.)		
Общее количество гранул	2,72±0,52	1,62±0,51*
Интрануклеоларные гранулы	1,27±0,28	1,56±0,32
Экстрануклеоларные гранулы	0,16±0,06	0,06±0,01*

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

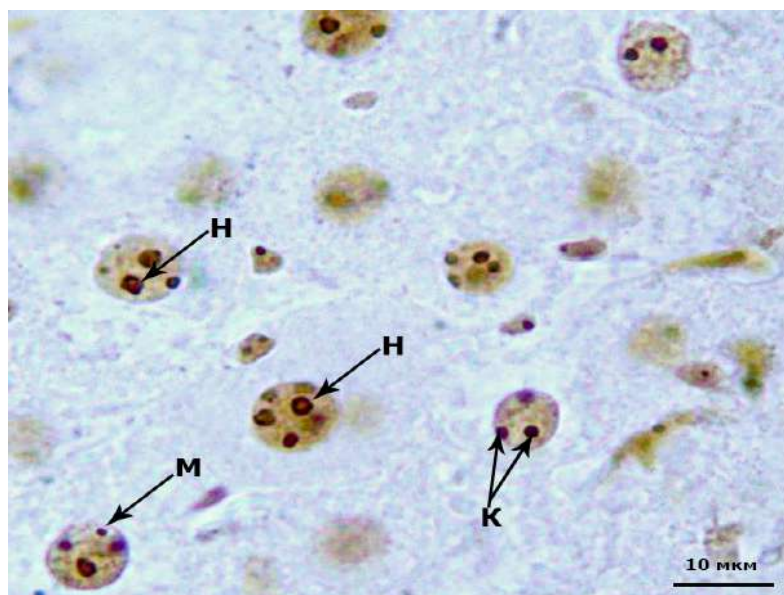


Рисунок 3.1.7 – Ядрышковые организаторы (Ag-ЯОр) гепатоцитов интактных животных. Фенотипы Ag-ЯОр: Н – нуклеолонемные, К – компактные, М – микро-Ag-ЯОр. Окраска: азотнокислое серебро, докраска метиленовым синим. Увеличение: об. $\times 100$, ок. $\times 10$.

При умеренной гипергомоцистеинемии снижались количество выявляемых областей Ag-ЯОр (в 1,71 раза, $p < 0,05$) и совокупная площадь Ag-ЯОр в ядре (в 2,31 раз, $p < 0,05$). Площадь отдельного ядрышкового организатора (Sяо) была снижена на 19,11%. Увеличивалось количество ядер, содержащих 2-3 Ag-ЯОр (при умеренной ГГЦ дву- и трехядрышковые ядра составляли половину всех нуклеол – 55,96%). В 22,96% ядер была представлена только одна область Ag-ЯОр, тогда как у контрольных животных одноядрышковых ядер не было отмечено совсем (Рисунок 3.1.7, 3.1.8).

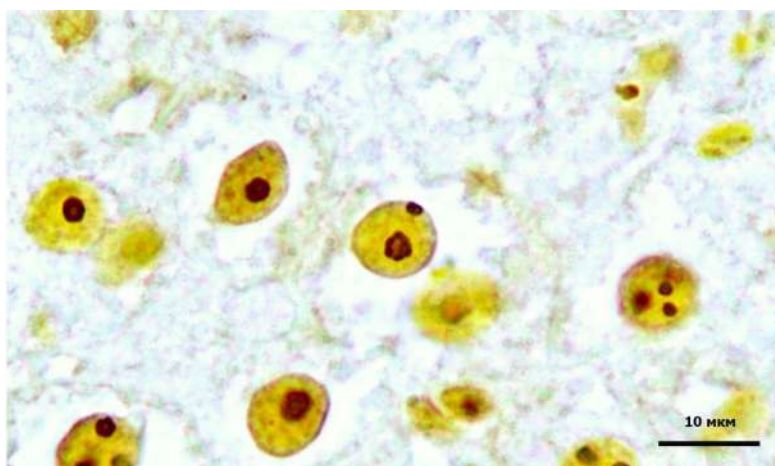


Рисунок 3.1.8 – Ядрышковые организаторы (Ag-ЯОр) гепатоцитов крыс с умеренной гипергомоцистеинемией. Объяснение в тексте. Окраска: азотнокислое серебро. Увеличение: об. $\times 100$, ок. $\times 10$

При гипергомоцистеинемии резко, в 3,47 раза ($p < 0,05$) снижалось количество клеток, в ядрах которых содержались 4-6 Ag-ЯОр, полностью отсутствовали гепатоциты, в ядре которых обнаруживалось 7 и более областей ядрышкового организатора (Таблица 3.1.8). Соотношение совокупной площади ядрышек к площади ядра снижалось в 2,5 раза. При умеренной гипергомоцистеинемии в 5,45 раз ($p < 0,05$) снижалось количество неактивных фенотипов Ag-ЯОр (т.н. микроядрышек), таким образом, практически вся популяция Ag-ЯОр теперь была представлена их активным типом (97,3%). Учитывая выявленный факт снижения количества гепатоцитов при гипергомоцистеинемии, уменьшения в них числа ядер и ядрышек, повышение активности Ag-ЯОр может быть компенсаторным ответом на стрессовый стимул. Пул микро-Ag-ЯОр, который составлял в контрольной популяции 14,5%, может являться своеобразным «резервным» фондом для обеспечения клетки белковыми продуктами при изменении условий ее существования.

У животных экспериментальной группы с гипергомоцистеинемией в 2,15 раз ($p < 0,05$) увеличивалось количество Ag-ЯОр компактного варианта (темные, крупные): с $8,4 \pm 2,41\%$ в контроле до $18,05 \pm 1,89\%$ в опыте. Эти ядрышки наиболее богаты белковыми гранулами, плотно заполняющими область ЯОр. Считается, что интенсивность аргирофилии прямо пропорциональна потенциальной активности

ядрышка. При умеренной гипергомоцистеинемии изменяется расположение Ag-ЯОр: они чаще занимают центральное положение в ядре, в отличие от контрольной популяции (преимущественно эксцентричное расположение).

Ядрышко-ассоциированные гранулы, окрашивающиеся серебром, соотносят с рРНК-протеиновыми комплексами, субъединицами рибосом, количеством функционирующих в клетке РНК-полимераз. Они представлены в нуклеолах аргирофильными интрануклеолярными гранулами (Ag-ИНГ), и, располагающимися в нуклеоплазме, экстрануклеолярными гранулами (Ag-ЭНГ). Гранулярная составляющая ядрышковых областей также представлена в таблице 3.1.8. Общее количество Ag-гранул при гипергомоцистеинемии снижено в 1,68 раз ($p < 0,05$), главным образом за счет Ag-ЭНГ – их количество снижается в 2,67 раз, $p < 0,05$), тогда как количество Ag-ИНГ даже несколько увеличиваются – на 22,83% (Таблица 3.1.8, Рисунок 3.1.9).

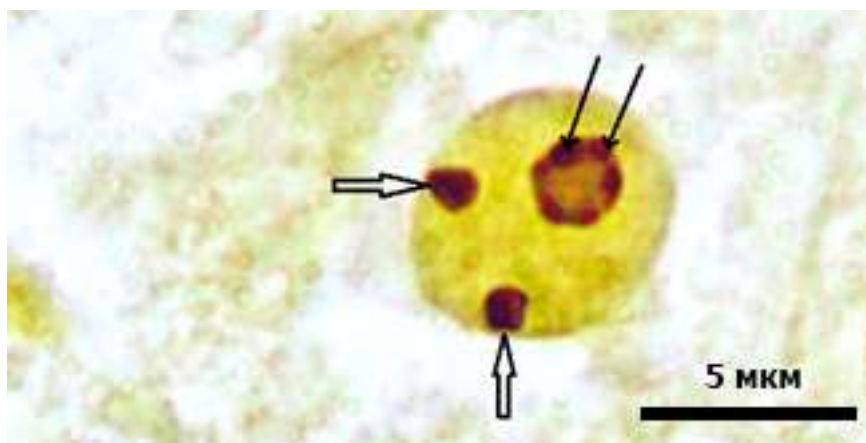


Рисунок 3.1.9 – Интрануклеолярные Ag-гранулы в Ag-ЯОр нуклеолонемного типа (стрелки). Два ядрышка компактного типа прилежат к кариолемме (двойные стрелки). Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: азотнокислое серебро. Увеличение: об. $\times 100$, ок. $\times 10$

Подобное перераспределение гранулярного компонента возможно объясняется тем, что повышенная активность ядрышковых генов в области Ag-ЯОр и формирование субъединиц рибосом (отражается в количестве интрануклеолярных

включений) при гипергомоцистеинемии сопровождается задержкой их транспорта в нуклеоплазму (количество экстракнуклеолярных Ag-гранул).

Учитывая факт увеличения объема ядер, мы провели исследование популяции гепатоцитов на определение белка Ki-67, традиционно используемого для оценки клеточной пролиферации. Было выяснено, что у контрольной группы животных белок Ki-67 экспрессируется в небольшой части клеток (Рисунок 3.1.10), при умеренной гипергомоцистеинемии число клеток, экспрессирующих белок, и интенсивность его экспрессии были значительно повышены (Рисунок 3.1.11).

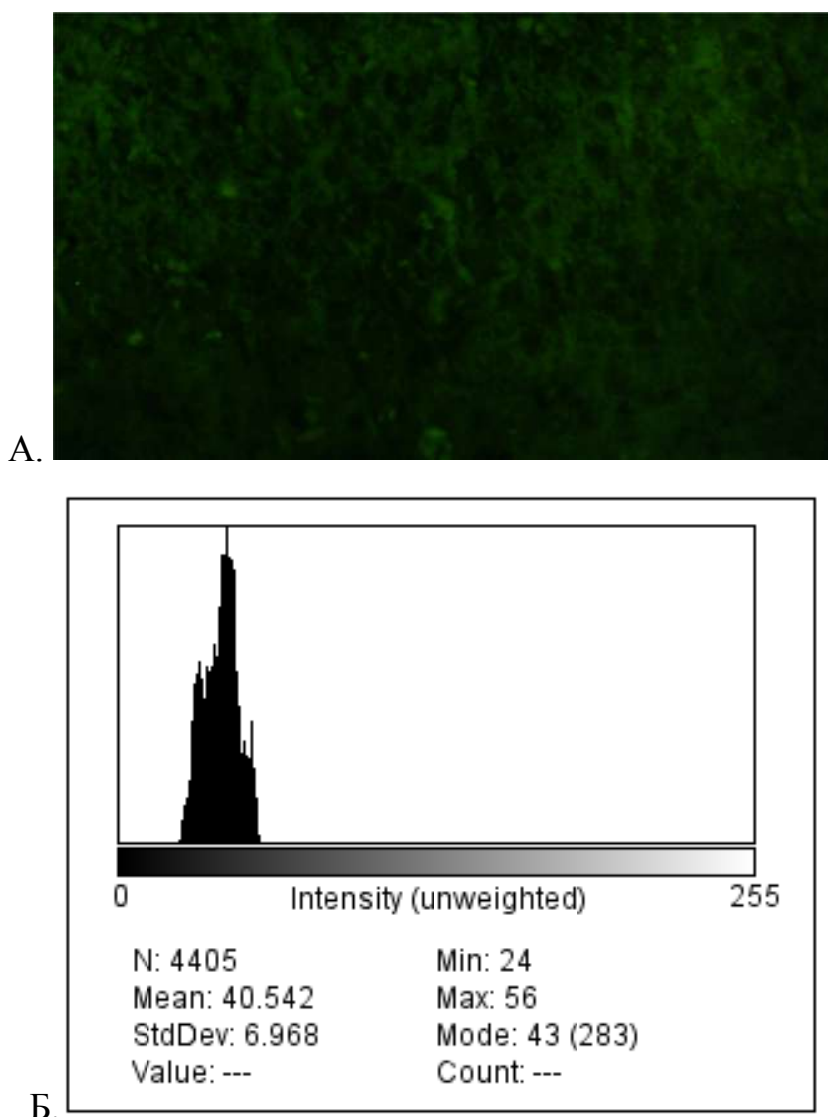


Рисунок 3.1.10 – А. Экспрессия белка Ki-67 в гепатоцитах контрольных животных. Клетки единичны, интенсивность экспрессии низкая. Иммуногистохимическая окраска с антителами к Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с Alexa Fluor 488. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Б. График интенсивности свечения продукта реакции

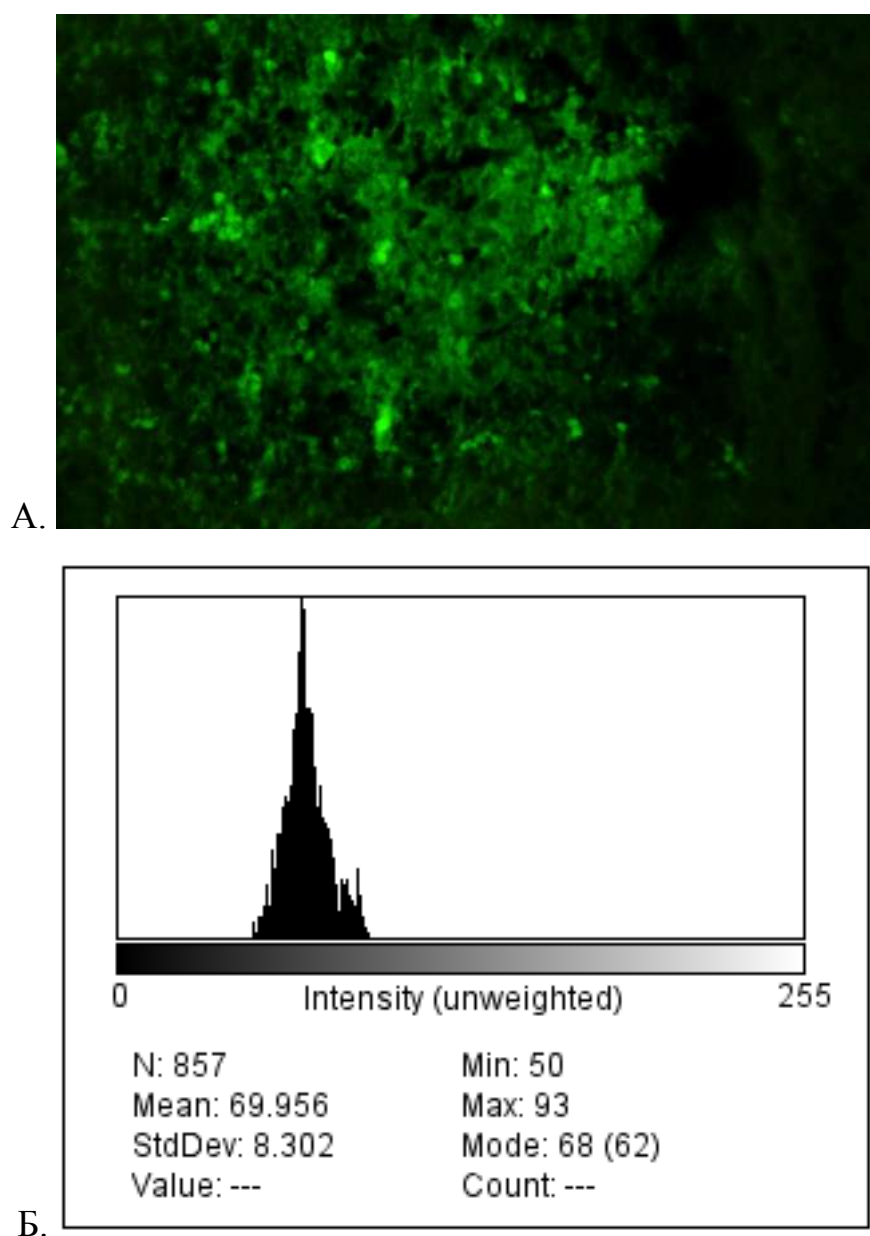


Рисунок 3.1.11 – А. Интенсивность экспрессии белка Ki-67 в гепатоцитах при умеренной гипергомоцистеинемии. Иммуногистохимическая окраска с антителами к Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с Alexa Fluor 488. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Б. График интенсивности свечения продукта реакции

У животных с умеренной формой гипергомоцистеинемии количество клеток, маркируемых Ki-67, возрастало в 2,6 раза ($p < 0,05$), средняя интенсивность свечения (экспрессия маркера) повышалась до $67,01 \pm 1,618$ у.е. – в 1,68 раз

($p < 0,05$). Пролиферативный индекс повышался в 4 раза. Основные параметры клеток с экспрессией маркера Ki-67 представлены в Таблице 3.1.9.

Таблица 3.1.9 – Количество Ki-67 позитивных клеток (шт/поле зрения) и интенсивность экспрессии белка (в поле зрения, у.е.) в контроле и при умеренной гипергомоцистеинемии ($M \pm m$)

Показатели	Экспериментальные группы	
	контроль	гипергомоцистеинемия
Количество Ki-67	$11,5 \pm 1,11$	$30,3 \pm 4,09^*$
Экспрессия маркера	$39,846 \pm 1,858$	$67,01 \pm 1,618^*$
Пролиферативный индекс (у.е.)	$0,03 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,07^*$

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

Морфометрическая и иммуногистохимическая характеристика популяции звездчатых макрофагов (Купферовских клеток) контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Звездчатые макрофаги (Купферовские клетки, КК) являются обширной популяцией клеток печени, выполняют в этом органе функции, направленные на поддержание гомеостаза железы, играют центральную роль в иницировании, сохранении и восстановлении после воспаления и повреждения печени. Они локализуются на просветной стороне синусоидов печени и легко визуализируются стандартными способами гистологической окраски (гематоксилин и эозин) (Рисунок 3.1.12). КК имеют неправильную форму, округлое или овальное ядро с одним или двумя ядрышками.

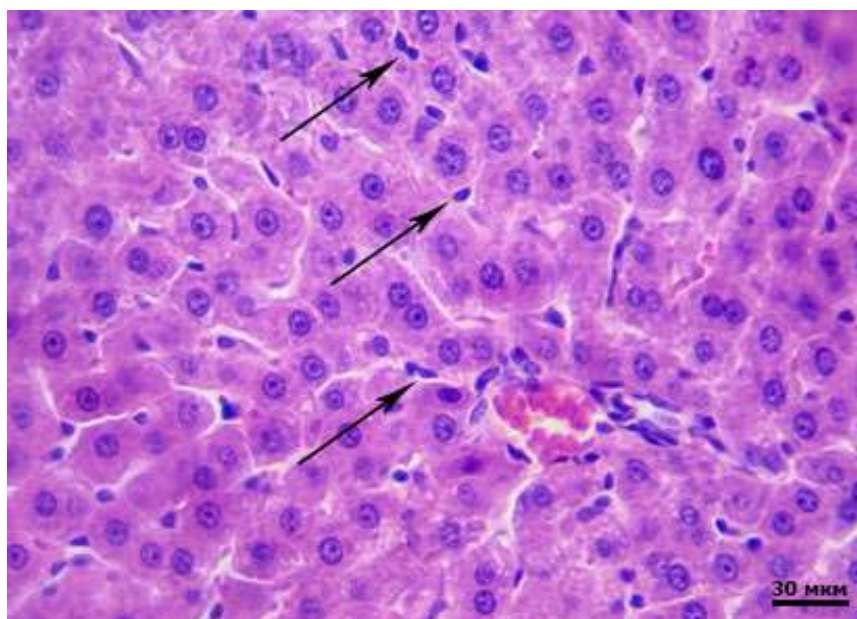


Рисунок 3.1.12 – Звездчатые макрофаги (Купферовские клетки) (стрелки). Контроль. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$

Окраска Купферовских клеток азотнокислым серебром для выявления ядрышкового организатора у интактных животных показало, что основным фенотипом Ag-ЯОр являлся кольцевидный вариант. Количество ядрышковых организаторов в КК составляет $1,43 \pm 0,057$ на одно ядро (Рисунок 3.1.13).

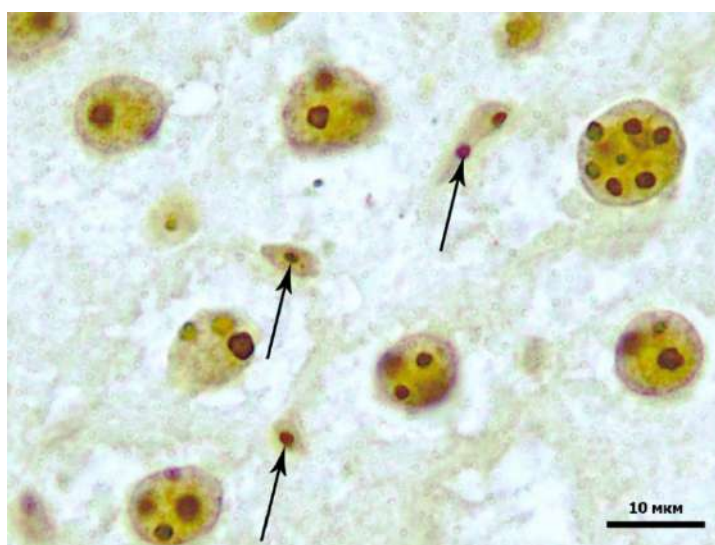


Рисунок 3.1.13 – Ядрышковые организаторы (Ag-ЯОр) Купферовских клеток (стрелки). Контроль. Окраска: азотнокислое серебро. Увеличение: об. 100, ок. 20

При умеренной гипергомоцистеинемии количество Купферовских клеток возрастало на 22,38% (в 100 мкм²): с 130,32±2,57 (контроль) до 159,48±4,18 ($p<0,05$) (Рисунок 3.1.14). В связи с этим, резко падало соотношение количества гепатоцитов/количество КК: с 3,44 до 1,61 (в 2,14 раз, $p<0,05$).

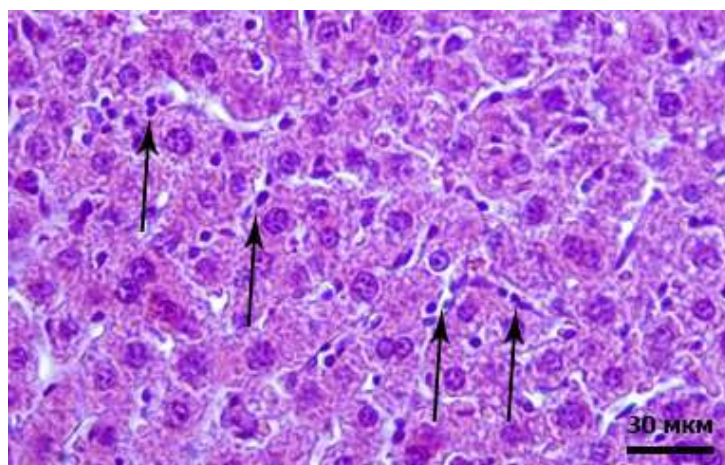


Рисунок 3.1.14 – Звездчатые макрофаги (Купферовские клетки) (стрелки). Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. ×40, ок. ×10

Количество ядрышковых организаторов в ядрах КК при выявлении их азотнокислым серебром не изменялось по сравнению с контролем, хотя встречаются клетки с 3-мя ЯОр (Рисунок 3.1.15).

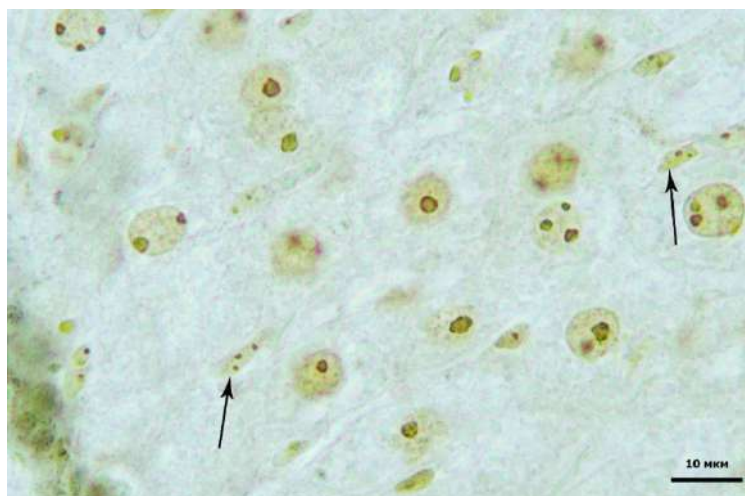


Рисунок 3.1.15 – Звездчатые макрофаги (Купферовские клетки) содержат 2-3 ядрышка (стрелки). Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: азотнокислое серебро. Увеличение: об. ×40, ок. ×10

Звездчатые макрофаги с фенотипом CD-68⁺ в печени контрольных животных располагались одиночно (Рисунок 3.1.16), либо цепочками (Рисунок 3.1.17), количество их незначительно возрастало вблизи центральной вены (Рисунок 3.1.18). Иммуногистохимическое окрашивание КК с фенотипом CD-68⁺ выявило увеличение их количества в сравнении с контрольной популяцией (Рисунок 3.1.19). Значимо ($p < 0,05$) увеличивались как количество Купферовских клеток (в 1,36 раз, с $103,4 \pm 17,7$ – контроль, $140,31 \pm 11,5$ – умеренная гипергомоцистеинемия), так и интенсивность их свечения (в 1,27 раз, с $38,87 \pm 0,39$ – контроль, $49,4 \pm 0,54$ – умеренная гипергомоцистеинемия). Доля КК клеток с фенотипом CD-68⁺ по отношению к числу Купферовских клеток, составляющих общую популяцию при окраске гематоксилином и эозином, составила при умеренной гипергомоцистеинемии 87,97%.

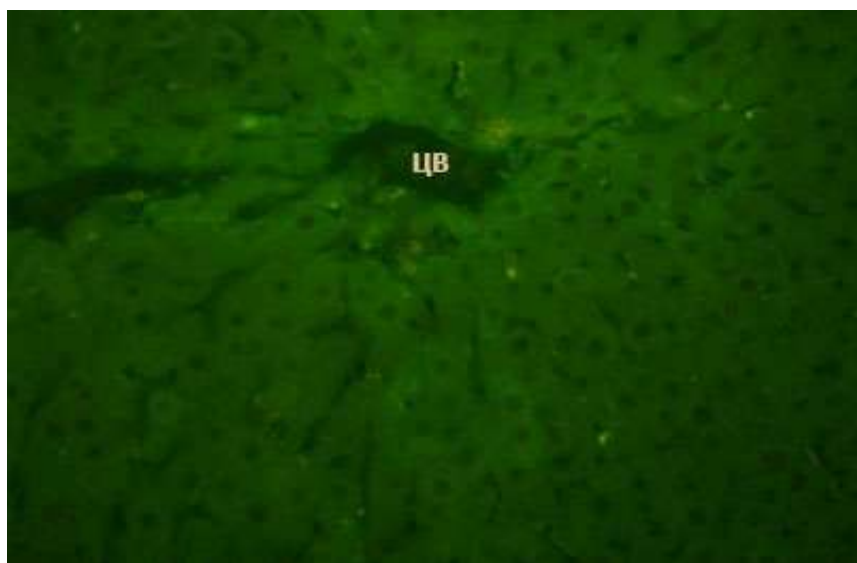


Рисунок 3.1.16 – CD-68⁺ Купферовские клетки. Контроль. ЦВ – центральная вена. Визуализируются гепатоциты с округлыми темными ядрами. Купферовские клетки располагаются одиночно. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, конъюгированных с FITC. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$

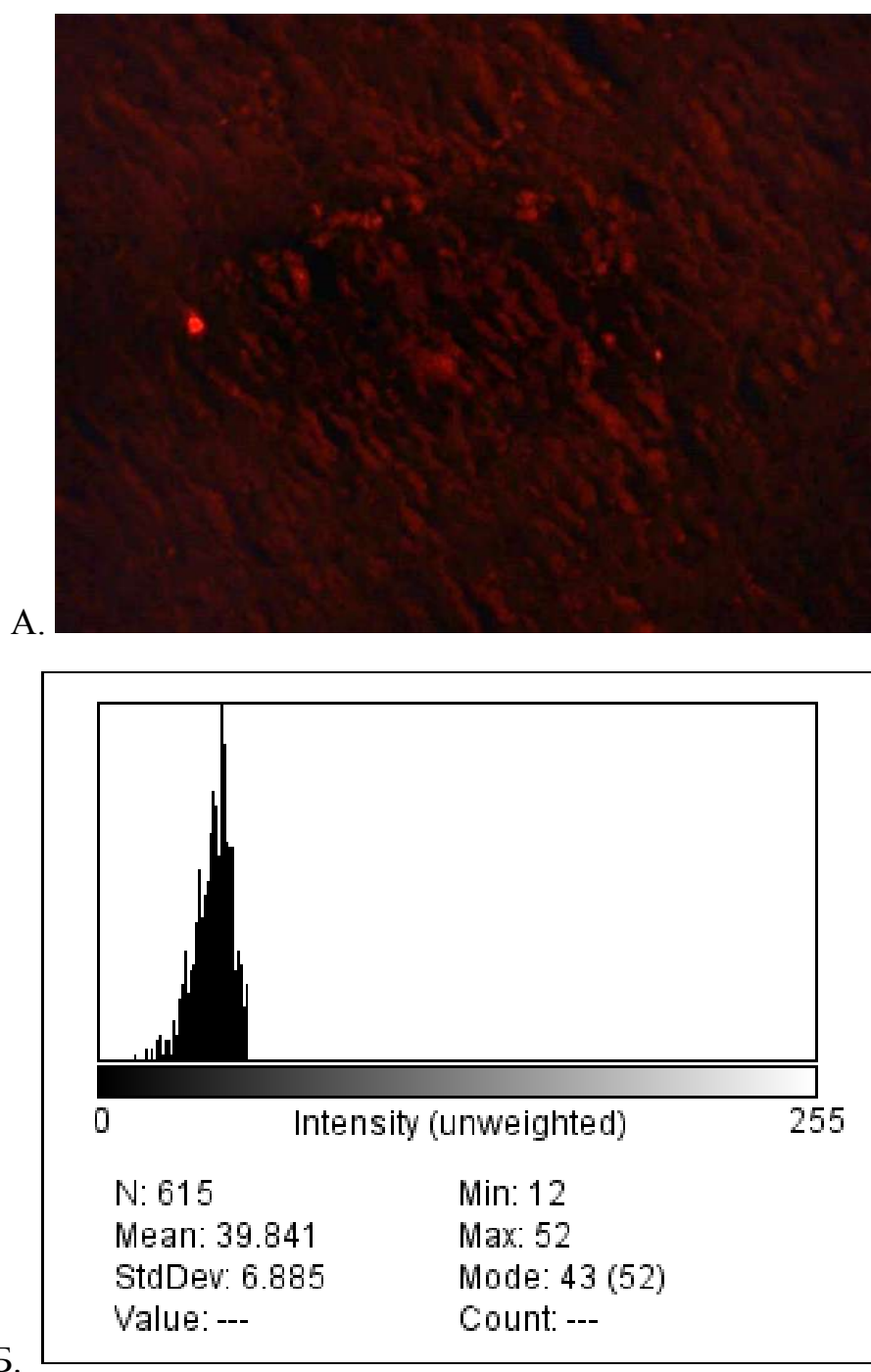


Рисунок 3.1.17 – А. CD-68+ Купферовские клетки формируют группы и цепочки, интенсивность свечения незначительна. Контроль. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Б. График интенсивности экспрессии продукта реакции

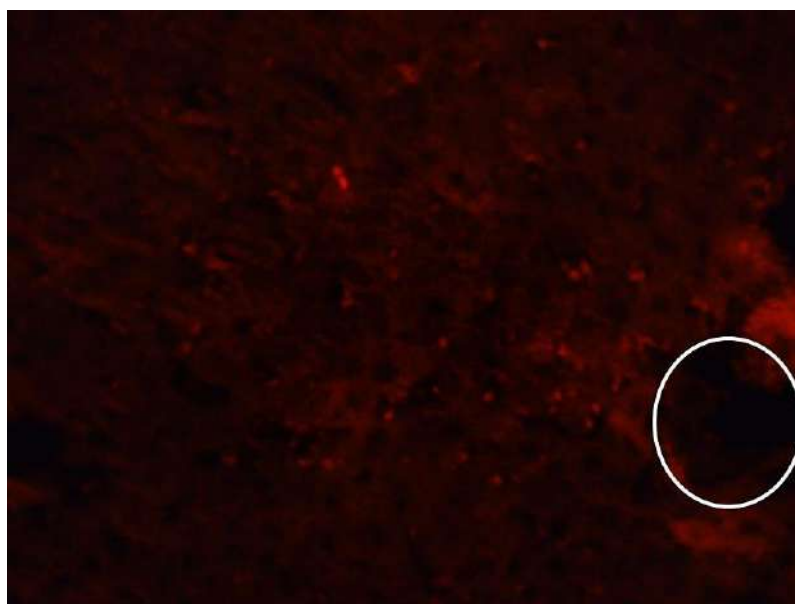
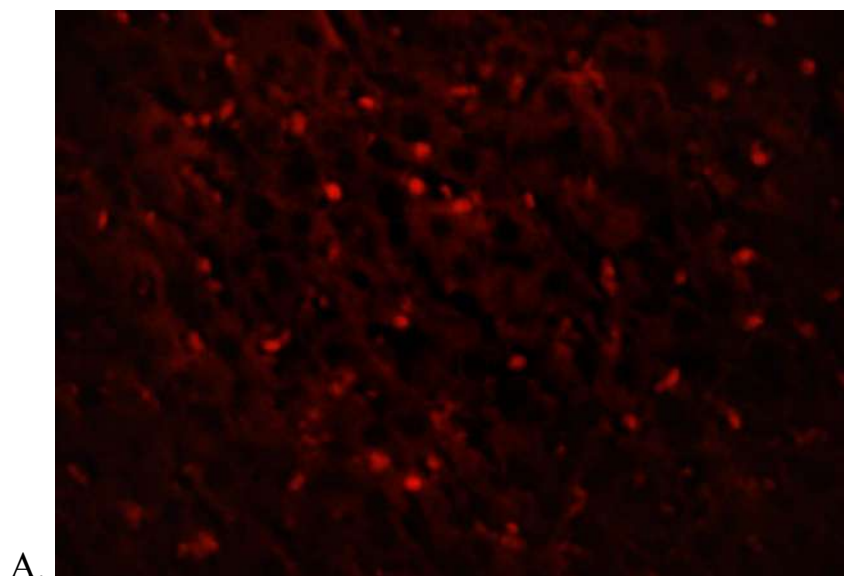


Рисунок 3.1.18 – Популяция CD-68⁺ Купферовских клеток. Контроль. Количество клеток возрастает вблизи центральной вены. Центральная вена обведена. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$



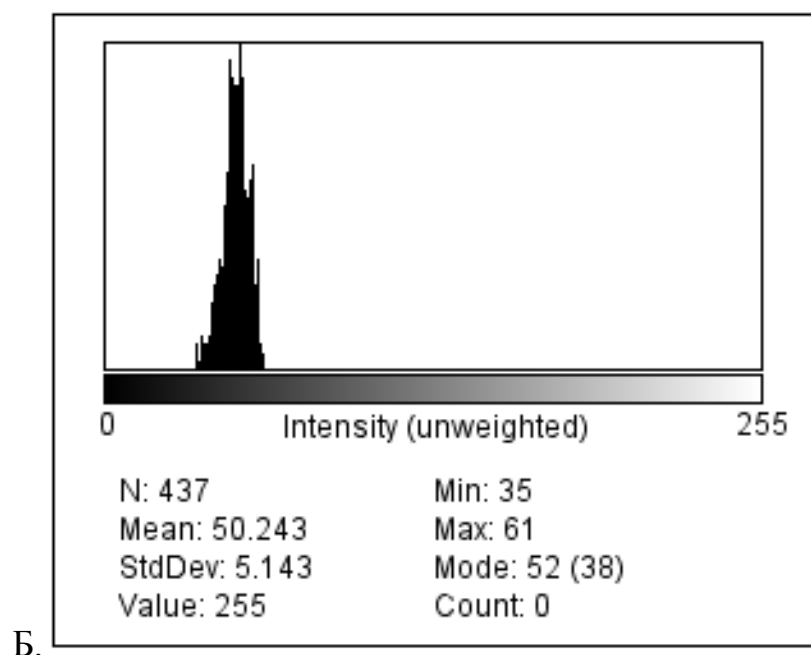


Рисунок 3.1.19 – А. CD-68+ Купферовские клетки. Умеренная гипергомоцистеинемия. Увеличено количество, повышена интенсивность свечения продукта реакции. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Б. График интенсивности экспрессии продукта реакции

Иммуногистохимическая характеристика популяции перисинусоидных клеток Ито контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Перисинусоидные клетки Ито располагаются в пространстве Диссе в непосредственной близости с гепатоцитами, обеспечивая микроокружение последних за счет непосредственного контакта и паракринных взаимодействий (Mishra V.K. et al., 2020). Обладая сократительной активностью, они регулируют кровотоков в синусоидных капиллярах подобно перицитам. Для визуализации перисинусоидных клеток Ито применяется выявление в них белков цитоскелета, например, гладкомышечного α -актина. Клетки Ито функционируют как в спокойном (выработка витамина А, например), так и в активированном состоянии (например, участвуя в процессе фиброгенеза). У контрольных животных популяция

перисинусоидных клеток Ито при выявлении их специфическим маркером α SAM была представлена немногочисленным количеством клеток с умеренной интенсивностью свечения. Численная плотность перисинусоидных клеток Ито составляла $105,77 \pm 8,97$ шт/поле зрения, они равномерно были распределены по всей площади среза, располагались поодиночке, не формируя скоплений (Рисунок 3.1.20).

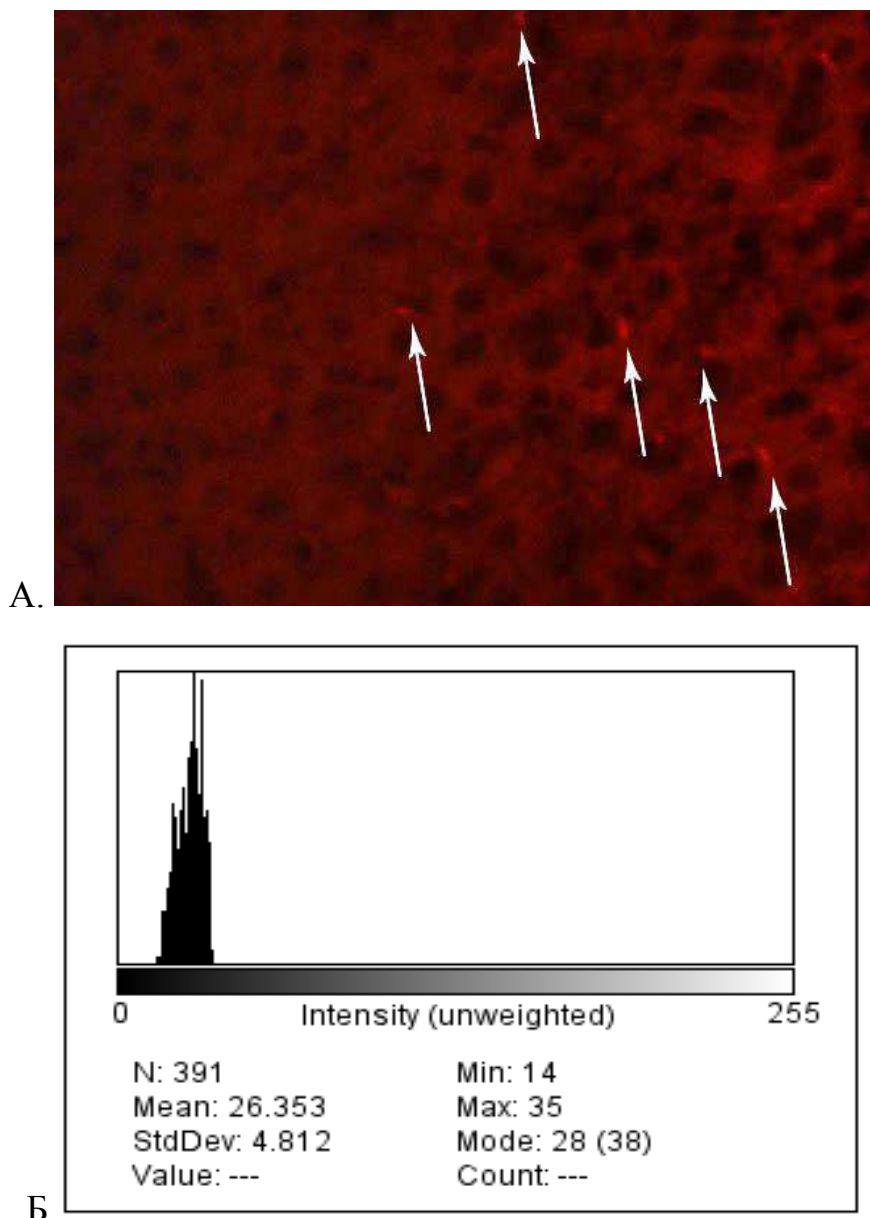
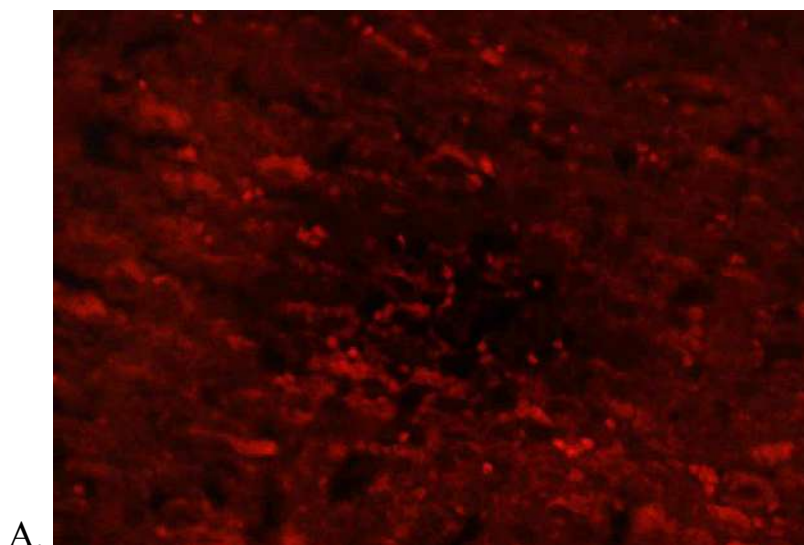


Рисунок 3.1.20 – А. Популяция перисинусоидных клеток Ито (стрелки). Контроль. Интенсивность экспрессии продукта реакции незначительна. Иммуногистохимическая окраска с α SAM, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Б. График интенсивности экспрессии продукта реакции

При умеренной гипергомоцистеинемии количество перисинусоидных клеток Ито увеличивалось в 3,07 раза, составляя $324,33 \pm 13,21$ на поле зрения микроскопа (Рисунок 3.1.21). Тьюки-тест показал статистически значимое различие в количестве клеток Ито между исследуемыми группами: $F(4, 58) = 70,324$, $p < 0,0001$.

При умеренной гипергомоцистеинемии перисинусоидные клетки Ито, маркируемые антителами к α -актину, формировали группы из 4-10 клеток, располагающихся цепочками (Рисунок 3.1.22). Визуально оцениваемое количество продукта иммуногистохимической реакции, соотносимое с различными клетками, было неодинаково. В отдельных перицитах его могло быть немного, в других – экспрессировалось значительное количество продукта, сами клетки были увеличены в размерах.

Интенсивность свечения гистохимического продукта при гипергомоцистеинемии увеличивалась в 1,5 раза: с $24,45 \pm 0,11$ (контрольная популяция) до $36,63 \pm 0,21$ у.е. (популяция клеток при умеренной гипергомоцистеинемии). Тьюки-тест показал, что наблюдалась статистически значимая разница в интенсивности свечения иммунореактивного продукта (гладкомышечного α -актина) между исследуемыми группами: $F(4, 8725) = 2100,06$, $p < 0,0001$.



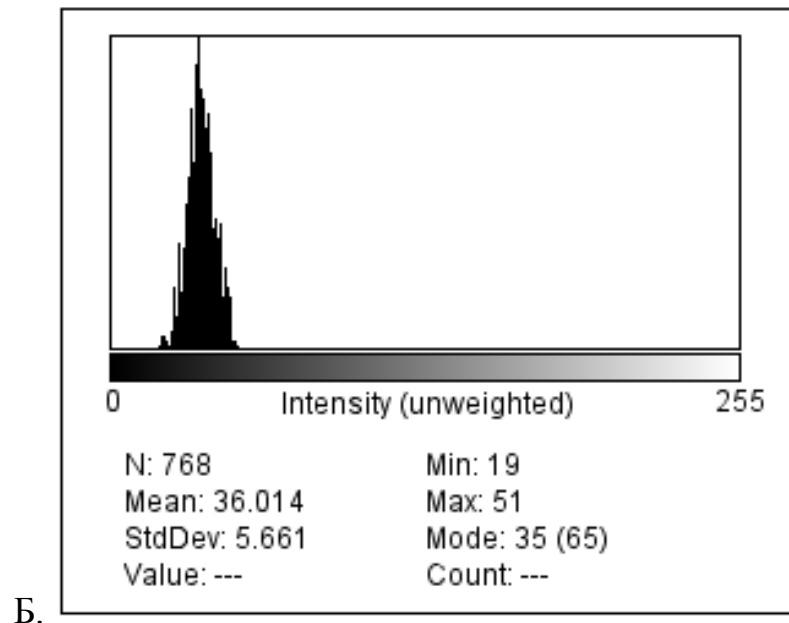


Рисунок 3.1.21 – А. Популяция перисинусоидных клеток Ито, маркируемых гладкомышечным α -актином (α SAM). Умеренная гипергомоцистеинемия. Увеличено количество клеток и повышена интенсивность свечения продукта реакции. Иммуногистохимическая окраска с антителами к α SAM, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Б. График интенсивности экспрессии α SAM

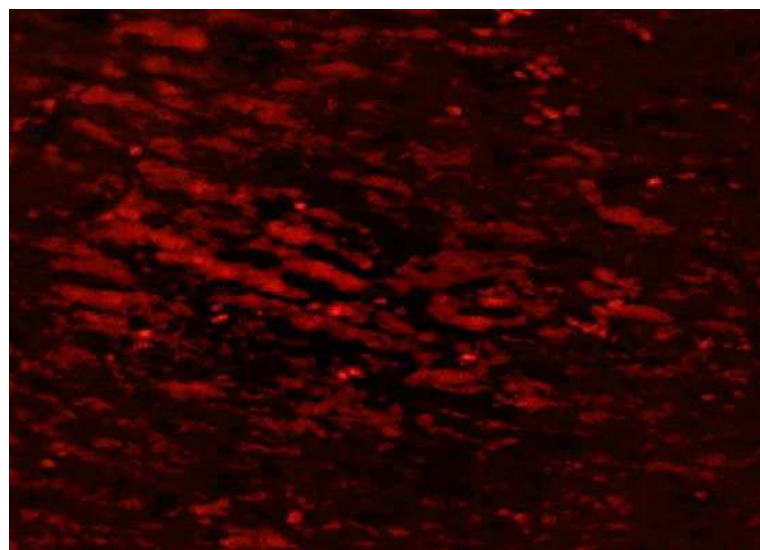


Рисунок 3.1.22 – Клетки Ито формируют группы, цепочки. Умеренная гипергомоцистеинемия. Иммуногистохимическая окраска на антитела к α SAM, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$

3.1.3. Морфометрическая характеристика кровеносного микрососудистого русла печени

Функциональная активность органа и составляющих его клеток и тканей определяется, прежде всего, его полноценным кровоснабжением. Основные морфометрические показатели контрольных животных представлены в Таблицах 3.1.10, 3.1.11, 3.1.12.

При умеренной гипергомоцистеинемии в печени крыс выявлялось расширение сосудов, вокруг вен формировались лимфоцитарно-лейкоцитарные инфильтраты (Рисунок 3.1.23).

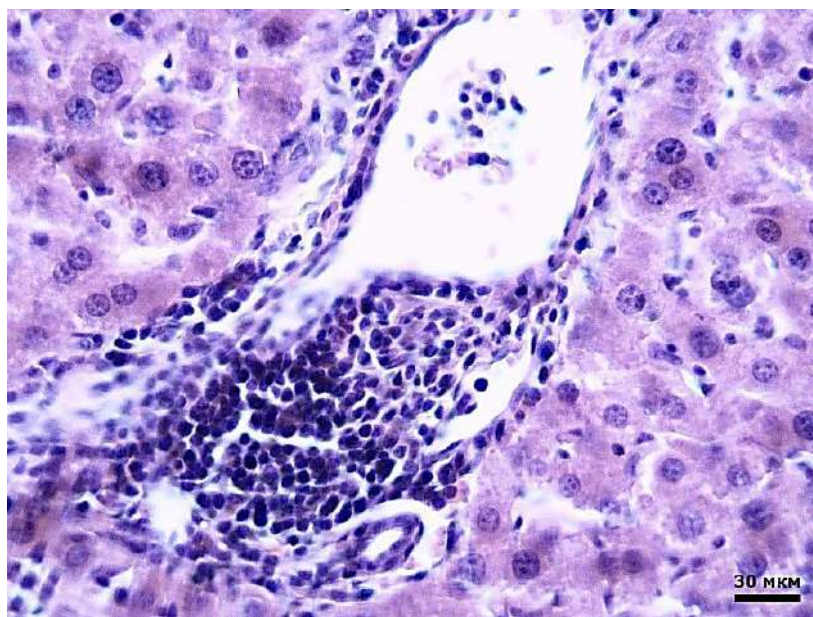


Рисунок 3.1.23 – Печеночная триада. Увеличение диаметра сосудов. Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 40$, ок. $\times 10$

На срезах печени отмечались как опустошение, так и полнокровие венозных сосудов, встречались участки спазмированных сосудов, с формированием сладж-феномена (Рисунок 3.1.24).

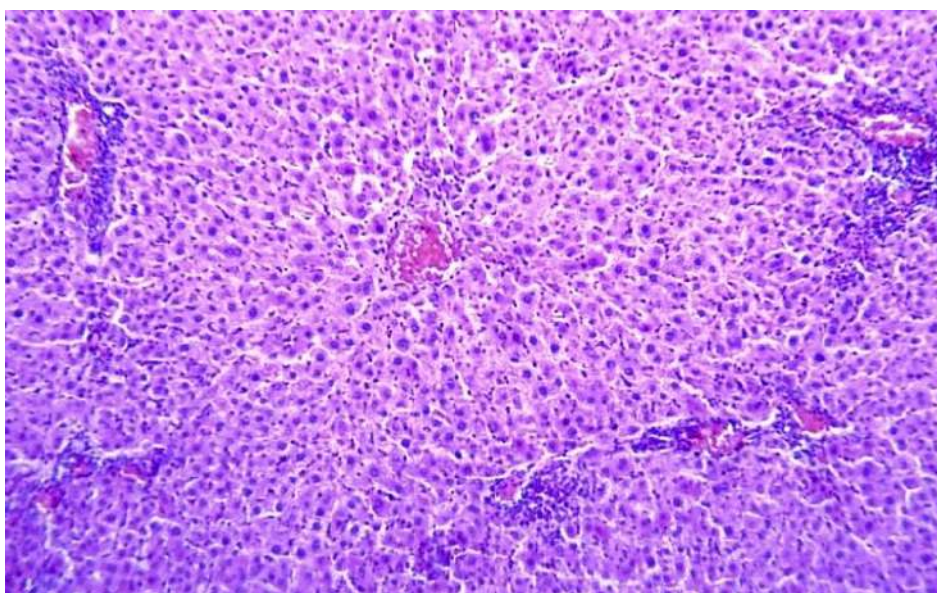


Рисунок 3.1.24 – Лимфоцитарно-лейкоцитарные инфильтраты, полнокровие сосудов печени. Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 10$ ок. $\times 7$

Вокруг сосудов отмечаются разной степени величины разрастания соединительной ткани (Рисунок 3.1.25).

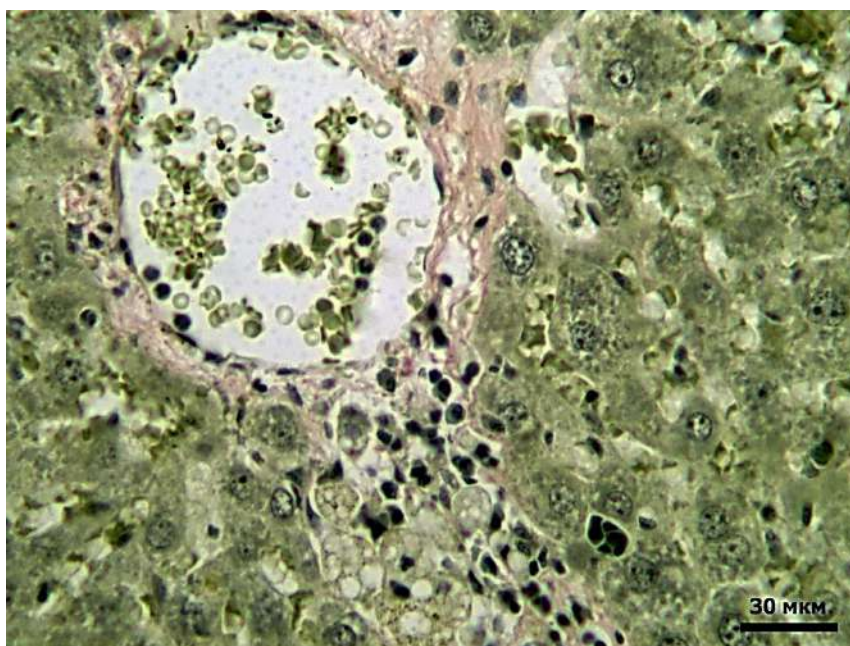


Рисунок 3.1.25 – Формирование околососудистой соединительной ткани. Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска по Ван Гизон. Увеличение: об. $\times 40$ ок. $\times 10$

При умеренной гипергомоцистеинемии значимо увеличивались как диаметр (Таблица 3.1.10), так и площади (Таблица 3.1.11) сосудов. Особенно заметно увеличивались диаметры центральной вены (в 2,27 раз) и междольковой артерии (в 1,85 раз), ($p<0,01$). Площадь центральной вены возрастала в 5,59 раз, ($p<0,01$), артерии – в 3,51 раз ($p<0,01$) в сравнении с контролем. Повышалась как нижняя, так и верхняя граница интервальных значений (за исключением референсных показателей нижней границы диаметра междольковой вены – при гипергомоцистеинемии она была снижена, таблица 3.1.10). Площадь междольковой вены повышалась в 2,12 раза ($p<0,05$). Изменялся диаметр желчного протока (увеличение составило 36,38% от нормы) и его площадь (возросла в 1,96 раз), ($p<0,05$).

Таблица 3.1.10 – Диаметры сосудов печени контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Сосуды Ø в мкм	центральная вена	междолькова я вена	междолькова я артерия	желчный проток
контроль				
Интервальные значения	63,39 – 80,28	26,69 – 42,88	25,85 – 40,65	9,23 – 19,70
Среднее ($M\pm m$)	72,9 $\pm$ 2,04	35,42 $\pm$ 1,86	32,97 $\pm$ 2,13	13,44 $\pm$ 1,23
Умеренная гипергомоцистеинемия				
Интервальные значения	93,68 – 227,53	29,1 – 76,21	43,29 – 93,46	10,76 – 32,31
Среднее ($M\pm m$)	165,3 $\pm$ 11,66* *	49,53 $\pm$ 3,78*	60,89 $\pm$ 3,64**	18,33 $\pm$ 1,55*

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

Таблица 3.1.11 – Площади сосудов печени контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией ($M \pm m$, мкм^2)

Сосуды	центральная вена	междолькова я вена	междолькова я артерия	желчный проток
контроль				
Интервальные значения	3033,69 – 5082,69	612,69 – 1431,20	528,96 – 1298,46	68,24 – 308,37
Среднее	4202,96 $\pm$ 215, 69	1009,91 $\pm$ 104, 28	886,13 $\pm$ 111,1 0	152,50 $\pm$ 27,88
Умеренная гипергомоцистеинемия				
Интервальные значения	7667,04 – 56367,33	406,34 – 4563,13	1472,23 – 6395,30	110,8 – 831,25
Среднее	23499,51 $\pm$ 32 64,01**	2139,91 $\pm$ 296, 94*	3109,56 $\pm$ 375, 53**	299,61 $\pm$ 52,72 *

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

Таблица 3.1.12 – Площади синусоидного русла ($M \pm m$), коэффициент Визотто контрольных животных и крыс с умеренной гипергомоцистеинемией

Показатели	Площадь синусоидов (мкм^2)	Площадь гепатоцитов (мкм^2)	Коэффициент Визотто (y.e.)
Контроль	1617,96 $\pm$ 123,56	169605,85 $\pm$ 110,4	0,010 $\pm$ 0,008
Умеренная гипергомоцистеинемия	3099,43 $\pm$ 211,23*	68354,16 $\pm$ 112,8*	0,045 $\pm$ 0,01*

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

Площадь синусоидов при умеренной гипергомоцистеинемии была увеличена в 1,92 раза ($p < 0,05$), синусоиды дилатированы (Рисунок 3.1.26, 3.1.27). Коэффициент Визотто, отражающий соотношение площади синусоидов к площади гепатоцитов при гипергомоцистеинемии увеличивался в 4,5 раза ($< 0,05$), что связано не только с увеличением площади гемокапилляров сосудистого русла, но так же и снижением общей площади гепатоцитов (в 2,48 раз, $< 0,05$). Однако из приведенных ранее данных (Таблица 3.1.6), отражающих весовые коэффициенты органов, видно, что

для печени соотношение масса органа/масса тела практически не изменялось, что позволяет утверждать отсутствие выраженного венозного застоя в органе.

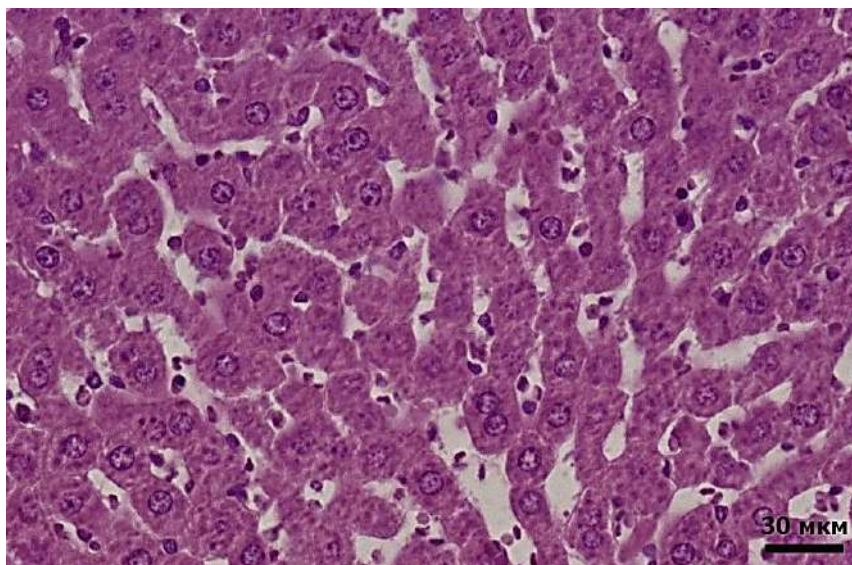


Рисунок 3.1.26 – Расширение синусоидов печени. Умеренная гипергомоцистеинемия. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 40$ ок. $\times 10$

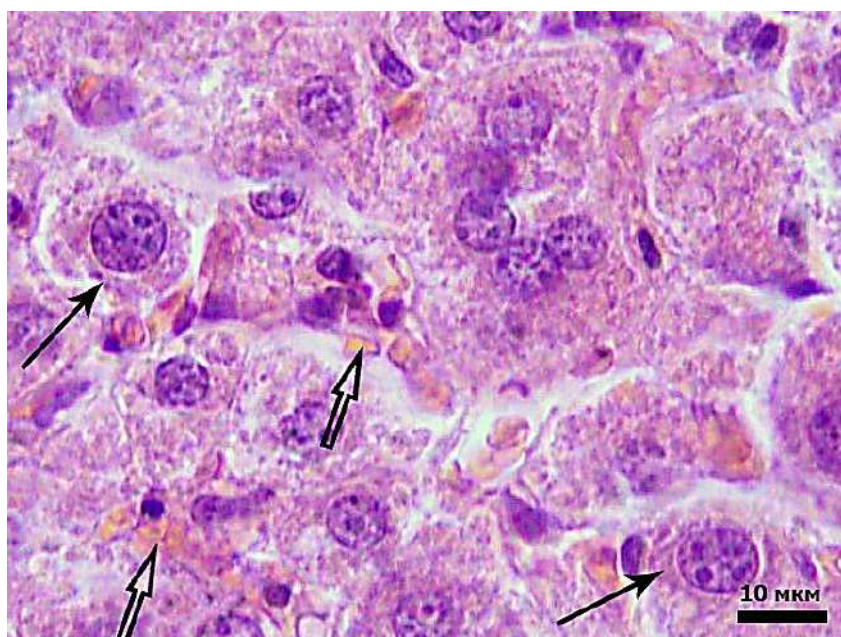


Рисунок 3.1.27 – Скопления эритроцитов в расширенных синусоидах (двойные стрелки). Умеренная гипергомоцистеинемия. Гепатоцит с крупным ядром (стрелки) Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: об. $\times 100$, ок. $\times 10$

Обобщение по главе

Содержание животных на диете, содержащей избыток метионина в течение 4 недель, инициирует развитие гипергомоцистеинемии, которая сопровождается:

- повышением уровня гомоцистеина в крови до умеренных значений ($28,9 \pm 2,65$ мкмоль/л);
- нарастанием уровня печеночных ферментов (АСТ, АЛТ), билирубина;
- развитием воспалительных изменений в крови (лейко-, грануло- и моноцитоз), повышением уровня С-реактивного белка, снижением количества эритроцитов и гемоглобина, повышением количества тромбоцитов;
- начальными изменениями липидного спектра: увеличением триглицеридов крови, тенденцией к повышению холестерина ЛПНП;
- снижением общей массы тела, массы печени и сердца, при этом их массовые коэффициенты не изменяются;
- снижением объема функциональной паренхимы (совокупной площади гепатоцитов), числа двуядерных гепатоцитов, появлением популяции клеток с крупными ядрами;
- снижением количества ядрышковых организаторов в ядре, сменой фенотипа Ag-ЯОр на малоактивный, уменьшением общего количества Ag-гранул;
- повышением экспрессии белка Ki-67 и пролиферативного индекса;
- повышением общего количества звездчатых макрофагов (Купферовских клеток), увеличением объема субпопуляции CD-68+ клеток Купфера и интенсивности их свечения;
- увеличением количества и интенсивности экспрессии маркера перисинусоидных клеток Ито;
- дилатацией микрососудов кровеносного русла печени.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии умеренной гипергомоцистеинемии на клеточные популяции печени и кровеносное микрососудистое русло органа.

ГЛАВА 3.2. ВЛИЯНИЕ МЕХАНОАКТИВАЦИИ НА СТРУКТУРУ ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ (ОРОТАТА КАЛИЯ)

3.2.1. Морфология частиц образцов оротата калия (оротовой кислоты)

Для морфологического описания частиц препарата после механоактивации были проанализированы данные, полученные при работе с атомно-силовым микроскопом. АСМ-изображения механоактивированных частиц порошков представлены на Рисунке 3.2.1, схематическое изображение – на Рисунке 3.2.2. Размеры и форму частиц исходных образцов до механообработки определяли с помощью оптического микроскопа, т.к. проведение АСМ-анализа для них было невозможно в связи с тем, что размах высот, доступный для кантелевера атомно-силового микроскопа был меньше, чем высота частиц порошков.

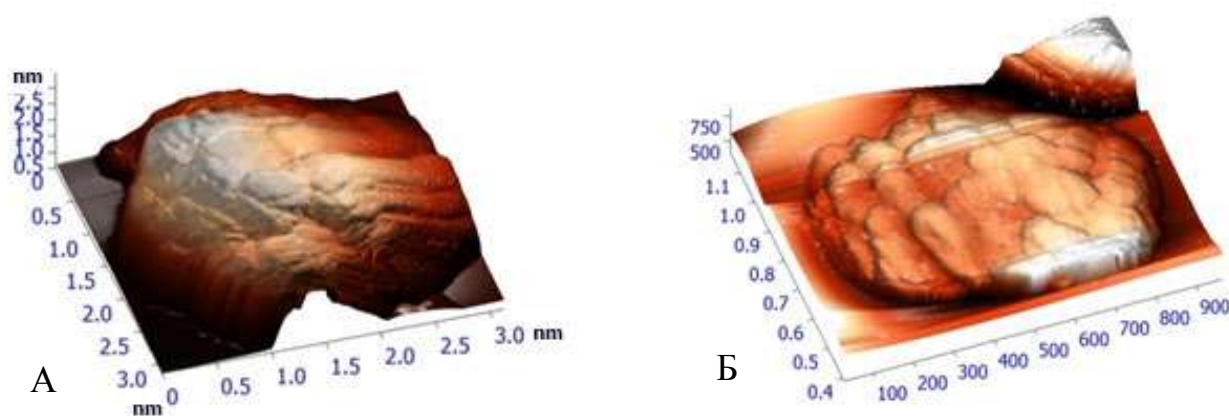


Рисунок 3.2.1 – АСМ-изображения механоактивированных порошков оротата калия. А – 1 час механоактивации, Б – 6 часов механоактивации

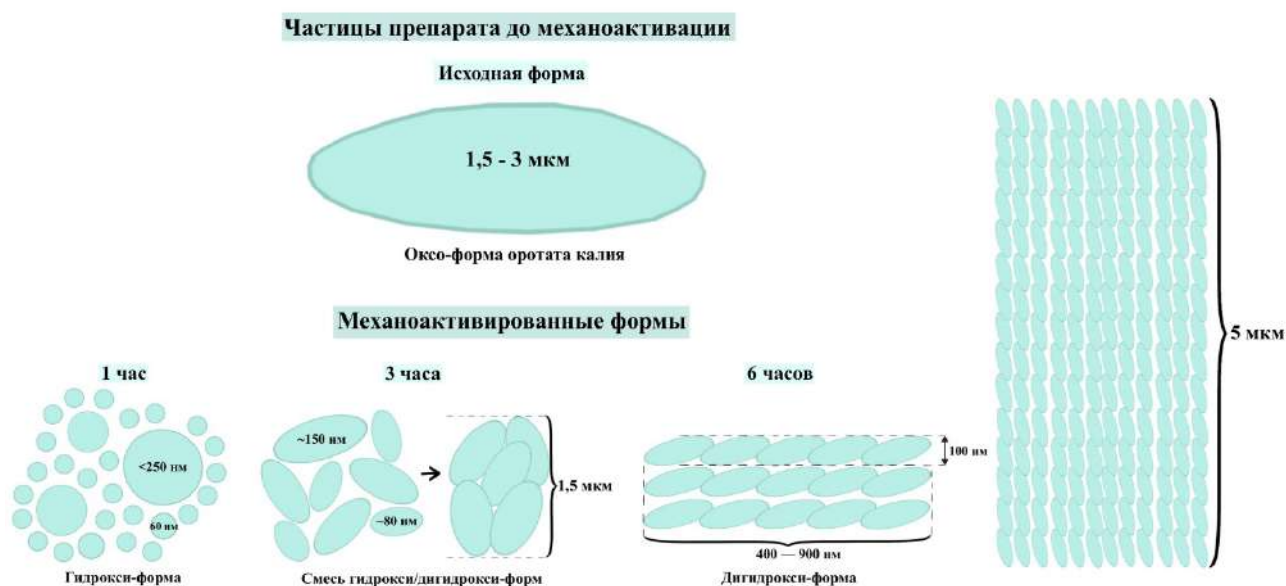


Рисунок 3.2.2 – Схематическое изображение частиц оротата калия до и после механообработки различной длительности

В исходном порошке частицы оротата калия имели камневидную форму и размер 1,5 – 3,0 мкм. После 1 часа механоактивации порошок представлял собой отдельные частицы сферической формы с преимущественным размером 60 нм. Максимальный размер отдельных крупных частиц не превышал 250 нм. Через 3 часа механоактивации (смесь гидроксид- и дигидроксид-форм оротата калия) происходило агрегирование частиц с формой эллипсоида вращения и размером 80-150 нм и формирование неустойчивых агрегатов размером до 1,5 мкм, которые разрушались при сканировании кремниевым зондом. Через 6 ч механоактивации (дигидроксид-форма оротата калия) формировались слоистые агрегаты частиц размером 5 мкм и более. Отдельные слои были собраны из частичек в форме дисков средней толщиной 100 нм и диаметром 400 – 900 нм.

3.2.2 Влияние механоактивации на химическое строение оротата калия

Рентгеноэлектронные спектры C1s-, N1s-, O1s- представлены на рисунке 3.2.3. В спектрах C1s доминировала составляющая с $E_{\text{св}} = 285,0 \pm 0,2$ эВ от атомов углерода в составе слоя углеводородов, адсорбированных на поверхности частиц

порошков $(\text{CH}_2)_n$ группы. Составляющая с $E_{\text{св}} = 286,2 \pm 0,2$ эВ относится к атомам углерода в составе с гидроксильными группами (C-OH). Гидроксильные группы присутствуют в гидрокси- и дигидроксид-формах оротата калия. Компонента с $E_{\text{св}} = 289,0 \pm 0,2$ эВ относится к атомам углерода связанного с кислородом и азотом ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$) в оксо- и гидроксид-формах оротат-анионов. В области 290,0-292,0 $\pm 0,2$ эВ наблюдались shake-up сателлиты, которые характерны для органических соединений с ароматическими связями (Beamson G., Briggs D., 1992).

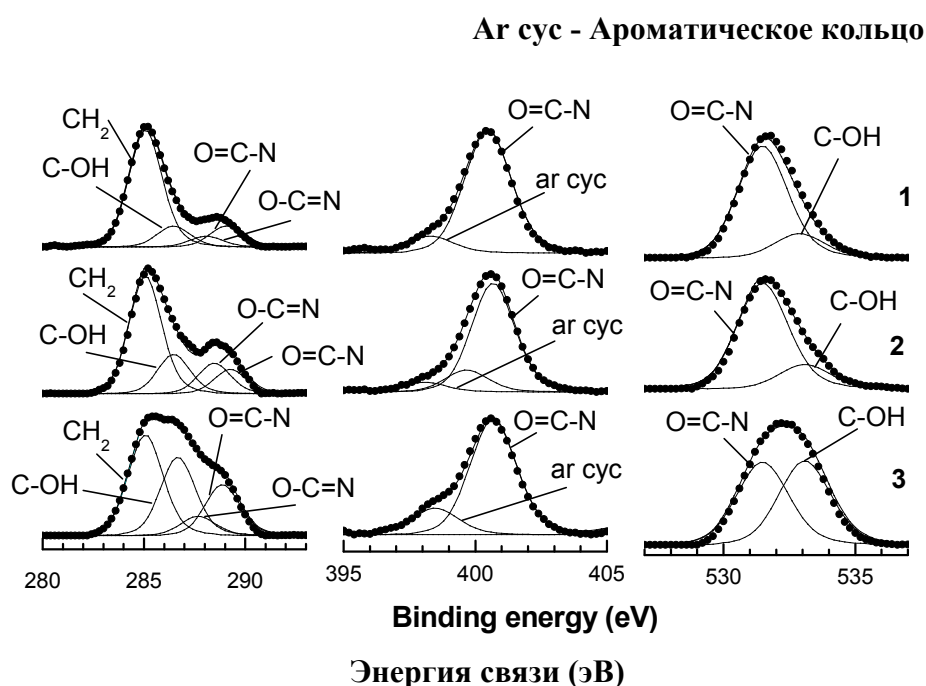


Рисунок 3.2.3 – Рентгеноэлектронные C1s-, N1s- и O1s- спектры оротата калия в исходном состоянии (1) и после механоактивации 1ч (2) и 6ч (3)

В N1s-спектрах интенсивная составляющая с $E_{\text{св}} = 400,5 \pm 0,2$ эВ может быть приписана азоту в связи $\text{NHC}=\text{O}$. Составляющие с $E_{\text{св}} = 398,4 \pm 0,2$ эВ и $E_{\text{св}} = 399,6 \pm 0,2$ эВ относятся к атомам азота в составе ароматического гетероцикла и неароматического гетероцикла, соответственно.

В O1s-спектрах выделялись компоненты от атомов кислорода в составе карбонильной ($\text{C}=\text{O}$, $E_{\text{св}} = 531,8 \pm 0,2$ эВ) и гидроксильной (C-OH, $E_{\text{св}} = 533,4 \pm 0,2$ эВ) групп.

Компонента с $E_{\text{св}}=534,2\pm0,2$ эВ относится к атомам кислорода в молекулах адсорбированной воды, а низкоэнергетичная компонента с $E_{\text{св}}=531,2\pm0,2$ эВ относится атомам кислорода, связанным с металлической подложкой, на которую помещен образец.

Сравнение N1s-спектров оротата калия (оротовой кислоты) в исходном состоянии и после механоактивации позволяет заключить, что в исходном препарате оротовая кислота находится преимущественно в оксо-форме (с незначительной примесью ароматической дигидрокси-формы). После 1ч механоактивации формируется гидрокси-форма оротовой кислоты, а после 3ч механоактивации гидрокси-форма разрушается, и в образце после 6 часов доминирует дигидрокси-форма оротат-аниона.

Таким образом, механообработка в зависимости от длительности приводит ее воздействия, приводит к изменению изомерной структуры оротат-аниона с последовательным превращением из оксо-формы, в гидрокси-форму и далее в дигидрокси-форму.

Ранее полученные результаты анализа NEXAFS-спектров оротата калия (Аксенова В.В. и др., 2014), подтверждают выводы, сделанные на основании анализа РФЭС-спектров.

3.2.3 Физико-химические свойства растворов оротата калия

Значение pH водных растворов оротатов калия уменьшалось в следующей последовательности: оксо-форма (pH 6,43) > гидрокси-форма (pH 6,2) > дигидрокси-форма (pH 5,8). Наблюдаемый эффект обусловлен сильными кислотными свойствами дигидрокси-формы оротат-аниона (которая является ОН-кислотой), а не кислотными свойствами оксо-формы (которая является NH-кислотой). Гидрокси-форма находится в промежуточном положении, так как имеет одну ОН- и одну NH-группы. При хранении в течение нескольких часов при комнатной температуре значение pH водных растворов становится равным и соответствует pH раствора оксо-формы.

Биологический ответ организма на лекарство зависит от его растворимости, всасывания, фильтрации, диффузии и др. Именно растворимость определяет распределение вещества в организме и его фармакокинетические свойства. Растворимость препаратов в водных растворах с различной кислотностью приведена в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1. – Растворимость исходного и механоактивированных порошков оротата калия в воде

Время механоактивации, ч	Форма оротат- аниона	Растворимость, г/100 г H ₂ O			
		pH 2	pH 4	pH 6,7	pH 8,6
0	оксо-	0,10	0,25	0,04	0,18
1	гидрокси-	0,10	0,26	0,06	0,24
6	дигирокси-	0,12	0,25	0,08	0,30

С ростом pH растворимость в воде изменялась немонотонно. В кислой среде (pH 2,0 соответствует кислотности желудка) растворимость механоактивированных оротатов практически не менялась. При кислотности среды pH 6,7 (диапазон нормальной кислотности слюны и среды в луковице двенадцатиперстной кишки составляет 5,6-7,9) возрастала в 1,5-2 раза по сравнению с исходным порошком оротата калия. При pH 8,6 (кислотность соответствует состоянию усиленной секреции в тонкой кишке) растворимость оротатов была выше после механоактивации в течение 1 часа на 30%, и на 70% – после механоактивации в течение 6 часов. Повышение растворимости связано с дисперсией механоактивированных порошков.

Скорость растворения исходного порошка оротата калия в воде, содержащего оксо-форму оротат-аниона, в воде с pH 6,7 составила $5,28 \pm 0,1$ мг/л/мин, механоактивированного в течение 1 часа, содержащего гидрокси-форму – $6,89 \pm 0,1$ мг/л/мин (увеличение 30,5%), механоактивированного в течение

6 часов, содержащего дигидрокси-форму – $5,83 \pm 0,1$ мг/л/мин (увеличение 10,4%) (Рисунок 3.2.4).

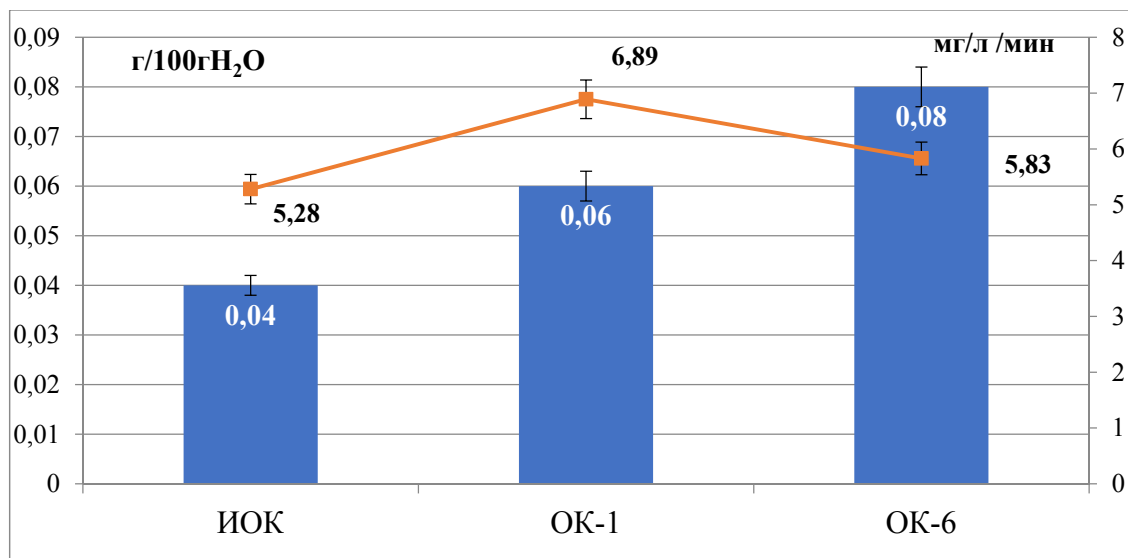


Рисунок 3.2.4 – Растворимость и скорость растворения исходного и механоактивированных порошков оротата калия в воде

ИОК – исходный оротат калия, ОК-1 – оротат калия, механоактивированный в течение 1 часа, ОК-6 – оротат калия, механоактивированный в течение 6 часов

Линия – скорость растворения, столбцы – растворимость

Увеличение растворимости и скорости растворения связаны с: уменьшением размера частиц и повышением дисперсности порошков, что обуславливает большую поверхность взаимодействия частиц с водой; наличием гидроксильной группы в гетероцикле, обеспечивающей подвижность водороду, что дает большую способность диссоциировать в водных растворах.

Для оценки способности вещества проходить через липидный слой клеточной мембраны проводилось определение растворимости оротатов в модели «октанол-вода» (Рисунок 3.2.5). Поскольку октанол (н-Октанол, ГОСТ ТУ 6-09-3506-78) по полярности и строению близок к фосфолипидной мембране, распределение в системе «октанол-вода» является удобной моделью для оценки липофильности/гидрофобности исследуемых соединений.

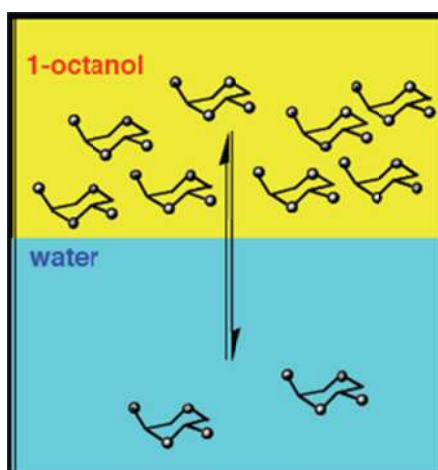


Рисунок 3.2.5 – Схема бинарной системы «октанол-вода»

Доля молекул, перешедших из водного раствора оксо-формы оротата калия в октанол составляет 18,5%, из водного раствора гидрокси-формы оротата – 27%, из водного раствора дигидрокси-формы оротата калия – 32,5%. Таким образом, растворимость в октанолу возрастает в ряду оксо-<гидрокси-<дигидрокси-форм оротата калия (Рисунок 3.2.6).

Увеличение растворимости в липидах механоактивированных порошков оротата калия обусловлено наличием ароматического гетероцикла, формированием карбонильной группы в гидрокси-форме оротовой кислоты, которая более липофильна в сравнении с карбоксильной группой.

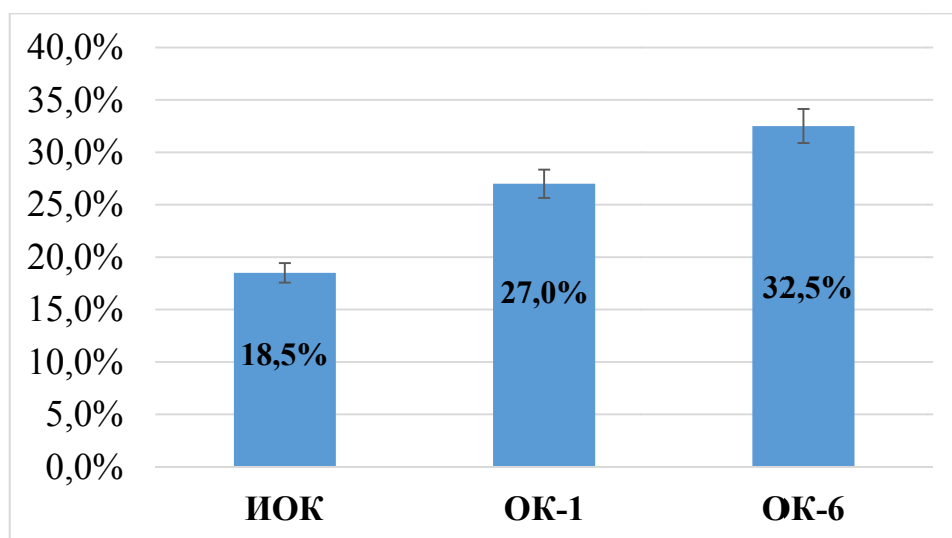


Рисунок 3.2.6 – Доля молекул оротата калия, перешедшего из водного раствора в октанол

ИОК – исходный оротат калия; ОК-1 – оротат калия, механоактивированный в течение 1 часа; ОК-6 – оротат калия, механоактивированный в течение 6 часов

Обобщая результаты вышеизложенных исследований, можно заключить следующее:

- После механоактивации возрастает дисперсность порошков оротата калия: исходный препарат < механоактивированный 1 час < механоактивированный 6 часов.
- При механоактивации происходят последовательные таутомерные превращения: оксо-форма оротат-аниона (исходный препарат) → гидроксиформа оротат-аниона (механоактивация 1 час) → дигидроксиформа оротат-аниона (механоактивация 6 часов).
- Повышается растворимость (оксо- < дигидроксиформа) и скорость растворения (оксо- < гидроксиформа) механоактивированных порошков оротата калия в воде.
- Повышается растворимость механоактивированных порошков оротата калия в октаноле: оксо- < гидроксиформа.
- Различия в химическом строении исходного и механоактивированных образцов оротата калия сохраняются в эксикаторе при комнатной температуре в течение нескольких месяцев, после чего обе механомодифицированные формы превращаются в исходную оксо-форму.

ГЛАВА 3.3. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТАУТОМЕРНЫХ ФОРМ ОРОТАТ-АНИОНА (ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ) НА ОРГАНИЗМ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С УМЕРЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

3.3.1. Биохимические пробы печени и цитологические показатели крови

Уровень гомоцистеина в крови после коррекции гипергомоцистеинемии препаратами оротата калия снижается во всех группах экспериментальных животных независимо от формы введенного таутомера и составляет (мкмоль/л): $20,2 \pm 2,01$ (оксо-форма), $15,6 \pm 1,45$ (гидрокси-форма), $16,2 \pm 1,06$ (дигидрокси-форма).

Данные анализов крови, отражающие биохимический спектр крови животных, получавших оротовую кислоту, представлены в Таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Уровни маркерных ферментов печени и билирубина экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

Показатели	АЛТ	АСТ	БЛБ общий	БЛБ прямой	ЩФ
Единицы измерения	ед/л	ед/л	мг/дл	мкмоль/л	мккат/л
Оксо-форма оротовой кислоты	$43,5 \pm 4,5$	$172,5 \pm 15,16$	$3,44 \pm 0,87$	$1,45 \pm 0,56$	$5,18 \pm 0,30$
Гидрокси-форма оротовой кислоты	$36,5 \pm 8,69$	$119,5 \pm 2,69^*$	$2,86 \pm 0,56$	$1,64 \pm 0,58$	$4,23 \pm 0,31$
Дигидрокси- форма оротовой кислоты	$30,5 \pm 5,5^*$	$143,0 \pm 2,16^{* \#}$	$3,43 \pm 1,01$	$1,65 \pm 0,18$	$4,98 \pm 0,30$

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

АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, БЛБ – билирубин, ЩФ – щелочная фосфатаза

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.

Внутригрупповые различия по исследованным показателям биохимического спектра печеночных ферментов касались аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы. По АЛТ различия составляли между оксо-формой и гидроксид-формой – 19,2%, оксо-формой и дигидроксид-формой 42,6%; по АСТ – 44,3% и 20,6%, соответственно ($p < 0,05$). Сравнительная диаграмма с данными количества ферментов в группе контроля и умеренной ГГЦ представлена на Рисунке 3.3.1.

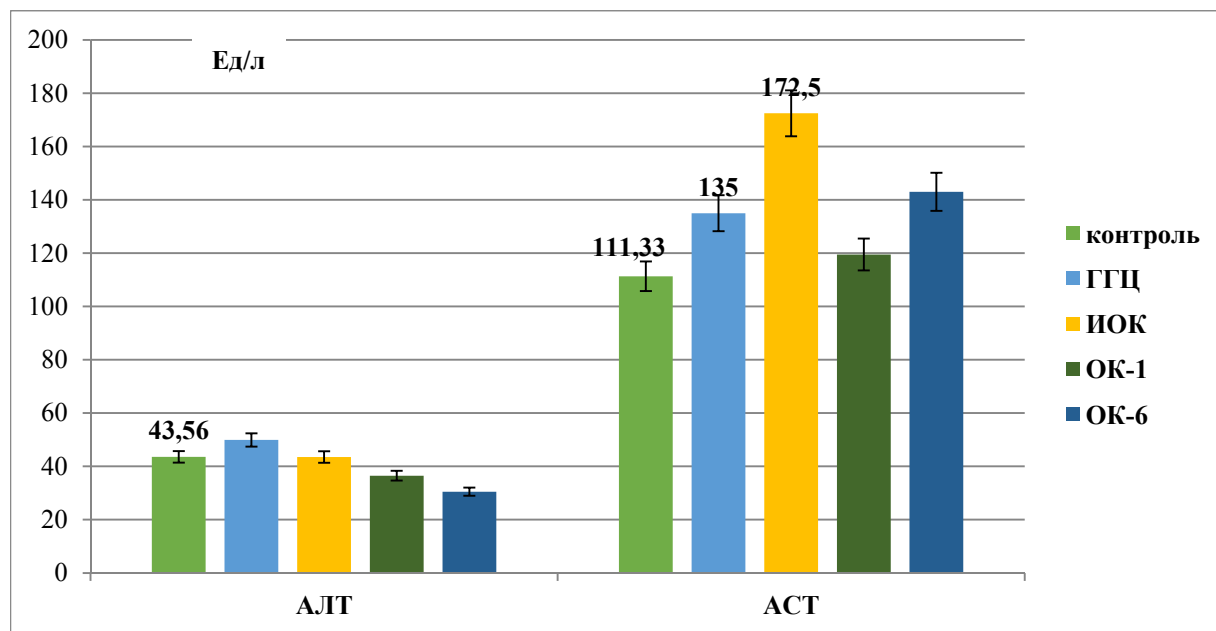


Рисунок 3.3.1. – Уровни ферментов печени в экспериментальных группах

Обозначения: АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Из диаграммы видно, что при сравнении экспериментальных групп между собой наиболее выраженные различия касаются фермента аспаргатаминотрансферазы, количество которого в группе, получавшей исходную форму оротата, не только не уменьшалось, но даже увеличивалось (в 1,28 раза, $p=0,023$) по сравнению с данными, полученными в группе животных с умеренной формой ГГЦ. Наиболее близки к контрольным показателям были данные в группе животных, получавших гидрокси-форму оротовой кислоты: $111,33 \pm 3,84$ (контроль) vs $119,5 \pm 6,84$ (гидрокси-форма) ед/л.

Данные липидного спектра в экспериментальных группах, получавших различные таутомеры оротовой кислоты представлены в Таблице 3.3.2.

Таблица 3.3.2 – Показатели липидного спектра крови экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

А

Интервальные значения показателей

Показатель (ммоль/л) Форма оротат-аниона	Триглицериды	Общий холестерин	Холестерин ЛПВП	Холестерин ЛПНП
Оксо-форма	0,48 – 1,99	1,3 – 2,4	0,78 – 0,82	0,46 – 0,65
Гидрокси-форма	0,37 – 0,66	1,18 – 2,0	0,6 – 0,93	0,43 – 0,79
Дигидрокси-форма	0,37 – 0,81	1,1 – 1,8	0,41 – 0,7	0,39 – 0,55

Б

Средние показатели

Показатель (ммоль/л) Форма оротат-аниона	Триглицериды	Общий холестерин	Холестерин ЛПВП	Холестерин ЛПНП	Индекс атерогенности (у.е.)
Оксо-форма	$1,24 \pm 0,76$	$1,85 \pm 0,55$	$0,81 \pm 0,10$	$0,56 \pm 0,05$	$1,28 \pm 0,24$
Гидрокси-форма	$0,51 \pm 0,14$ *	$1,57 \pm 0,15$	$0,77 \pm 0,16$	$0,61 \pm 0,18$	$1,06 \pm 0,09$ *
Дигидрокси-форма	$0,53 \pm 0,09$ *	$1,33 \pm 0,13$	$0,55 \pm 0,08$ *	$0,50 \pm 0,05$	$1,31 \pm 0,27$

Примечание: * – различия данных достоверны в сравнении между группами с введением механоактивированных препаратов (гидрокси- и дигидрокси-формы оротат-аниона) и данными в группе с введением оксо-формы оротовой кислоты при $p < 0,05$

Из данных таблицы видно, что показатели, отражающие количество триглицеридов, общего холестерина, холестерина ЛПВП отличаются в группах между собой. При введении механомодифицированных форм оротовой кислоты они ниже, чем при введении исходной формы (оксо-форма) ОК, не подвергавшейся механообработке. Так, в экспериментальной группе после введения оксо-таутомера оротата калия 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 в группах с введением гидроксид- и дигидроксид-форм, соответственно ($p < 0,05$). Количество холестерина ЛПВП было сравнимо в группах с введением оксо- и гидроксид-форм ОК, тогда как у животных, которым коррекция проводилась с применением дигидроксид-формы оротовой кислоты, ЛПВП были снижены на 30%, что отразилось на индексе атерогенности, который был наиболее высок в этой группе и значительно отличался от первых двух групп.

Сравнивая данные интактного контроля, группы с умеренной ГГЦ и групп с введением таутомеров оротата калия (Рисунок 3.3.2) следует отметить, что, во-первых, количество триглицеридов и ОХС при получении оксо-формы ОК не только не снижалось, но даже увеличивалось как в сравнении с интактным контролем, так и с группой умеренной ГГЦ. Во-вторых, холестерин ЛПВП был ниже данных исходного контроля и умеренной ГГЦ в группе с введением дигидроксид-формы ОК. В-третьих, индекс атерогенности увеличивался при введении таутомеров не только в сравнении с исходным контролем, но и с группой умеренной ГГЦ: при введении оксо-формы и дигидроксид-формы – в 1,5 раза ($p = 0,04$), гидроксид-формы – 1,2 раза ($p = 0,031$).

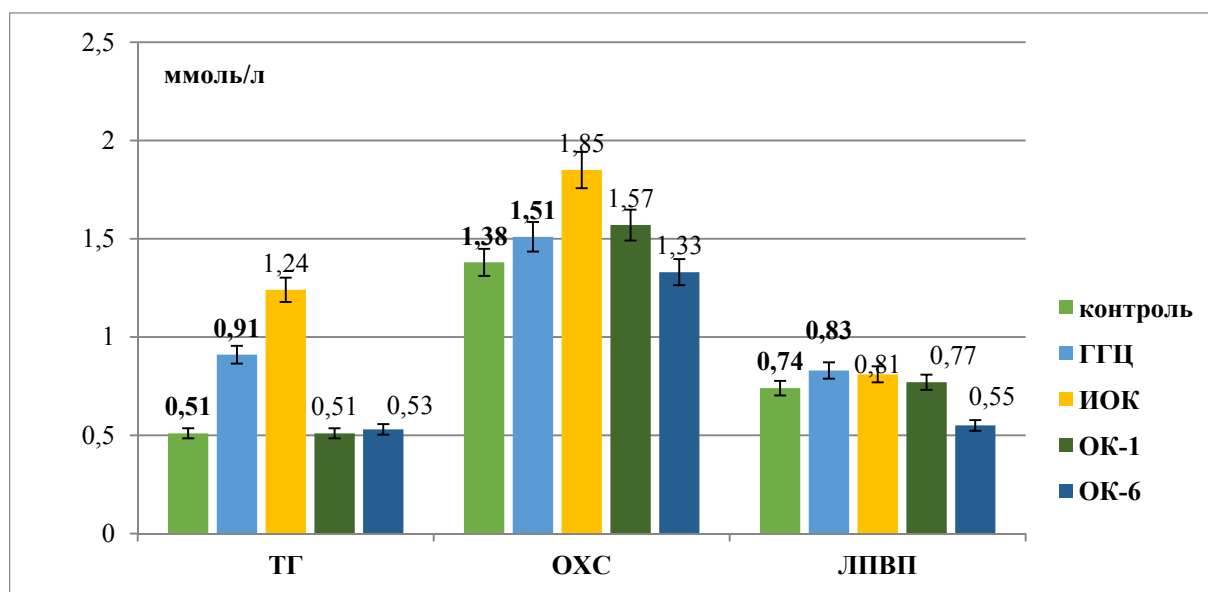


Рисунок 3.3.2 – Показатели липидного спектра в экспериментальных группах
 Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Таким образом, введение таутомеров оксо- и дигидроксид-форм оротовой кислоты для коррекции умеренной ГГЦ не только не улучшает, но даже ухудшает показатели липидного профиля. Исключение составляет группа с введением гидроксид-таутомера, показатели которой наиболее близки к данным интактного контроля.

В Таблице 3.3.3 представлены данные цитологических показателей крови у животных, получавших таутомеры оротовой кислоты, на Рисунке 3.3.3 – сравнительный анализ данных с контрольными данными и группой умеренной ГГЦ.

Таблица 3.3.3 – Цитологических показатели белой крови экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

А

Интервальные значения показателей для показателей белой крови

Показатель Форма оротат-аниона	Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	Гранулоциты ($10^9/\text{л}$)	Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	Моноциты ($10^9/\text{л}$)
Оксо-форма	11,9 – 21,2	2,7 – 8,8	6,3 – 10,1	1,3 – 8,8
Гидрокси-форма	9,0 – 13,8	1,5 – 4,0	4,5 – 9,2	0,6 – 2,8
Дигидрокси-форма	9,4 – 22,1	1,8 – 8,6	6,5 – 17,4	1,3 – 4,3

Б

Средние значения показателей

Форма оротат-аниона Показатели	Оксо-форма	Гидрокси-форма	Дигидрокси-форма
WBC ($10^9/\text{л}$)	16,62±2,3	10,02±1,09*	18,25±2,62#
Gran ($10^9/\text{л}$)	7,8±2,03	2,54±0,39*	4,82±1,34*#
Lymph ($10^9/\text{л}$)	6,96±0,98	6,8±1,04	11,9±2,08*#
Mon ($10^9/\text{л}$)	2,99±0,99	1,7±0,36	2,01±0,51
RBC ($10^{12}/\text{л}$)	6,35±0,91	7,04±0,38	7,05±0,32
НВ (г/л)	123,4±13,78	132,0±1,4	129,0±4,24
НСТ (%)	0,37±0,02	0,39±0,006	0,27±0,07*#
PLT ($10^9/\text{л}$)	607,0±146,76	657,25±72,78	900,5±176,07*
MCV (фл)	57,8±1,32	56,5±0,87	55,25±0,63
MCH (пг)	19,6±0,74	18,78±0,45	17,05±1,79
RDW (фл)	16,3±0,41	15,73±0,34	17,35±0,66
MPV (фл)	6,16±0,4	5,83±0,24	6,35±0,68
PDW (фл)	11,12±0,97	11,3±1,35	7,58±2,21*#

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

Наблюдалась статистически значимая разница 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 = 0,772; гранулоцитов: $F(2, 41) = 48,843$, $p = 0,001$, частичная эта-квадрат = 0,720; лимфоцитов: $F(2, 41) = 91,010$, $p = 0,001$; частичная эта-квадрат = 0,827; гематокрита: $F(2, 41) = 26,475$, $p = 0,001$; частичная эта-квадрат = 0,582; тромбоцитов: $F(2, 41) = 17,800$, $p = 0,001$; частичная эта-квадрат = 0,484.

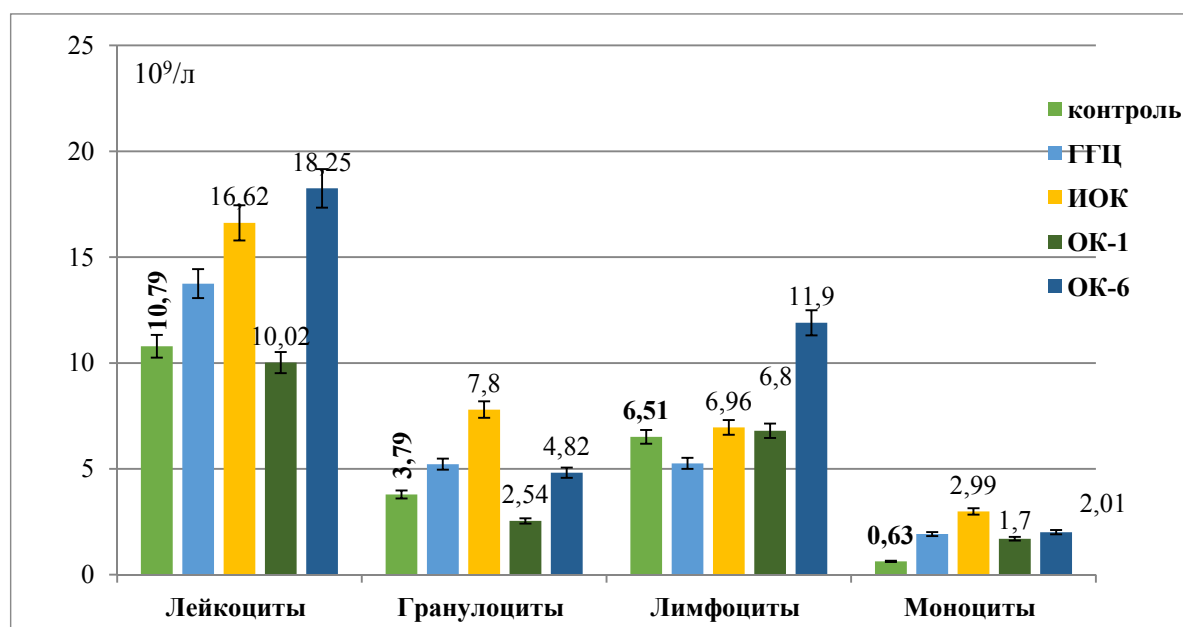


Рисунок 3.3.3 – Показатели белой крови в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

На Рисунке 3.3.3 данные представлены включая интактную группу животных. Из диаграммы видно, что 1) наиболее близки к показателям интактного контроля данные, полученные после введения крысам препарата в форме гидроксид-таутомера оротат-аниона, механомодифицированного в течение 1 часа. 2) Ни в одной из экспериментальных групп с введением таутомеров не

восстанавливается до исходных (контрольных) значений объем популяции моноцитов, количество их остается выше контрольных значений.

Обобщая данные по влиянию таутомерных форм оротовой кислоты на показатели белой крови, эффективность их действия при введении в организм животных на фоне умеренной гипергомоцистеинемии можно представить следующей последовательностью: гидроксид-форма > оксид-форма > дигидроксид-форма.

Ранее мы отмечали, что при умеренной гипергомоцистеинемии значимые отличия в составе красной крови касались: количества эритроцитов (они снижались на 17,93%, $p < 0,05$), уровня гемоглобина (был снижен на 8,3%, $p < 0,05$), числа тромбоцитов (были повышены на 41,4%, $p < 0,05$) (Таблица 3.1.5). В ответ на введение таутомерных форм оротовой кислоты во всех экспериментальных группах количество эритроцитов и гемоглобина выравнивается и становится сопоставимым с данными контрольной группы животных, тогда как количество тромбоцитов восстанавливается только после применения исходной оксид- и гидроксид-форм ОК, но не после введения дигидроксид-формы (Рисунок 3.3.4).

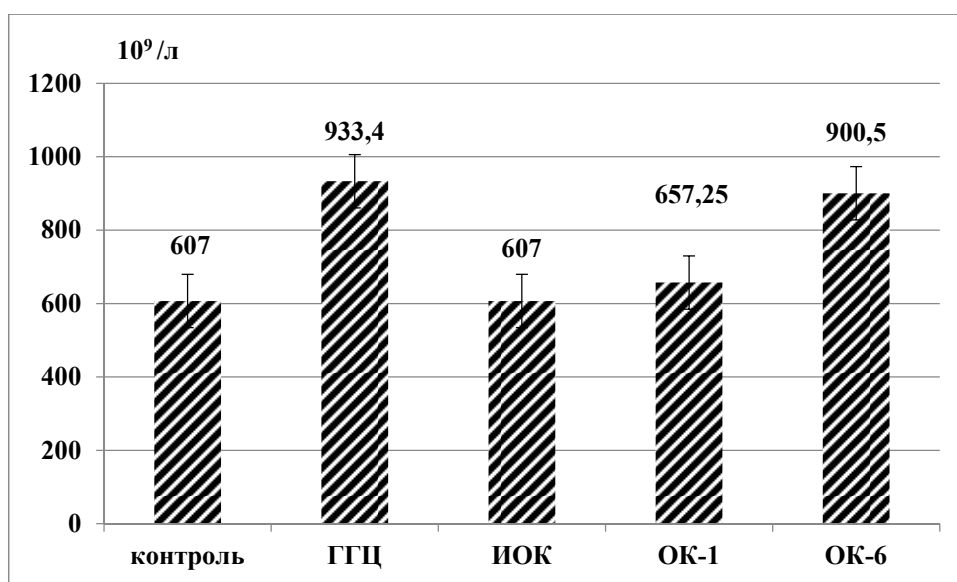


Рисунок 3.3.4 – Количество тромбоцитов в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксид-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

3.3.2. Морфометрическая характеристика клеточных популяций печени

Морфометрические данные, отражающие характеристики гепатоцитов, представлены в Таблице 3.3.4.

Таблица 3.3.4 – Морфометрические характеристики гепатоцитов экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

Форма оротат-аниона Показатели	Оксо-форма	Гидрокси-	Дигидрокси- форма
Площадь гепатоцита (мкм ²)	240,08±2,88	238,21±4,63	249,59±7,86
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	193,99±2,85	187,84±4,78	180,33±8,11*
Площадь ядра (мкм ²)	46,09±0,74	50,37±1,40	51,65±2,27
Диаметр ядра, мкм	7,74±0,21	7,52±0,11	9,06±0,23*#
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,251±0,007	0,293±0,015	0,324±0,02*
Количество гепатоцитов на площадь среза 100 мкм ²	304,9±10,11	378,5±7,4*	389,0±17,19*
Площадь, занимаемая функциональной паренхимой (на 100 мкм ²)	73200,4±118,7	90138,31±125,4*	97090±112,8*#
Количество ядер на площадь среза (100 мкм ²)	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*
Совокупная площадь ядерного материала гепатоцитов на 100 мкм ²	14875,09±219,5	20445,18±304,2*	22393,89±287,6*

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

По результатам статистического анализа MANOVA наблюдалась статистически значимая разница в параметрах клетки в зависимости от группы $F(12, 1638) = 17,646$, $p < 0,0001$; След Пиллаи = 0,343, частичная эта-квадрат = 0,114.

Введение таутомеров оротовой кислоты сопровождалось восстановлением количества гепатоцитов, рассчитываемых на поле зрения, и составляло от плотности расположения клеток в контрольной популяции: при введении исходной формы оротат-аниона – 68,0%, гидроксиформы – 84,5%, дигидроксиформы – 86,8%. Ранее было показано, что популяция гепатоцитов при умеренной ГГЦ представлена в основном клетками среднего и мелкого размера (Таблица 3.1.7). Так, если в контроле доля крупных клеток (размеры составляют от 490 до 654 мкм²) 11%, средних (327 – 489 мкм²) – 54% и мелких (163 – 326 мкм²) – 35%. При умеренной ГГЦ это соотношение было представлено: 0% (крупные) : 34% (средние) : 66% (мелкие), т.е. отсутствовал класс крупных гепатоцитов. При введении животным оротовой кислоты в форме гидроксиформы либо дигидроксиформы соотношение классов практически оставалось неизменным. Незначительное восстановление популяции клеток с крупными размерами отмечалось только в группе с введением дигидроксиформы (до 2,02%), хотя и не достигало показателей интактного контроля: 2%:13%:85% крупные:средние:мелкие клетки, соответственно.

Ранее было отмечено, что средняя площадь цитоплазмы клеток печени при умеренной ГГЦ снижается на 55,1%. Введение препаратов оротовой кислоты достоверно не сказывалось на изменении этого параметра и также оставалось ниже показателей интактного контроля. Площадь ядра гепатоцитов восстанавливалась до параметров интактного контроля только у групп с введением механоактивированных препаратов, и оставалась достоверно ниже у животных при применении исходной оксо-формы оротат-аниона (Рисунок 3.3.5).

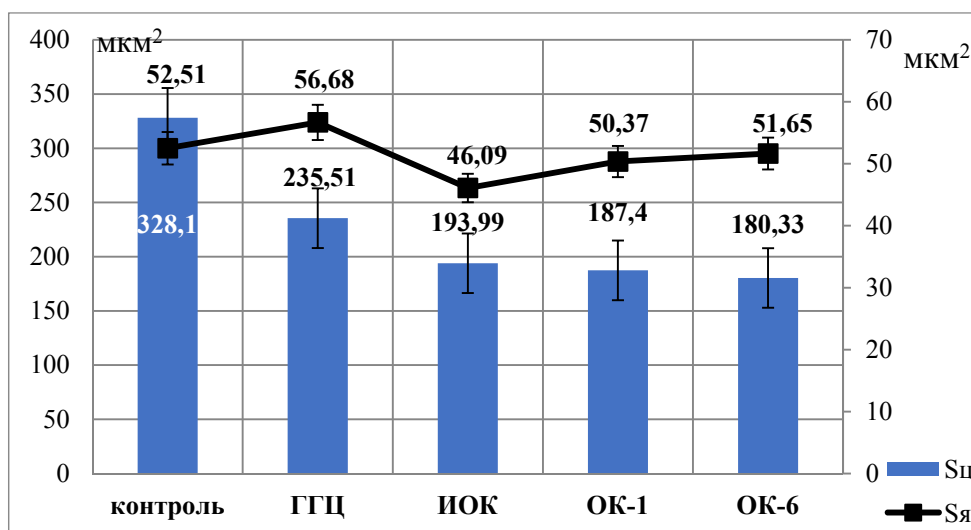


Рисунок 3.3.5 – Площади цитоплазмы и ядра в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Sc – площадь цитоплазмы гепатоцита; Sя – площадь ядра гепатоцита

Совокупная площадь функциональной паренхимы увеличивалась в группах с применением механомодифицированных препаратов (Рисунок 3.3.6).

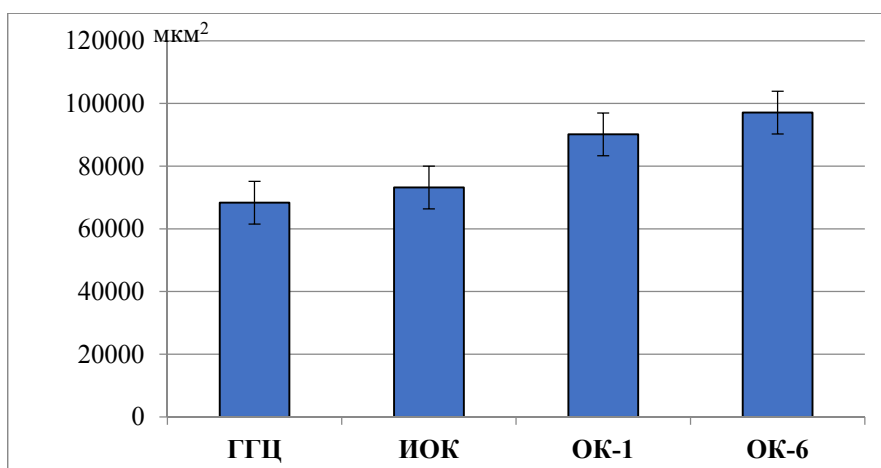


Рисунок 3.3.6 – Площадь функциональной паренхимы (μm²) в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Количество ядер, рассчитываемых на площадь среза (100 мкм^2) при введении различных форм оротовой кислоты, возрастало в сравнении с группой умеренной ГГЦ, но оставалась ниже, чем в интактном контроле. При сравнении групп между собой, этот количественный показатель в группе с исходной формой оротат-аниона ОК был достоверно ниже по сравнению с группами, которым вводились механомодифицированные препараты. Совокупная площадь ядерного материала увеличивалась в сравнении с группой умеренной ГГЦ только при введении механомодифицированных препаратов (Рисунок 3.3.7). Из полученных данных следует, что введение оротовой кислоты сопровождалось, главным образом, влиянием на ядерный аппарат клетки, размеры цитоплазмы гепатоцитов не восстанавливались.

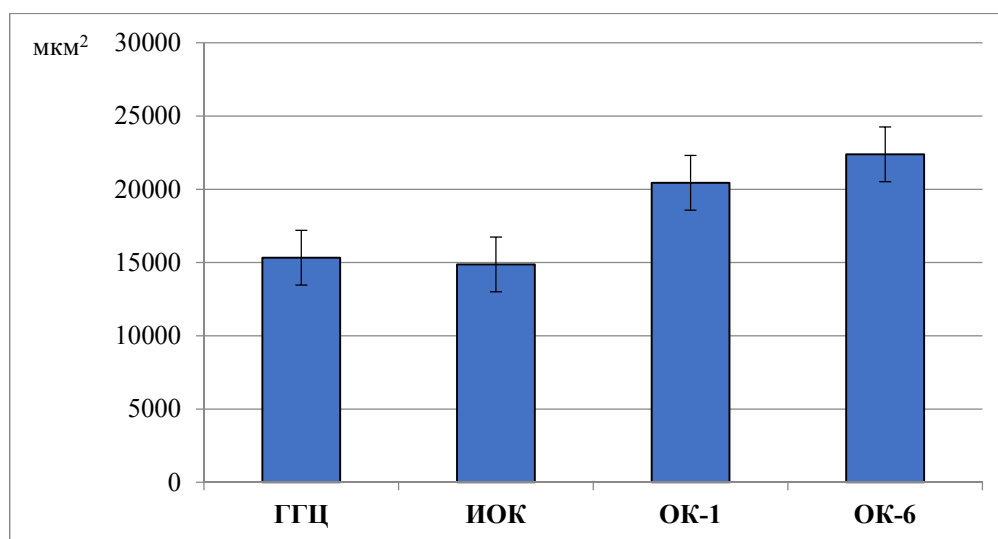


Рисунок 3.3.7 – Совокупная площадь ядерного материала (в 100 мкм^2) в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Введение препаратов оротовой кислоты оказывало выраженное действие на ядрышко-аппарат клетки, регистрируемого по изменениям области Ag-ЯОр. Морфологические изменения ядрышкового организатора в экспериментальных группах животных, получавших препараты оротовой кислоты, представлены в таблице 3.3.5.

Таблица 3.3.5. Морфометрические характеристики области ядрышкового организатора гепатоцитов экспериментальных животных после введения таутомерных форм оротовой кислоты

Форма оротат-аниона	Оксо-форма	Гидрокси-форма	Дигидрокси-форма
Параметры Ag-ЯОр			
Количество Ag-ЯОр / ядро (шт.)	3,421±0,2*	3,156±0,13*	3,306±0,14*
Совокупная площадь Ag-ЯОр на одно ядро (мкм ²)	19,74±0,07*	17,11±0,16*	27,6±1,25* #
Доля ядер, содержащих 1-3 Ag-ЯОр (%)	47,2±4,78*	61,47±2,45* #	61,3±4,32* #
Доля ядер, содержащих 4-6 Ag-ЯОр (%)	52,5±4,11*	38,53±1,95* #	37,1±4,20* #
Доля полинуклеолярных ядер, содержащих 7 и более Ag-ЯОр (%)	0	0	1,6±0,009* #
Фенотипы Ag-ЯОр (%)			
Нуклеолонемный	86,15±5,06	74,26±4,32 #	79,02±5,84
Компактный	7,69±0,45*	18,81±2,10 #	19,02±2,41 #
Микро-Ag-ЯОр	6,16±0,63*	6,94±0,89*	1,95±0,05 #
Активные фенотипы Ag-ЯОр	93,84±7,87	93,07±8,84	98,04±7,12
Расположение Ag-ЯОр в ядре (%)			
Центральное	17,69±1,20*	6,44±0,06* #	10,73±0,09 #
Эксцентричное	53,85±7,53	49,5±1,24	63,9±2,39*
Прилежащее к кариолемме	30,0±3,03	43,56±2,56 #	25,85±1,06*
Гранулярный компонент Ag-ЯОр (шт.)			
Общее количество гранул/ Ag-ЯОр	3,27±0,68*	2,95±0,74*	2,81±0,65*
Интрануклеолярные гранулы	3,11±0,54*	2,79±0,51*	2,71±0,68*
Экстрануклеолярные гранулы	0,15±0,02*	0,16±0,01*	0,10±0,03*

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с группой гипергомоцистеинемии; # – с группой, получавшей оксо-форму оротовой кислоты (p<0,05).

Ag-ЯОр – ядрышкового организатора

Среднее количество Ag-ЯОр во всех группах с ведением таутомеров ОК было сравнимо между собой (Таблица 3.3.5) и увеличено в сравнении с группой умеренной ГГЦ (Таблица 3.1.9). Все же этот показатель, хотя и увеличивался, но не достигает интактного контроля, составляя от нормы $\sim 75\%$. Совокупная площадь Ag-ЯОр на одно ядро в группах с введением оксо- и гидрокси-формы не изменялась в сравнении с показателями при умеренной ГГЦ. Незначительно увеличивалась площадь Ag-ЯОр при введении дигидрокси-формы, хотя и в этой группе не достигала показателей интактного контроля, составляя 61,23% от исходных цифр. Доля полинуклеолярных ядер относительно данных в группе умеренной ГГЦ в целом повышалась при введении таутомеров ОК (в 2,5, 1,86 и 1,77 раз при ИОК, ОК-1 и ОК-6, соответственно), составляя не более 72% от интактного контроля. Ядрышки чаще располагались вблизи кариолеммы (за исключением группы с введением дигидрокси-формы оротовой кислоты), что может способствовать повышению скорости транспорта рибосомных частиц в цитоплазму. Увеличивалось, в сравнении с группой умеренной ГГЦ количество гранулярной составляющей в Ag-ЯОр. Так, общее количество гранул было выше в сравнении с группой умеренной ГГЦ в 2,02 раз при введении оксо-таутомера, в 1,82 раз – при введении гидрокси-формы, и в 1,73 раза – при введении дигидрокси-формы оротат-аниона ($p < 0,05$). В группе с введением дигидрокси-формы оротат-аниона оказалась несбалансированной гранулярная составляющая ядрышкового организатора. Так, в этой группе соотношение интрануклеолярных и экстрануклеолярных гранул (индекс интра/экстра, который дает представление об интенсивности ядерно-нуклеоплазматического транспорта субъединиц рибосом) оставалось сравнимым с данными, полученными при умеренной ГГЦ. Наиболее близок этот показатель к данным интактного контроля был только в группе с ведением гидрокси-формы препарата ОК. Индекс интра/экстра составляет, соответственно: 16 (контроль): 26 (умеренная ГГЦ): 21 (введение ИОК): 17 (введение ОК-1): 27 (введение ОК-6).

Обобщая полученные данные по характеристике ядрышкового организатора ядер гепатоцитов, можно сделать следующие выводы. Во-первых, было выявлено улучшение большинства морфометрических показателей Ag-ЯОр в группах с введением различных форм оротат-аниона независимо от варианта таутомерной

структуры. Однако в группе с введением дигидрокси-формы оротовой кислоты нуклеолы не контактировали с кариолеммой, в ядрах гепатоцитов этой группы животных оставалась низкой доля неактивных ядер (также, как в группе с умеренной ГГЦ), оставался несбалансированным гранулярный компонент ядрышка. Следовательно, эффективность действия различных таутомеров на ядрышковый аппарат клеток можно представить последовательностью: оксо-~гидрокси->дигидрокси-формы.

В главе 3.1 было показано, что при формировании умеренной ГГЦ в клетках печени в 1,68 раз повышалось количество Ki-67 положительных клеток, индекс пролиферативной активности на этом фоне возрастал в 2,9 раза (Таблица 3.1.9). Введение таутомеров оротовой кислоты снижало как число Ki-67 положительных клеток, так и пролиферативный индекс (Таблица 3.3.6). Причем индекс пролиферативной активности выравнивался до уровня исходных (контрольных) значений.

При оценке введения различных таутомеров оротовой кислоты между группами наблюдалась статистически значимая разница, определяемая по однофакторному ANOVA: $F(4,750) = 79,994$, $p = 0,0001$.

Таблица 3.3.6 – Количество Ki-67 позитивных клеток (шт/поле зрения) и интенсивность их свечения (в поле зрения, у.е.) в группах с введением таутомеров оротовой кислоты

Форма оротат-аниона	Оксо-форма	Гидрокси-форма	Дигидрокси-форма
Показатели			
Количество Ki-67	6,0±0,26	26,0±4,24*	27,33±1,53*
Интенсивность экспрессии белка	29,516±3,15	41,094±1,24*	35,713±0,76*
Пролиферативный индекс	0,02±0,005	0,09±0,009*	0,07±0,006*

* – различия достоверны в сравнении с оксо-формой препарата при $p < 0,05$

Распределение гистохимического продукта в клетках и интенсивность свечения представлены на рисунках 3.3.8, 3.3.9, 3.3.10. Количество гепатоцитов, содержащих белок Ki-67, в группе животных, получавших оксо-форму оротовой кислоты, было

невысоким, интенсивность экспрессии гистохимического продукта реакции незначительна (Рисунок 3.3.8). Количество Ki-67-позитивных клеток при введении оксо-формы было ниже данных интактного контроля. При введении крысам гидрокси-формы оротат-аниона уровень экспрессии белка Ki-67 был наиболее высоким (Рисунок 3.3.9), показатели, полученные в группе животных с введением дигидрокси-формы оротат-аниона занимали промежуточное положение (Рисунок 3.3.10).

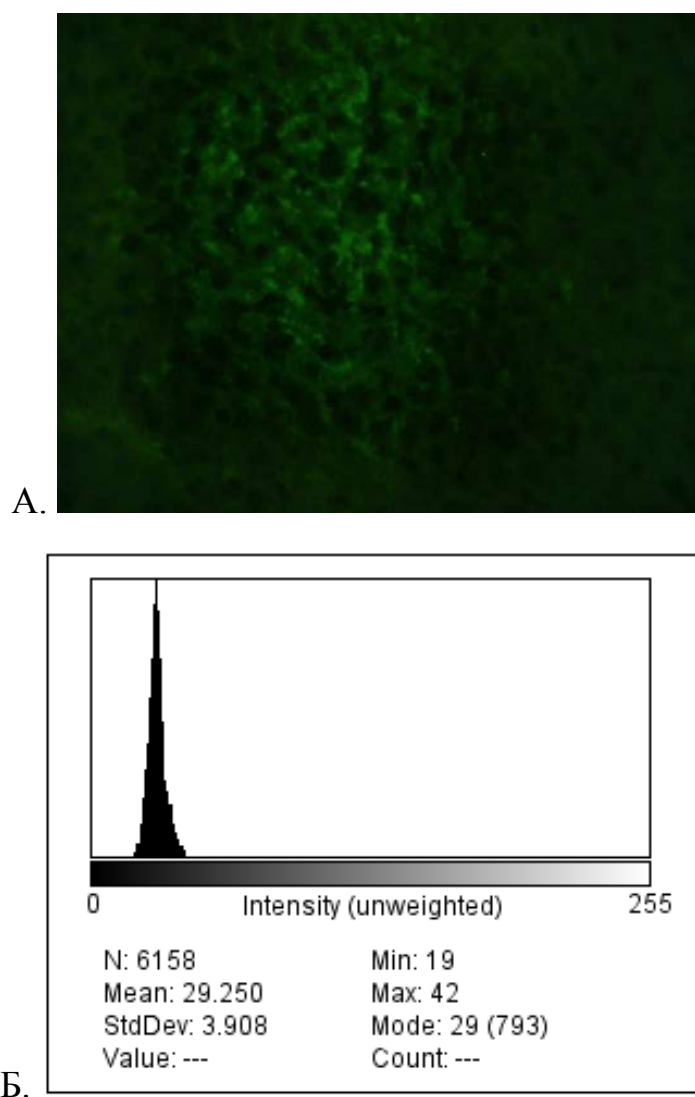


Рисунок 3.3.8 – А) Популяция гепатоцитов, содержащая белок Ki-67 в группе животных, получавших оксо-форму оротовой кислоты. Количество клеток незначительно, интенсивность экспрессии слабая. Иммуногистохимическая окраска с антителами к Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с Alexa Fluor 488. Увеличение: об.×40, ок.×10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

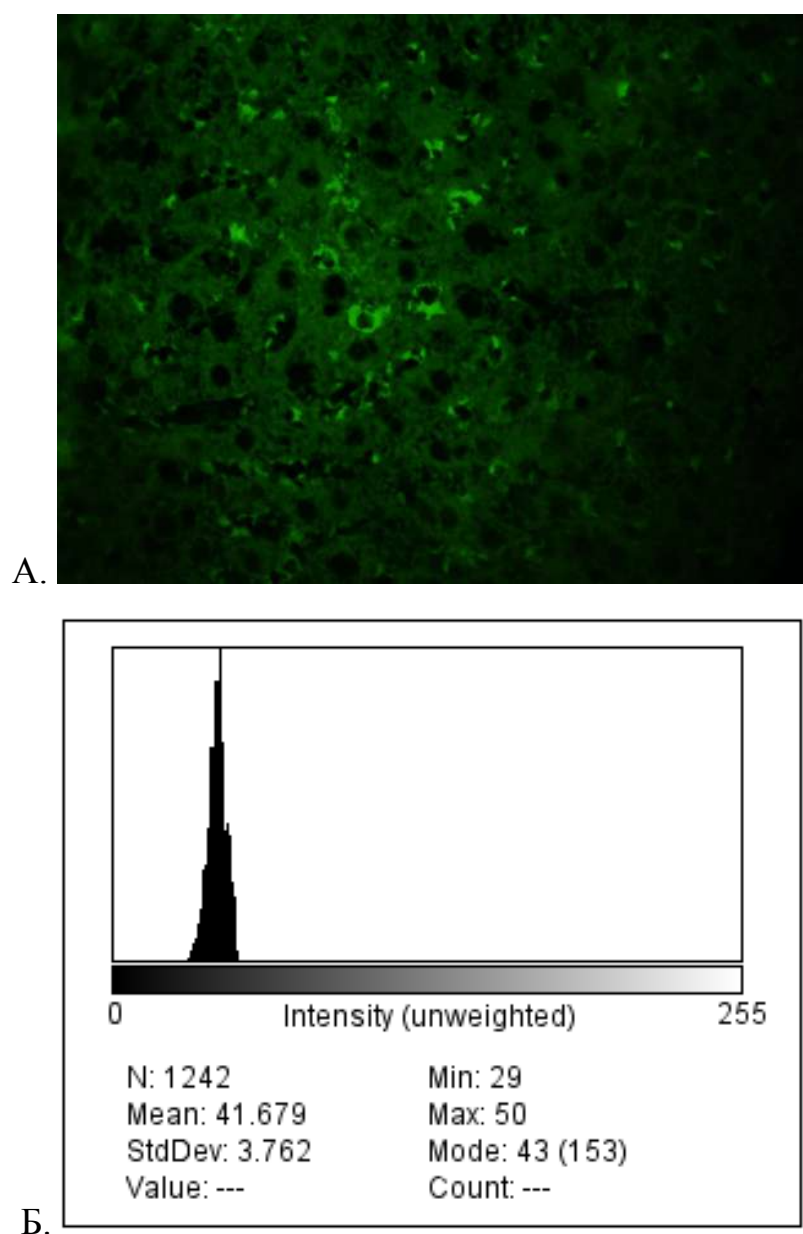


Рисунок 3.3.9 – А) Популяция гепатоцитов, содержащая белок Ki-67 в группе животных, получавших гидрокси-форму оротовой кислоты. Активная экспрессия продукта реакции. Иммуногистохимическая окраска с антителами к Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с Alexa Fluor 488. Увеличение: об.×40, ок.×10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

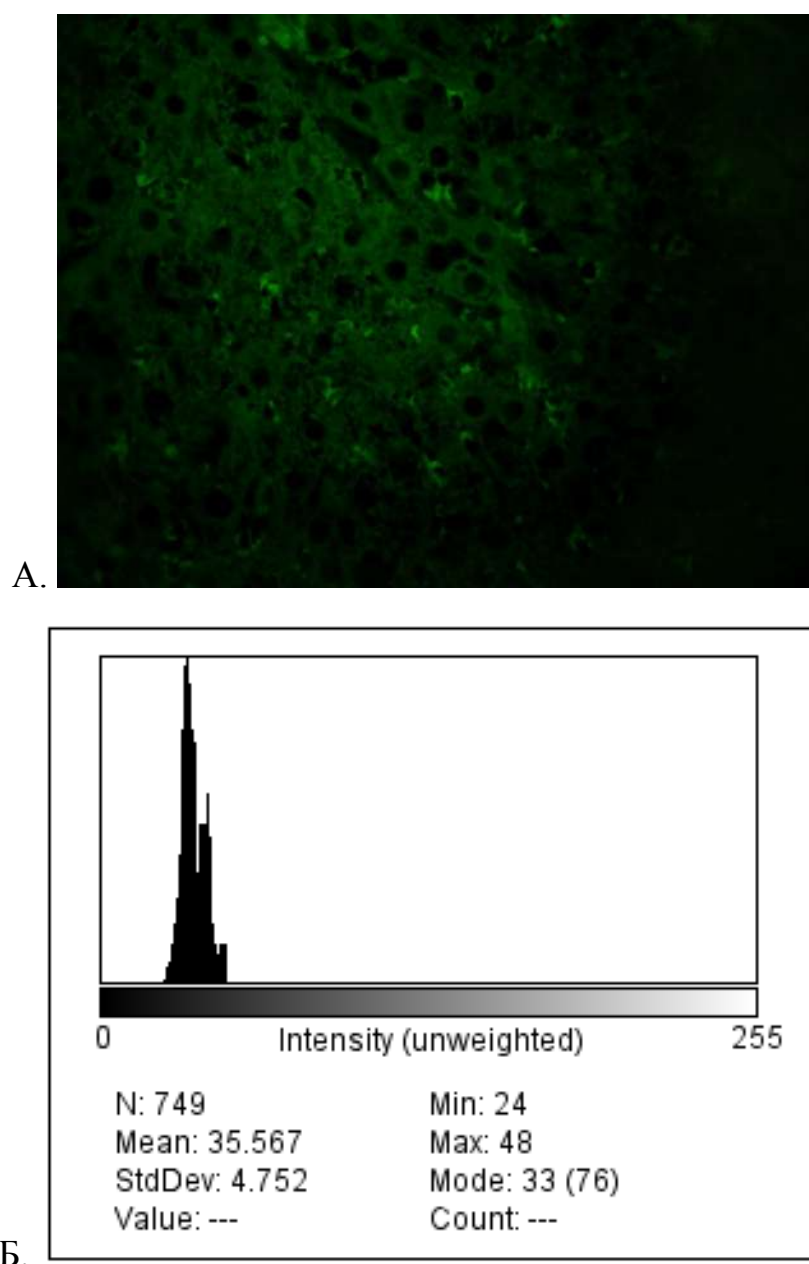


Рисунок 3.3.10 – А) Популяция гепатоцитов, содержащая белок Ki-67 в группе животных, получавших дигидрокси-форму оротовой кислоты. Интенсивность экспрессии продукта реакции невысока. Иммуногистохимическая окраска с антителами к Ki-67, вторые антитела, ассоциированные с Alexa Fluor 488. Увеличение: об.×40, ок.×10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

Сравнение морфометрических показателей, полученных в процессе эксперимента по изучению клеток с экспрессией Ki-67, представлено на рисунке 3.3.11.

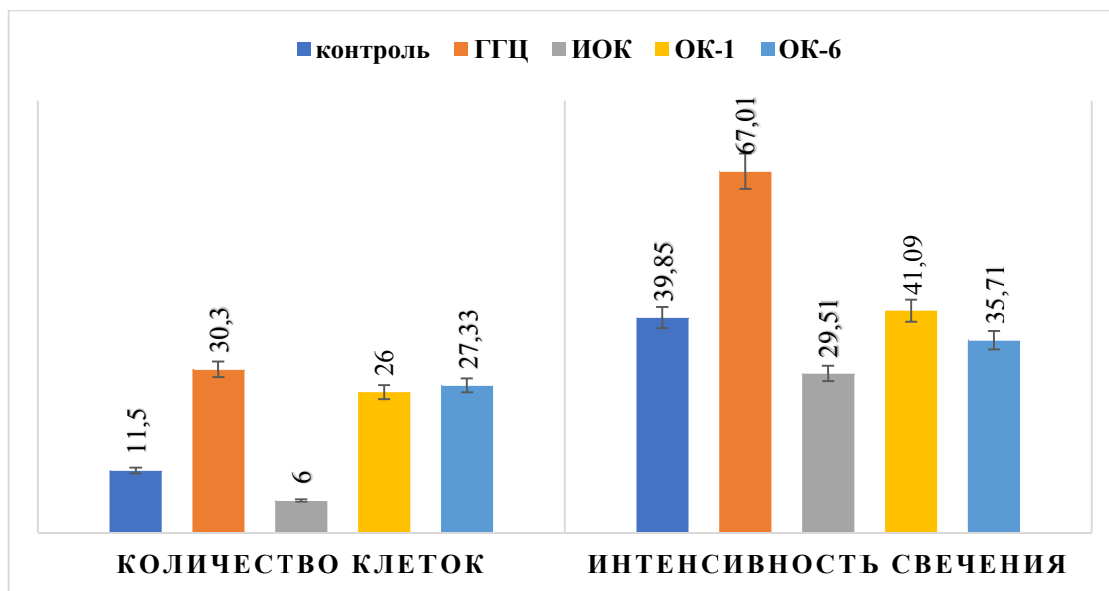


Рисунок 3.3.11 – Количество Ki-67-положительных клеток (шт/поле зрения) и интенсивность свечения гистохимического продукта (у.е.) в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Количество клеток, экспрессирующих белок Ki-67 у животных, получавших механомодифицированные формы оротовой кислоты резко падало в сравнении с группой с умеренной ГГЦ в группе животных, получавших оксо-форму оротат-аниона (в 5,05 раз, $p < 0,05$), в группах с введением гидроксид- и дигидроксид-форм оротат-аниона оставалось высоким и не достигало показателей интактного контроля (снижение составило 10-12%). Необходимо отметить, что в группе животных, получавших исходную форму ОК, количество таких клеток падало также и в сравнении с контрольной популяцией (в 1,9 раз, $p < 0,05$). Интенсивность свечения популяции клеток с Ki-67 при введении препаратов, содержащих

различные формы оротат-аниона, ОК была сравнима с данными интактного контроля только в группе, получавшей гидрокси-форму оротовой кислоты.

Популяция Купферовских клеток при введении таутомеров оротовой кислоты

Количество КК (при стандартной окраске гематоксилином и эозином) при применении таутомеров оротовой кислоты не выявило внутригрупповых различий, не отличалось от группы сравнения (умеренная ГГЦ), и оставалось повышенным во всех группах по сравнению с интактным контролем (Рисунок 3.3.12).

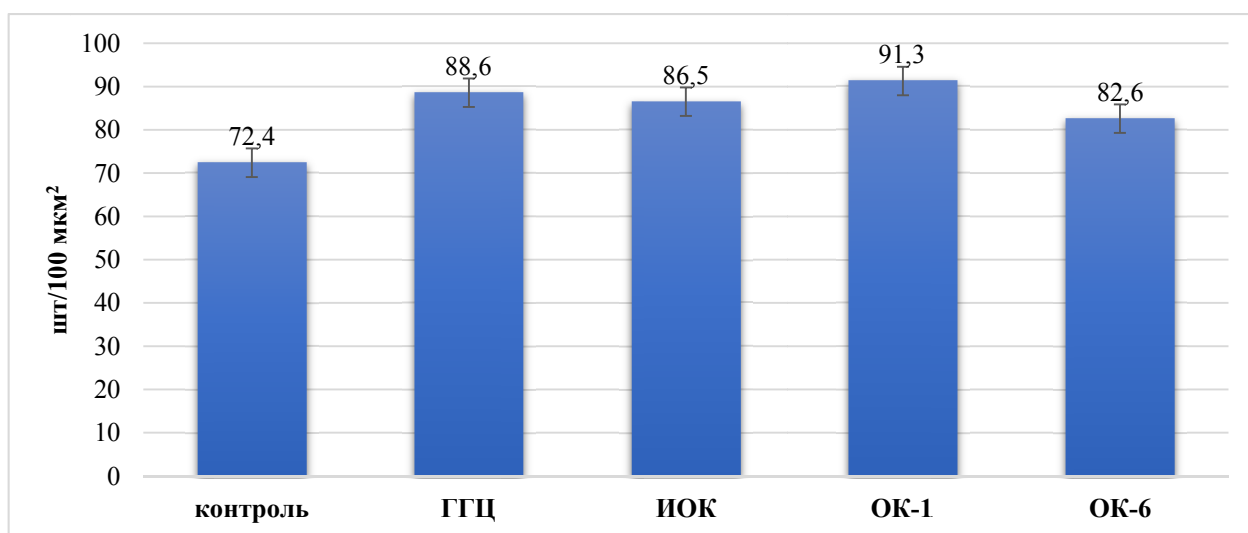


Рисунок 3.3.12 – Количество Купферовских клеток, выявляемых на гистологических срезах при окраске гематоксилином и эозином, в экспериментальных группах

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидрокси-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидрокси-форма оротовой кислоты

Иммуногистохимический анализ популяции резидентных макрофагов печени с фенотипом M1, маркируемых при окраске на CD-68+, на фоне введения различных форм оротовой кислоты представлен в Таблице 3.3.7.

Таблица 3.3.7 – Количество CD-68-позитивных клеток (шт/поле зрения) и интенсивность их свечения (в поле зрения, у.е.) в экспериментальных группах

Экспериментальные группы	Контроль	Умеренная гипергомоцистеинемия	Введение оксо-формы оротат-аниона	Введение гидрокси-формы оротат-аниона	Введение дигидрокси-формы оротат-аниона
Показатели					
Количество клеток	104,0±13,13	140,31±11,5**	149,17±31,31**	106,0±14,6*#	115,4±10,27*#
Интенсивность свечения клеток	38,87±0,39	49,40±0,54**	31,71±0,26*,**	24,54±0,36*, **, #	25,68±1,25*, **, #

Примечание: * – различия достоверны между группами, получавшими оротовую кислоту и группой животных с умеренной гипергомоцистеинемией; ** – различия достоверны в сравнении с контролем; # – различия достоверны между группой, получавшей оксо-форму с группами, получавшими гидрокси-, либо дигидрокси-форму оротат-аниона

Обозначения: КК – Купферовские клетки

При сравнении количества макрофагов CD-68+ в группах, получавших различные формы таутомеров оротовой кислоты, наблюдалась статистически значимая разница, определяемая по однофакторному дисперсионному анализу ANOVA: $F(4,4019) = 462,819$, $p = 0,0001$.

Клетки с фенотипом M1, которые выявлялись при окраске с моноклональными антителами к CD-68 представлены на Рисунках 3.3.13; 3.3.14; 3.3.15. Количество макрофагов CD-68+ снижалось в сравнении с группой умеренной ГГЦ только в печени крыс, получавших препараты после механомодификации: при введении гидрокси-формы оротат-аниона – на 24,5%, дигидрокси-формы – на 17,8%. В группе животных с введением оксо-формы

препарата ОК, не подвергавшейся механообработке, количество макрофагов не изменялось.

Количество продукта экспрессии, оцениваемого по интенсивности свечения гистохимического продукта реакции на гистологических срезах печени, в группах животных, получавших препараты оротовой кислоты, снижалось в сравнении с группой животных с умеренной гипергомоцистеинемией. Но, также как и количество клеток CD-68+, интенсивность окраски была ниже в группах с введением механомодифицированных препаратов, содержащих гидрокси- и дигидрокси-формы оротат-аниона. Так, в группе с введением таутомера в оксо-форме интенсивность окраски была в 1,56 раза ($p < 0,05$), гидрокси-формы – в 1,96 раза ($p < 0,05$), дигидрокси-формы – в 1,92 раза ($p < 0,05$) ниже, чем в группе с умеренной ГГЦ.

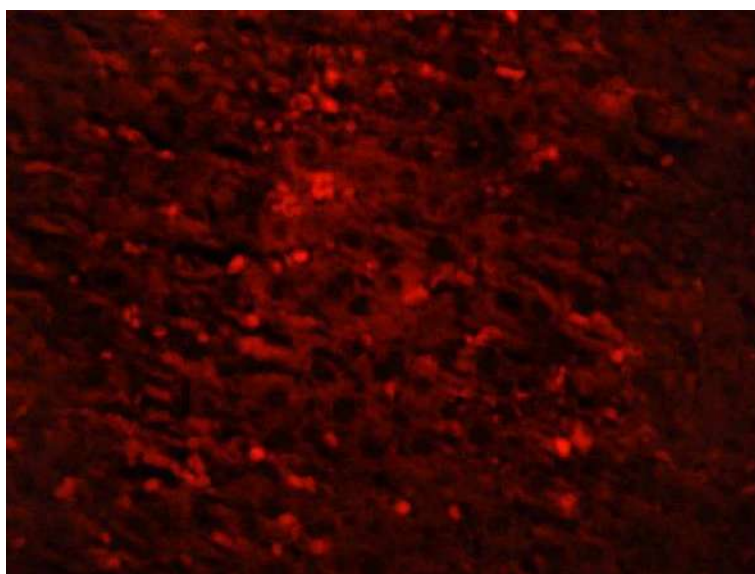


Рисунок 3.3.13 – CD-68+ Купферовские клетки. Умеренная гипергомоцистеинемия. Количество клеток и интенсивность экспрессии продукта реакции повышены, клетки формируют скопления. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об.×40, ок.×10.

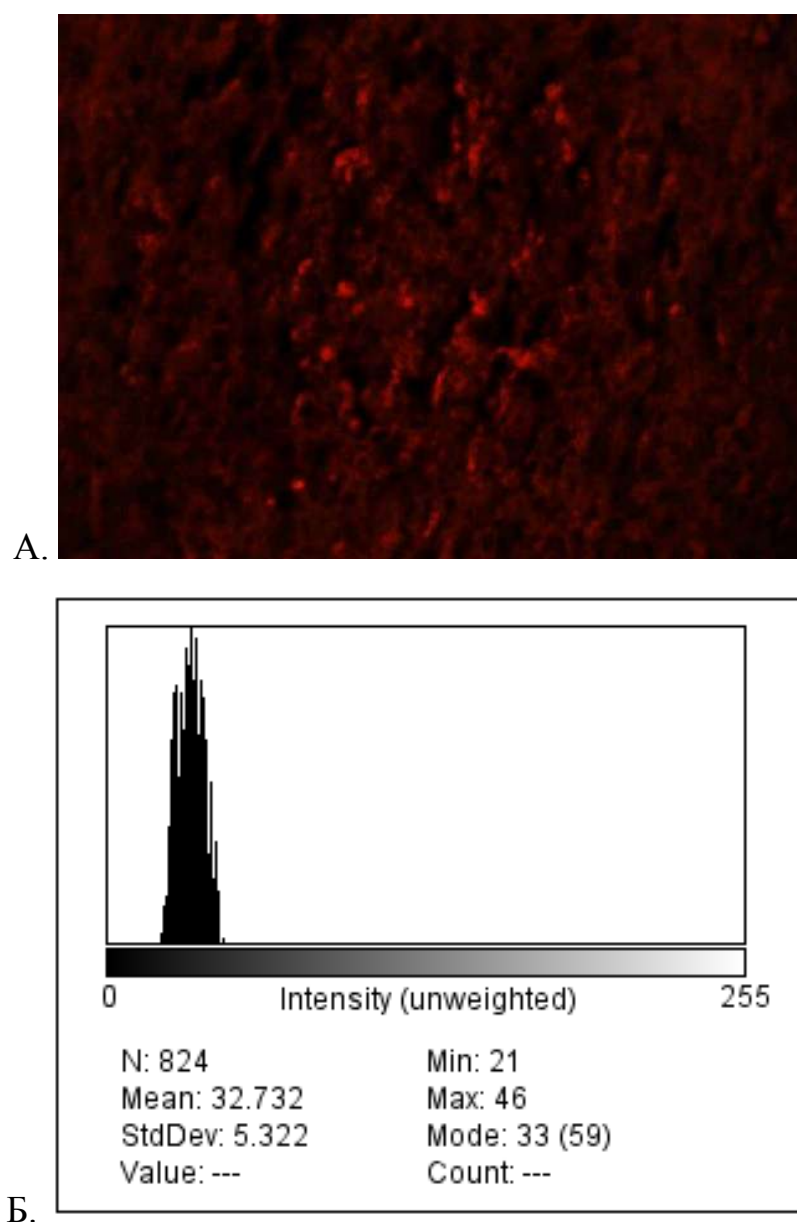


Рисунок 3.3.14 – А) CD-68+ Купферовские клетки в группе животных, получавших оксо-форму оротовой кислоты. Интенсивность свечения клеток незначительно снижена, клетки не формируют скоплений с группой умеренной гипергомоцистеинемии. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об.×40, ок.×10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

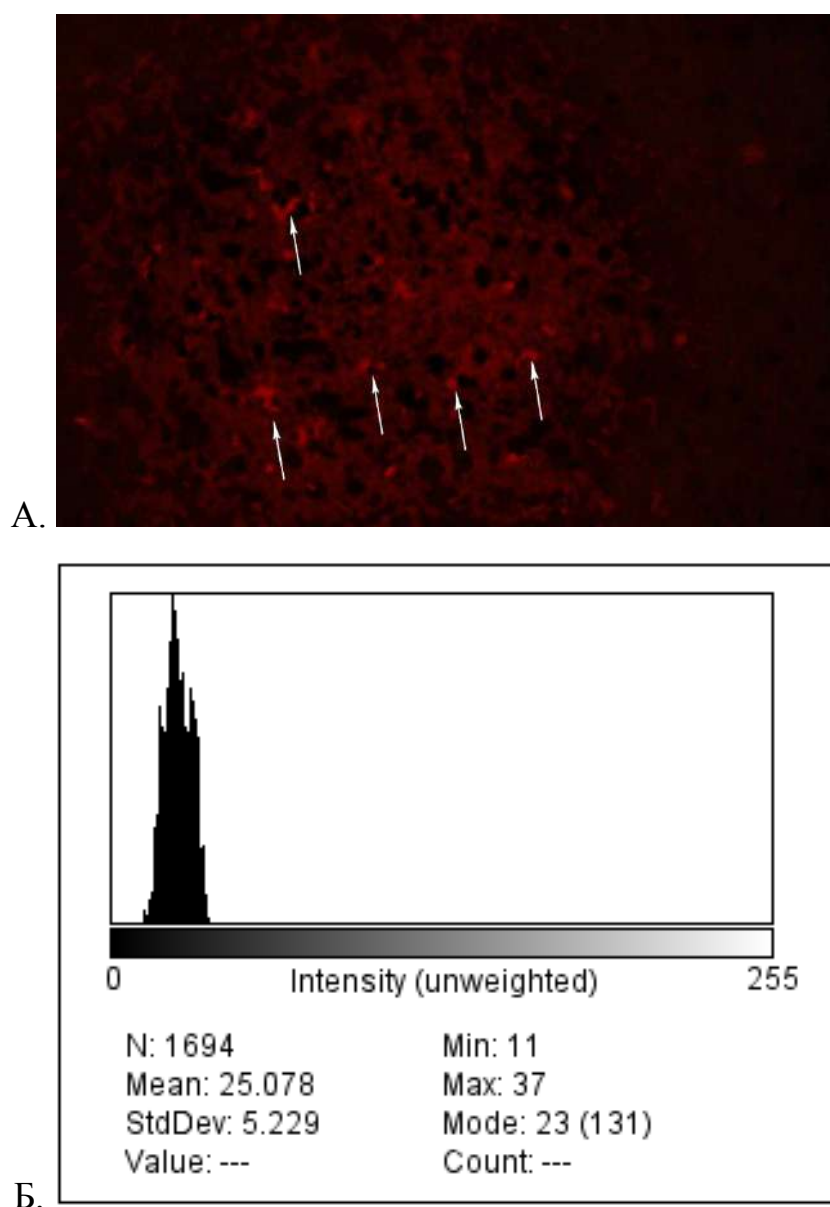


Рисунок 3.3.15 – А) CD-68⁺ Купферовские клетки в группе животных, получавших гидрокси-форму оротовой кислоты. Клетки одиночные, интенсивность экспрессии продукта низкая. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD-68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об.×40, ок.×10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

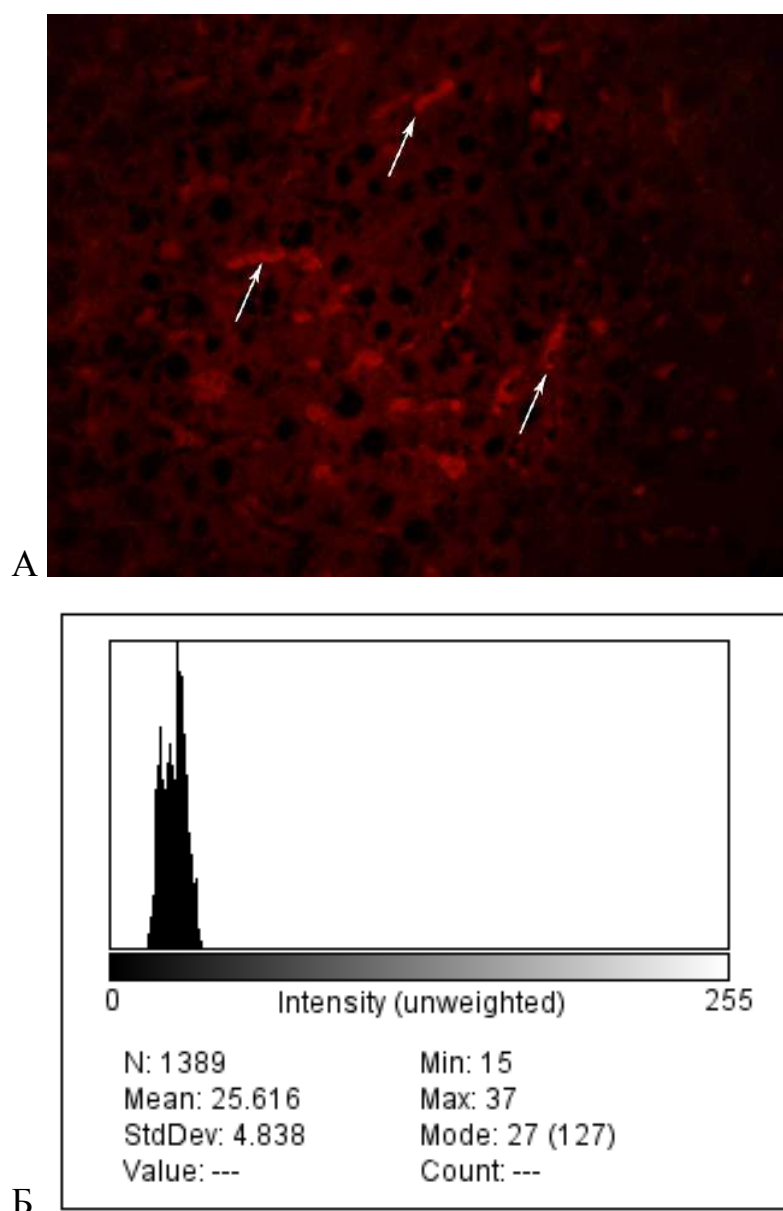


Рисунок 3.3.16 – А) CD 68+ Купферовские клетки в группе животных, получавших дигидрокси-форму оротовой кислоты. Клетки формируют цепочки (стрелки), интенсивность экспрессии продукта низкая. Иммуногистохимическая окраска с моноклональными антителами к CD68, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об.×40, ок.×10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

Клетки с фенотипом M1, которые выявляются при окраске с моноклональными антителами к CD-68, представляют собой только часть всей популяции Купферовских клеток печени. Сопоставление (на поле зрения

микроскопа) количества КК при окраске гематоксилином и эозином и КК с фенотипом CD-68+ в контрольной популяции составляло 1:0,8; при умеренной ГГЦ ~ 1:0,9; введении оксо-формы ~ 1:1; введении гидрокси-формы ~ 1:0,7; введении дигидрокси-формы ~ 1:0,8.

Популяция перисинусоидных клеток Ито

Фенотип звездчатых клеток Ито изменяется под воздействием вводимых препаратов оротовой кислоты. Количество и интенсивность свечения клеток при иммуногистохимической окраске представлена в таблице 3.3.8, сравнение данных с показателями интактного контроля и группой умеренной ГГЦ отображено на рисунках 3.3.17 и 3.3.18.

Таблица 3.3.8 – Количество клеток Ито (шт/поле зрения) и интенсивность их свечения (в поле зрения, у.е.) в группах с введением таутомеров оротовой кислоты

Форма оротат-аниона Показатели	Оксо-форма	Гидрокси-форма	Дигидрокси-форма
Количество клеток	211,09±9,75	116,75±9,34*	105,06±8,09*
Интенсивность свечения клеток Ито	37,13±0,15	20,19±0,19*	38,27±0,18

* – различия достоверны $p < 0,0001$ в сравнении с группой с введением исходной формы оротовой кислоты

Наблюдались статистически значимая разница в количестве клеток Ито между исследуемыми группами, $F(4, 58) = 70,324$, $p < 0,0001$.

Достоверные различия, согласно теста Тьюки, наблюдались при сравнении показателей количества клеток Ито в группах животных, получавших оксо-форму оротовой кислоты и гидрокси-форму, а также оксо- и дигидрокси-форму ($p < 0,0001$). Однако не наблюдалось достоверных различий в количестве клеток

между группами с введением гидрокси- и дигидрокси-таутомеров оротат-аниона ($p=0,877$). Различия данных между группами с введением оксо- и гидрокси-формы составляли 44,69%, оксо- и дигидрокси-формы – 50,23%.

По результатам теста Тьюки были выявлены статистически значимые различия между показателями в группах контрольных животных и крыс с умеренной ГГЦ ($p<0,0001$); группой контроля и с введением исходной формы оротовой кислоты ($p<0,0001$). Между данными контрольной группы и показателями, полученными в группах с введением гидрокси- и дигидрокси-форм оротат-аниона, статистически значимой разницы не наблюдалось $p = 0,914$ и $p = 1,0$ соответственно.

Количество звездчатых клеток Ито в группе с введением оксо-формы оротат-аниона в сравнении с группой ГГЦ снижается в 1,5 раза, при введении гидрокси-формы – в 2,8 раза, дигидрокси-формы – 3,09 раза (Рисунок 3.3.17).

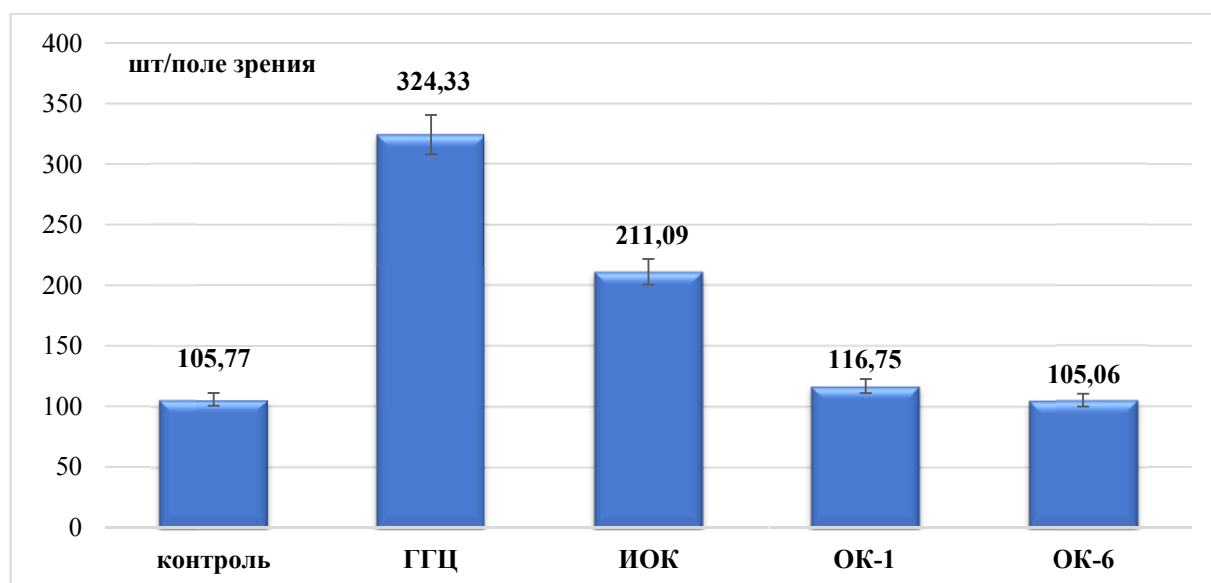


Рисунок 3.3.17 – Количество клеток Ито в экспериментальных группах

* – различия достоверны в сравнении с интактным контролем ($p<0,0001$)

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидрокси-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидрокси-форма оротовой кислоты

При использовании однофакторного дисперсионного анализа ANOVA по анализу интенсивности свечения продукта гистохимической реакции были получены следующие результаты: $F(4,8725) = 2100,06$, $p = 0,0001$. Средние значения интенсивности свечения иммунореактивного продукта статистически значимо различались между всеми группами ($p < 0,0001$), кроме данных, полученных в группе с умеренной ГГЦ и в группе с введением оксо-формы оротат-аниона ($p = 0,163$) – в данном случае статистически значимого различия не наблюдалось. Выраженность экспрессии α SAM в группе с введением гидрокси-формы ОК была в 1,8 раза ниже, чем умеренной гипергомоцистеинемии и была сравнима с контрольными показателями. Тогда как в группах животных, получавших оксо- и дигидрокси-формы ОК отличий от данных, полученных в группе с умеренной ГГЦ не наблюдалось, и они оставались выше исходных контрольных данных в 1,5 раза (Рисунок 3.3.18).

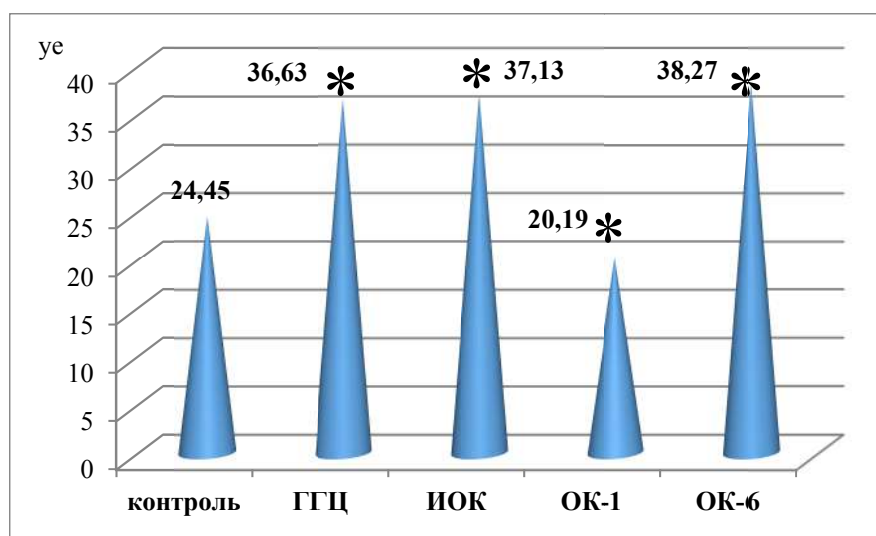


Рисунок 3.3.18 – Интенсивность свечения клеток Ито (у.е. на поле зрения) в экспериментальных группах

* – различия достоверны в сравнении с интактным контролем ($p < 0,0001$)

Обозначения: ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидрокси-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидрокси-форма оротовой кислоты

На рисунках 3.3.19; 3.3.20; 3.3.21 представлены микрофотограммы популяции клеток Ито при введении таутомерных форм оротовой кислоты.

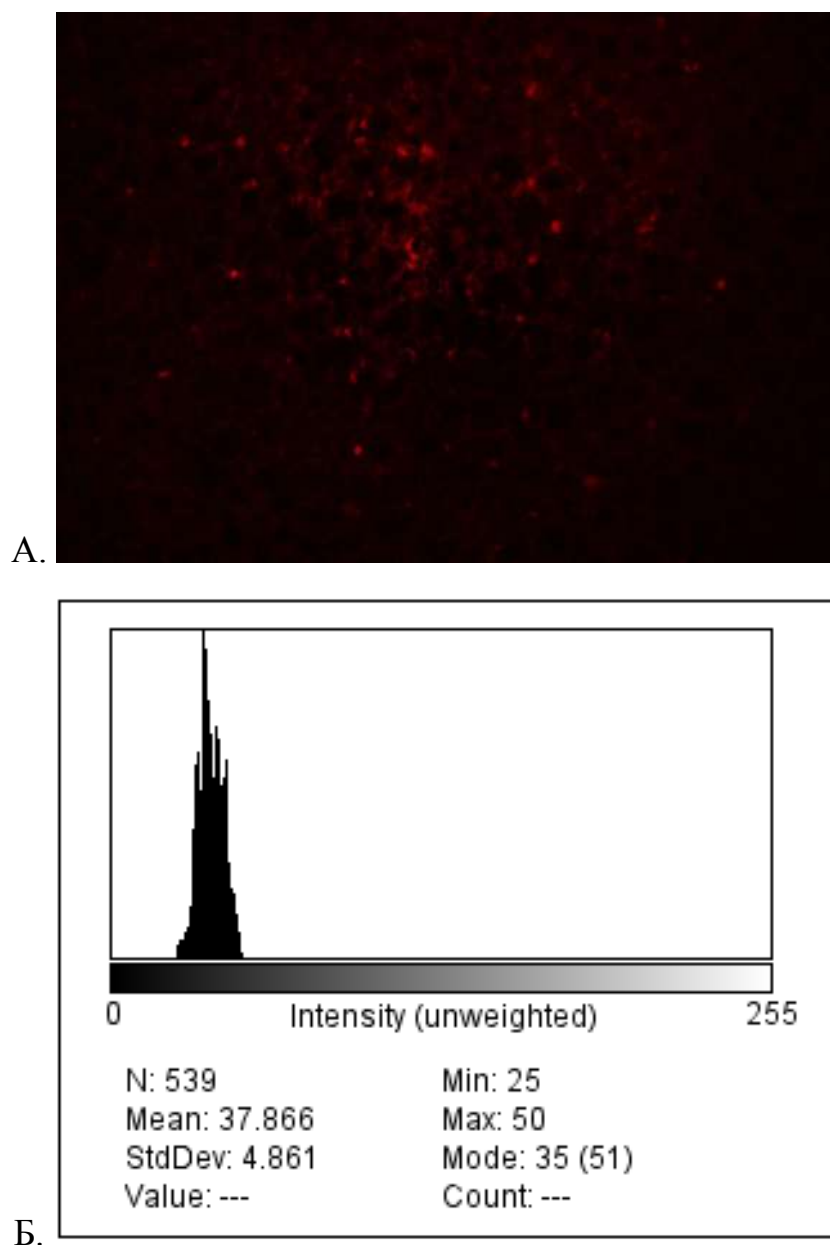


Рисунок 3.3.19 – А) Популяция клеток Ито, маркируемых гладкомышечным α -актином (α SAM), в группе животных, получавшей оксо-форму оротовой кислоты. Обьяснение в тексте. Иммуногистохимическая окраска на антитела к α SAM, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times$ 40, ок. $\times$ 10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

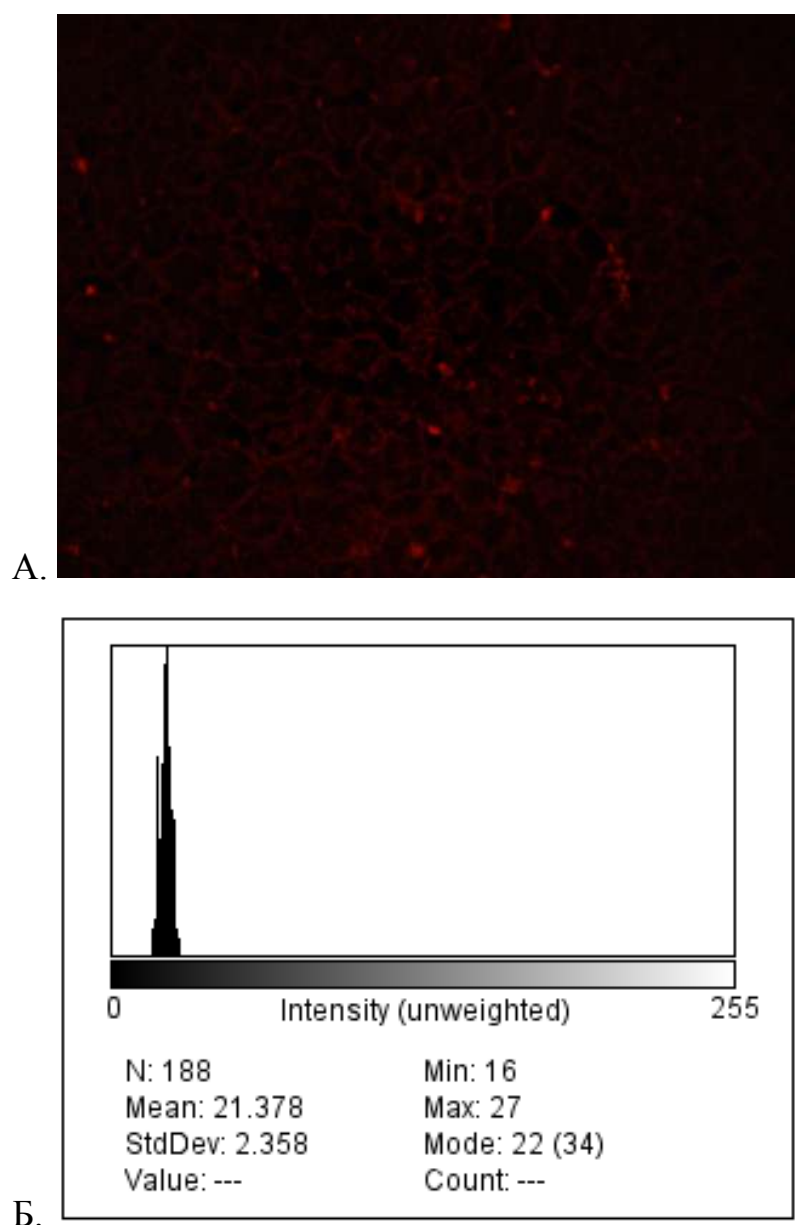


Рисунок 3.3.20 – А) Популяция клеток Ито, маркируемых гладкомышечным α -актином (α SAM), в группе животных, получавшей гидроксиформу оротовой кислоты. Интенсивность свечения низкая. Иммуногистохимическая окраска на антитела к α SAM, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times$ 40, ок. $\times$ 10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

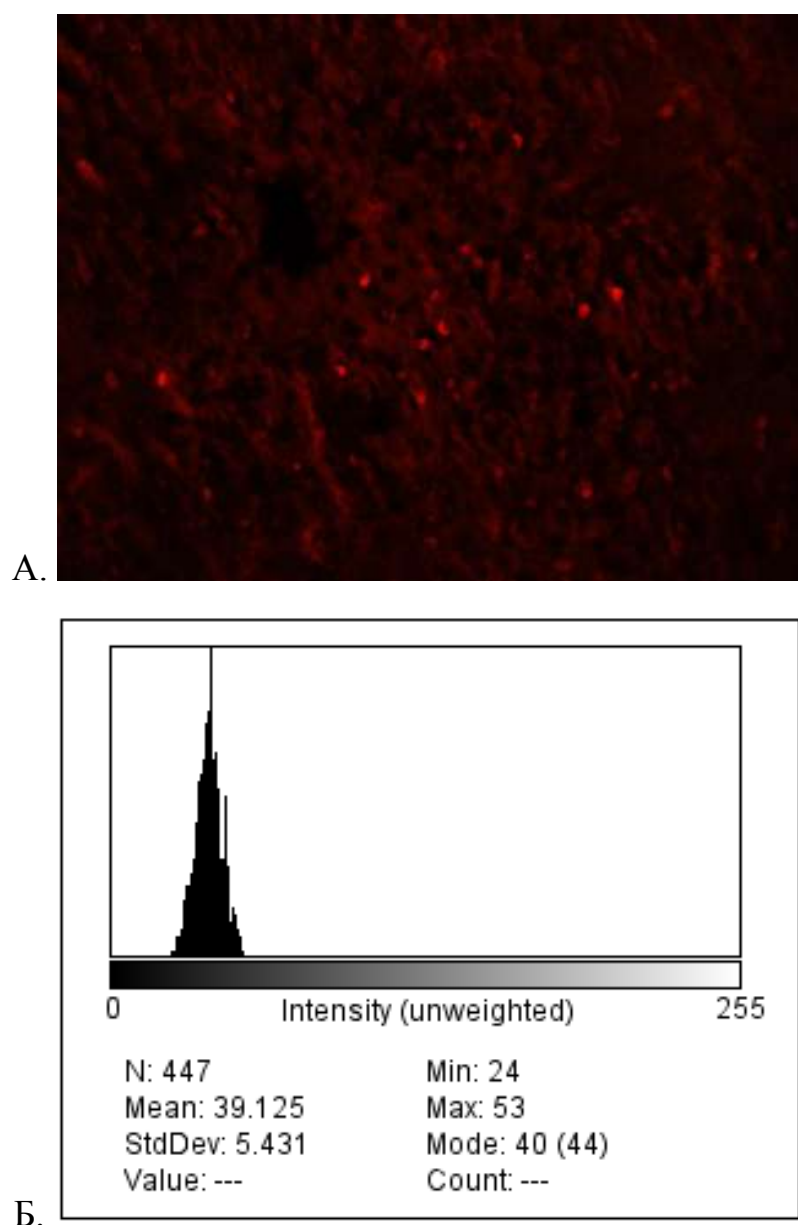


Рисунок 3.3.21 – А) Популяция клеток Ито, маркируемых гладкомышечным α -актином (α SAM), в группе животных, получавшей дигидрокси-форму оротовой кислоты. Интенсивность свечения высокая и сравнима с группой умеренной гипергомоцистеинемии. Иммуногистохимическая окраска на антитела к α SAM, смесь вторых антител, ассоциированных с Alexa Fluor 647. Увеличение: об. $\times$ 40, ок. $\times$ 10. Б) График интенсивности свечения продукта экспрессии

Таким образом, сравнение полученных данных по количеству и интенсивности свечения звездчатых клеток Ито при введении различных таутомерных форм калия оротата на фоне гипергомоцистеинемии, выявило

следующие моменты. Во-первых, введение различных форм оротат-аниона ОК привело к снижению количество клеток Ито, повышенного при умеренной ГГЦ, однако степень снижения зависела применяемой формы таутомера оротат-аниона. Во-вторых, модифицированные препараты ОК имели (гидрокси- и дигидрокси-формы) показали больший положительный эффект, чем исходная оксо-форма оротат-аниона. В-третьих, по интенсивности экспрессии гистохимического продукта, а, следовательно, активности клеток Ито, с контрольными показателями были сравнимы только результаты, полученные в группе с введением гидрокси-формы оротовой кислоты.

3.3.3. Морфометрическая характеристика микрогемоциркуляторного русла печени

Введение животным препаратов оротовой кислоты привело к нормализации параметров микрососудистого русла в сравнении с данными экспериментальной группы с умеренной гипергомоцистеинемией (Таблица 3.3.9).

Таблица 3.3.9 – Морфометрические показатели кровеносного микроциркуляторного русла печени при введении таутомеров оротовой кислоты

Введение оксо-формы оротовой кислоты				
Диаметры сосудов, мкм				
Сосуды	мин	макс	Среднее (М)	Ошибка среднего (m)
центральной вены	40,55	168,64	87,78	6,9*
междольковой вены	24,68	48,3	37,56	1,89*
междольковой артерии	30,08	50,96	39,51	2,13*
междолькового желчного протока	6,64	19,71	13,19	0,73*
Площади сосудов, мкм ²				
центральной вены	2934,02	22336,08	6800,13	1104,31*
междольковой вены	327,33	1801,45	1161,45	105,52*
междольковой артерии	710,63	2159,74	1262,27	101,04
междолькового желчного протока	42,84	212,4	144,45	14,82*

Введение оксо-формы оротовой кислоты				
Диаметры сосудов, мкм				
синусоидов	-		2642,89	78,64*
коэффициент Визотто			0,036	0,01*
Введение гидрокси-формы оротат-аниона				
Диаметры сосудов, мкм				
центральной вены	54,26	129,69	78,92	5,32*
междольковой вены	27,46	44,91	34,34	1,63*
междольковой артерии	27,02	42,47	34,23	1,36* #
междолькового желчного протока	9,03	19,75	13,06	0,66*
Площади сосудов, мкм ²				
центральной вены	3905,09	13209,4	5314,55	730,37*
междольковой вены	357,93	1584,32	956,03	87,3*
междольковой артерии	482,19	1371,53	946,11	71,8* #
междолькового желчного протока	48,02	257,15	140,72	14,37*
синусоидов	-		1525,28	64,32* #
коэффициент Визотто			0,017	0,006*#
Введение дигидрокси-формы оротовой кислоты				
диаметры сосудов, мкм				
центральной вены	48,64	124,21	63,55	7,47* #
междольковой вены	19,94	39,76	32,08	2,5* #
междольковой артерии	17,62	39,29	28,18	1,19* #
междолькового желчного протока	8,51	18,67	12,7	0,65*
Площади сосудов, мкм ²				
центральной вены	1678,13	12117,49	3566,79	999,77* #
междольковой вены	312,28	1773,63	852,58	133,2*#
междольковой артерии	362,72	1212,36	644,84	53,35 #
междолькового желчного протока	56,83	273,79	131,64	13,43*
синусоидов	-		1372,58	65,52 #
коэффициент Визотто			0,014	0,006*#

* – различия достоверны в сравнении с данными группы крыс с умеренной гипергомоцистеинемией, $p < 0,05$; # – различия достоверны в сравнении с данными экспериментальной группы крыс с введением оксо-формы оротовой и механомодифицированных гидрокси- и дигидрокси-форм, $p < 0,05$

Площадь центральной вены в группах с введением таутомерных форм оротовой кислоты в сравнении с группой умеренной ГГЦ была достоверно ниже: с ИОК в 3,46 раза, ОК-1 – в 4,42 раза, ОК-6 – в 6,59 раз ($p < 0,05$), но данные, тем не менее, во всех группах оставались выше контрольных значений (Рисунок 3.3.22).

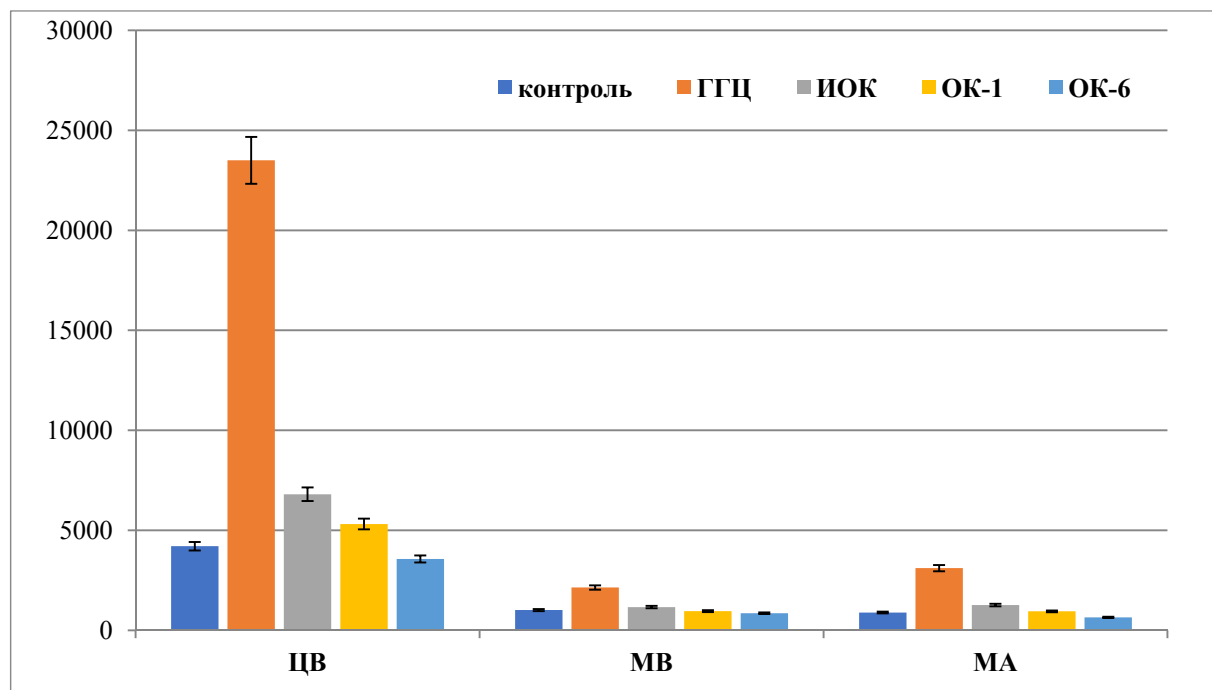


Рисунок 3.3.22 – Динамика изменений площади кровеносных микрососудов печени в процессе эксперимента

Обозначения: ЦВ – центральная вена, МВ – междольковая вена, МА – междольковая артерия, ГГЦ – умеренная гипергомоцистеинемия, ИОК – исходная оксо-форма оротовой кислоты, ОК-1 – гидроксид-форма оротовой кислоты, ОК-6 – дигидроксид-форма оротовой кислоты

Так, в группе с введением исходной формы таутомера, в сравнении с данными контроля, площадь центральной вены оставалась выше на 61,18% ($p < 0,05$). Площадь междольковой артерии при введении гидроксид-формы оротат-аниона снижалась в сравнении с группой умеренной ГГЦ, но не достигала данных контрольных показателей, оставаясь выше на 25% ($p < 0,05$). В группе животных, получавших дигидроксид-форму оротат-аниона, наблюдалась тенденция к

снижению показателей ниже контрольных уровней для междольковой вены и артерии, общей площади синусоидов. Особенно это касается междольковых вен, площадь которых была снижена в сравнении с данными интактного контроля на 37,4% ($p < 0,05$).

Наиболее близки к показателям контрольных крыс (не имея значимых с контролем различий), были показатели микрососудистого кровеносного русла печени животных, получавших гидрокситаутомер оротовой кислоты (длительность механомодификации 1 час).

Таким образом, эффективность действия таутомеров оротовой кислоты на кровеносное микрососудистое русло у животных с гомоцистеин-индуцированным поражением печени можно представить следующей последовательностью: гидроксиформа > оксоформа > дигидроксиформа.

Таким образом, наиболее выраженным нормализующим эффектом в отношении гипергомоцистеинемической вазодилатации микрососудов кровеносного русла печени обладает гидроксиформа оротовой кислоты.

Обобщение по главе.

- Эффективность влияния различных таутомерных форм на показатели белой крови при гипергомоцистеинемии, можно представить в следующей последовательности: гидроксиформа > оксоформа > дигидроксиформа.
- Введение таутомеров оксо- и дигидроксиформ оротовой кислоты при ГГЦ не только не улучшало, но даже ухудшало показатели липидного профиля. Исключение составляла группа с введением гидрокситаутомера, показатели которой наиболее близки к данным интактного контроля. Количество триглицеридов и ОХС при получении оксоформы ОК не только не снижалось, но даже увеличивалось как в сравнении с интактным контролем, так и с группой умеренной ГГЦ. В группе с введением дигидроксиформы ОК холестерин ЛПВП был ниже данных исходного контроля и ГГЦ. Индекс атерогенности увеличивался при введении таутомеров не только в сравнении с исходным контролем, но и с группой

ГГЦ. Таким образом, эффективность влияния различных таутомерных форм на липидный профиль можно представить последовательностью: гидрокси-форма>оксо-форма>дигидрокси-форма.

- Введение таутомеров оротовой кислоты выравнивало показатели печеночных ферментов. Наиболее близки к контрольным данным были показатели в группе животных, получавших гидрокси-форму оротат-аниона.
- Введение оротовой кислоты сопровождалось, главным образом, влиянием на ядерный аппарат клетки, размеры цитоплазмы гепатоцитов не восстанавливались. Улучшение морфометрических показателей ядрышкового организатора клеток определялись формой таутомера: интенсивность ядерно-нуклеоплазматического транспорта субъединиц рибосом (индекс интра/экстра), были близки к контрольным данным только в группе с введением гидрокси-формы оротат-аниона.
- Количество клеток, экспрессирующих белок Ki-67 у животных, получавших механомодифицированные формы оротовой кислоты снижалось в сравнении с группой с умеренной ГГЦ, но оставалось высоким и не достигало показателей интактного контроля. Количество таких клеток в отличие от животных, получавших исходную форму ОК, падало в сравнении с контрольной популяцией в 1,9 раз ($p < 0,05$). Интенсивность свечения была сравнима с данными интактного контроля только в группе, получавшей гидрокси-форму оротат-аниона.
- Количество макрофагов CD68+ в сравнении с группой умеренной ГГЦ и интенсивность свечения клеток были снижены только в печени крыс, получавших препараты после механомодификации – гидрокси- и дигидрокси-формы. В группе животных с введением оксо-формы препарата ОК, не подвергавшейся механообработке, количество макрофагов не изменялось.

- Активность клеток Ито при введении таутомеров оротат-аниона на фоне умеренной ГГЦ определялось применяемой формой таутомера: механомодифицированные препараты имели преимущество перед исходной оксо-формой ОК. Интенсивность экспрессии гистохимического продукта была сравнима с контрольными показателями только в группе с введением гидрокси-формы оротат-аниона.
- Таутомеры оротовой кислоты проявляли нормализующий эффект на кровеносное микрососудистое русло печени, уменьшая гомоцистеин-индуцированную дилатацию сосудов. Эффективность действия таутомеров оротовой кислоты на кровеносное микрососудистое русло у животных можно представить следующей последовательностью: гидрокси-форма > оксо-форма > дигидрокси-форма.

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипергомоцистеинемией в легкой и/или средней степени страдает 5-7% населения в целом, и до 40% – людей с сосудистыми нарушениями (Heneghan H.M., Sultan S., 2008; Koller A., Szenasi A., 2018; Qureshi S.S., Gupta J.K., 2019; Lima A., Ferin R., 2020; Peng Y.P., Huang M.Y., 2020). Она может быть обусловлена социальными причинами, например, связанными с нарушением пищевого поведения (потребление продуктов, богатых метионином, злоупотребление кофе), вредными привычками (курение) (Selhub J., Troen A.M., 2016; Han N., Chae J.W., 2018; Azarpazhooh M.R., Andalibi M.S.S., 2020; Kawada T., 2021), употреблением лекарств, изменяющих метаболический статус, таких как, метформин, инсулин, противосудорожные препараты (Zhang Y., Wang G., 2018; Reznik E.V., Shcherbakova E.S., 2019; Zhao Q., Song W., Huang J., 2020; Hussein J., El-Naggar M., Badawy E., 2020).

Единственным источником гомоцистеина, незаменимой аминокислоты, является метионин. Печень представляет собой центральный орган, где происходит превращение пищевого метионина в гомоцистеин путем реакции трансметилирования. Нагрузка пищевым метионином приводит к изменению метаболизма аминокислоты, нарушению процессов метилирования-реметилирования и, как результат, повышению уровня гомоцистеина в крови. Следствием этих процессов является нарушение функций клеток печени, изменение гомеостаза печеночных ферментов, увеличение содержания в крови билирубина и угнетение холестатической функции железы. Подобное состояние можно охарактеризовать как гепатопатию. Токсическое действие гомоцистеина многообразно: он способен снижать эффекты оксида азота, вызывать развитие окислительного стресса (Li W. et al., 2020; Pai P.Y. et al., 2021), разрушать дисульфидные связи в белках, изменять их структуру, свойства и функции (Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А., 2014), вызывать апоптоз клеток (Škovierová H., Mahmood S., 2015; Wang X. et al., 2020).

Повышенный уровень гомоцистеина в крови способствует формированию воспалительных реакций, о чем свидетельствуют увеличение у экспериментальных животных количества лейкоцитов, лейкоцитарного индекса интоксикации, наличие лимфо- и моноцитоза, повышение содержания атерогенных фракций липидов (ЛПНП). Стоит отметить, что в крови экспериментальных животных нарастают (менее значительно) и антиатерогенные ЛПВП, вследствие чего атерогенный индекс изменяется незначительно. Возможно, это связано с тем, что у крыс липиды находятся преимущественно в форме ЛПВП, у них вырабатывается особая мурихоловая желчная кислота, отсутствующая у людей, которая препятствует, например, апоптозу гепатоцитов, регулирует синтез желчных кислот, способствует большей устойчивости к изменениям уровня сывороточного холестерина (Denk G.U. et al., 2012; Hu X. et al., 2014). В отдельной серии работ с длительным, в течение 3-х месяцев, содержанием животных на диете, обогащенной метионином, нами показано, что значимо атерогенный индекс повышается у животных с гипергомоцистеинемией не ранее, чем через 2 месяца после ее регистрации. По всей видимости, стабильно повышенный уровень аминокислоты в крови, углубление патологии печени, хроническое воспаление приводят к атеросклеротической настроенности организма.

В ряде исследований, проведенных в основном на раковых клетках, было показано, что измененный метаболизм метионина влияет на метилирование гистонов через изменение функции гистоновых метилтрансфераз (Ulanovskaya O.A., Zuhl A.M., Cravatt B.F., 2013; Shiraki N. et al., 2014; Mentch S.J., Locasale J.W., 2016). Метилирование гистонов является важной частью эпигенетического кода и играет разнообразную роль в установлении состояний хроматина, которые опосредуют регуляцию экспрессии генов. Mentch S.J., Locasale J.W. (2016), Tang S., Li X., Locasale J.W. (2020) обнаружили, что регулирования потребления метионина с пищей достаточно для нормализации уровней метилирования гистонов, что обусловлено быстрыми преобразованиями

уровней H3K4me3 и измененной транскрипцией гена после коррекции в доступности метионина. W. Shen с соавт. (2020) в своем исследовании пришли к выводу, что цикл гомоцистеина является ключевой метаболической сенсорной системой, которая опосредует независимое от рецептора распознавание опасного сигнала, связанного с метаболизмом, и модулирует SAM / SAH-зависимое метилирование в условиях болезни.

Большая часть работ по исследованию гипергомоцистеинемии связана с болезнями сердца и сосудов, нейродегенеративной патологией. Однако гипергомоцистеинемия и повреждение печени – взаимосвязанные и взаимодополняющие процессы (Roblin X. et al., 2007; Pacana T. et al., 2015). Клетки печени в модели метионин-обусловленной гипергомоцистеинемии испытывают двоякую нагрузку. С одной стороны, поступающий с пищей избыток метионина вызывает нагрузку на гепатоциты, заставляя работать их в усиленном режиме, следствием чего является повышение гомоцистеина в крови, с другой – повышенный уровень аминокислоты вновь оказывает токсическое действие на клетки пищеварительной железы. Показателем развивающейся дисфункции является нарушение количества маркерных ферментов печени (АСТ, АЛТ), билирубина, указывающих на повреждение клеток. Повышение уровня прямого билирубина, выявленное в процессе эксперимента, может свидетельствовать о нарушении оттока желчи, несостоятельности дезинтоксикационных систем печени, однако в научной литературе желчные кислоты обсуждаются также как сильнейшие антиоксиданты (dos Santos J.A. et al., 2015; Singh N., Bhattacharyya D., 2016). С этой точки зрения увеличение показателя может рассматриваться как компенсаторный эффект в связи с развивающимся на фоне гипергомоцистеинемии окислительным стрессом.

На морфологическом уровне взаимодействие двух факторов (избыток метионина и повышенная концентрация гомоцистеина) сопровождается снижением объема функциональной паренхимы (количества гепатоцитов в единице объема), пула двоядерных гепатоцитов, появлением клеток, находящихся

в состоянии дистрофии и некроза. Одновременно с дистрофическими процессами при гипергомоцистеинемии появляются гепатоциты с очень крупными ядрами и высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, которые составляют 12,5% от всей популяции. Тем не менее суммарная площадь, занимаемая ядерным аппаратом, при ГГЦ снижается. В литературе имеются работы, в которых указывается на увеличение объема ядра гепатоцитов в ответ на действие лекарственных веществ, метаболическую нагрузку (Martin N.C., McCullough C.T. et al., 2002; Wang M.J., Chen F., 2017; Новгородская Я.И. и др., 2019), обуславливающих формирование клеточного стресса. Предполагается, что полиплоидные гепатоциты обеспечивают регенерационные и адаптационные возможности печени (Wilkinson P.D., Alencastro F., 2019; Matsumoto T. et al., 2020; Donne R. et al., 2020), защиту железы от окислительного стресса и генотоксического повреждения, обуславливают переключение специфических функций печени в режим экономии (Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., 2010). В то же время имеются работы, указывающие на то, что полиплоидные гепатоциты демонстрируют признаки окислительного повреждения с истощением ресурсов антиоксидантов, перекисным окислением липидов, снижением репликативных способностей (Gorla G.R., Malhi H., Gupta S., 2001).

Для оценки регенеративных возможностей клеток печени нами проведен иммуногистохимический анализ экспрессии белка Ki-67 у животных с гипергомоцистеинемией. Выяснено, что представительство этого белка в гепатоцитах в условиях гипергомоцистеинемии значимо увеличивается. Первоначально белок Ki-67 рассматривался большинством исследователей как клинически значимый маркер опухолевых клеток (Dowsett M. et al., 2011). Недавние работы раскрывают роль Ki-67 в регуляции клеточного цикла в целом, поддержании гетерохроматина и сборке перихромосомного слоя на митотических хромосомах (Cuylen S. et al., 2016; Sobecki M. et al., 2016; Sun X. et al., 2017). Изменение функционального статуса клетки, выход ее из состояния покоя также

сопровожаются изменениями в количестве белка (Sobecki M. et al., 2017; Sun X., Kaufman P.D., 2018).

Факт появления крупноядерных (предположительно, полиплоидных) гепатоцитов можно связать с увеличением пролиферационного индекса. Известно, что полиплоидия гепатоцитов является результатом как ядерной полиплоидии (увеличение количества ДНК на ядро), так и клеточной полиплоидии (увеличение количества ядер на клетку) (Donne R. et al., 2020), клетки при этом могут уменьшаться в размерах (Vig P. et al., 2006). С использованием метода ДНК-цитометрии Ballester A. с соавт. (2001); Vig P. с соавт. (2006) было показано, что механизмом полиплоидизации гепатоцитов является эндомитоз, характеризующийся накоплением клеток в премитотическом периоде клеточного цикла и сопровождающийся увеличением объема ядер. При этом оставшиеся гепатоциты сохраняют потенции к пролиферации (Wilkinson P.D. et al., 2019; Patterson M., Swift S.K., 2020). В научной литературе имеются разноречивые работы, в которых указывается, что, например, добавление гомоцистеина в культуру клеток ингибирует пролиферацию гепатоцитов (Yu X. et al., 2013; Selicharová I., Kořínek M., Demianová Z., 2013), а при кормлении животных пищей с высоким содержанием метионина в печени появляются признаки апоптоза клеток, изменяется состав секретома (Liu W.H. et al., 2010; Selicharová I., Kořínek M., Demianová Z., 2013). Полученные нами разнонаправленные изменения популяции гепатоцитов (с одной стороны – уменьшение количества клеток, дистрофические изменения в них, с другой – увеличение диаметра и площади клеточных ядер в части клеток, усиление интенсивности пролиферации, оцениваемой по маркерному белку Ki-67) свидетельствуют, с нашей точки зрения, о задействованности различных механизмов влияния повышенного содержания гомоцистеина на клеточные популяции печени, его общего цитотоксического действия и, одновременно, действия на гепатоциты избыточного количества метионина.

Молекулярно-клеточный механизм влияния на клетки повышенного уровня гомоцистеина, согласно данным литературы, проявляется в варианте ER-стресса – стресса эндоплазматического ретикулума (Wang X.C., Sun W.T. 2015; Wu X., Zhang L., Miao Y., 2019). Изменение функционирования ЭПС – это нарушение цитоплазматического этапа биосинтеза белковых продуктов в клетке. Ядерный этап биосинтеза белка тесно связан с ядрышком, которое ответственно за биогенез рибосом (Baßler J., Hurt E., 2019). Исследования последних лет высветили фундаментальную роль ядрышка в восприятии различных клеточных стрессовых стимулов, которые нацелены на биогенез рибосом. Это состояние определено как «нуклеолярный стресс», и его развитие связывают с запуском нескольких путей для поддержания клеточного гомеостаза (Russo A., Russo G., 2017; Németh A., Grummt I., 2018; Matos-Perdomo E., 2018; Lu L., 2018; Baral S.S., Lieux M.E., 2020). Нами показано, что гипергомоцистеинемия сопровождается дезорганизацией ядерно-ядрышковых взаимоотношений и формированием нуклеолярного (ядрышкового) стресса.

За формирование субъединиц рибосом отвечает область ядрышкового организатора (ЯОр, или NOR – Nucleolar organiser regions). Выявление областей ЯОр доступно при окраске клеток азотнокислым серебром. Методика базируется на сродстве серебра к ядрышковым белкам (nucleolin, nucleophosmin), специфически взаимодействующим с красителем (Derenzini M., 2000; Tasdemir S. et al., 2016), что позволяет связать морфологические особенности этой области ядерного субкомпартамента с функциональной активностью клетки. Тесная связь между архитектурой и функцией ядрышка отражается зависимыми от транскрипции изменениями в ассоциированном с ядрышком хроматине, общими морфологическими изменениями ядрышка и поведением ядрышко-ассоциированных белковых гранул в ядре в ответ на внешние сигналы (Németh A., Grummt I., 2018). Установлено, что суммарная площадь ядрышек хорошо коррелирует с числом и суммарной площадью гранул, а также с активностью РНК-полимеразы I и количеством аргентофильных белков в ядрышках

(Derenzini M., 2000; Коржевский Д.Э., Гиляров А.В., 2010; Фролова О.Е., 1998). Полученные нами результаты свидетельствуют о снижении размеров и количества ЯОр в ядрах гепатоцитов, что говорит об уменьшении активности транскрипции с ядрышковых генов. С другой стороны было выявлено, что снижается доля микроядрышек, для которых характерно отсутствие транскрипционной активности. При гипергомоцистеинемии популяция ЯОр представлена большей частью активным ядрышками с нуклеолонемным либо компактным фенотипом. Возможно, объемный пул микроядрышек в контроле – это своеобразный резервный фонд, активация которого происходит в стрессовых условиях, обеспечивая адаптивный компенсаторный клеточный ответ. У животных экспериментальной группы в 2,15 раза ($p < 0,05$) увеличивается количество ядрышек компактного (функционально активного) варианта. Эти ядрышки наиболее богаты белковыми гранулами, плотно заполняющими область ЯОр. Считается, что интенсивность аргирофилии прямо пропорциональна потенциальной активности ядрышка (Howell W.M., Black D.A., 1980). Усиление степени окрашивания ЯОр отмечено при неканонической форме ядрышкового стресса (Lu L., 2018). Важен факт изменения расположения ЯОр: при гипергомоцистеинемии они чаще занимают центральное положение в ядре, в отличие от контрольной популяции. Изменение архитектоники и расположения ядрышковых организаторов при воздействии стрессовых стимулов отмечено рядом авторов. Так, C.R. Madalena с соавт. (2012) были изучены возможные связи между хромосомным расположением ЯОр и долей активных генов рРНК у *Drosophila melanogaster* и некоторых беспозвоночных. Полученные авторами данные свидетельствуют о связи между локализацией ЯОр и долей активных генов рРНК, поскольку число копий, показывающих нуклеосомальную организацию, преобладает, когда ЯОр расположены в периферическом гетерохроматине (Madalena C.R., Díez J.L., Gorab E., 2012). В работе B. McStay (2016) показано, что поврежденные рДНК-повторы перемещаются из внутренней

части ядрышка, чтобы сформировать колпачки на периферии ядрышка, предположительно для облегчения репарации.

Ядрышко-ассоциированные гранулы, окрашивающиеся серебром, коррелируют с рРНК-протеиновыми комплексами, субъединицами рибосом, количеством функционирующих в клетке РНК-полимераз. Они представлены в нуклеолах аргирофильными интрануклеолярными гранулами и располагающимися в нуклеоплазме экстрануклеолярными гранулами. При гипергомоцистеинемии изменяется их распределение, что, возможно, объясняется тем, что при гипергомоцистеинемии повышенная активность ядрышковых генов в области ЯОр (отражается в количестве интрануклеолярных включений) сопровождается задержкой транспорта субъединиц рибосом в нуклеоплазму (отражается в количестве экстрануклеолярных гранул).

Количество интерфазных ЯОр строго связано с транскрипционной активностью рРНК (Derenzini M., 2000). В непрерывно пролиферирующих клетках характеристика этих областей коррелирует со скоростью пролиферации клеток, что активно используется в диагностике опухолевого роста клеток. Однако спектр получения возможной информации о структуре и функциях ядрышка в настоящее время может быть значительно расширен. Так, морфологические характеристики нуклеолярной области предлагают использовать в качестве потенциального биомаркера, который может помочь в клиническом прогнозе заболеваний легких (Turan Sönmez F., Eröz R., 2018; Masiuk M. et al., 2020), диагностике атопического дерматита (Gunduz M. et al., 2019), определении пролиферативной природы разных типов одонтогенных кист (Tyagi K.K. et al., 2020) и т.п. M. Nisari с соавт. (2016) предлагают использовать определение количества белков ЯОр в качестве индикатора для получения информации о поведении клеток при любых повреждениях, обусловленных феноменом ядрышкового стресса.

Таким образом, обнаруженные нами при гипергомоцистеинемии изменения количества ядер гепатоцитов и области ядрышкового организатора

сопровожаются нарушением ядерно-ядрышковых взаимоотношений, что укладывается в понятие феномена «ядрышкового стресса». Известно, что ключевой особенностью эволюционно консервативного интегрированного стрессового ответа является концепция, согласно которой семейство протеинкиназ фосфорилирует эукариотический иницирующий фактор трансляции (eIF2), подавляя общий синтез белка для сохранения клеточных ресурсов (Jonsson W.O., Margolies N.S., Anthony T.G., 2019). Таким образом, гипергомоцистеинемия как повреждающий стрессовый стимул, приводит не только к внутриклеточному стрессу эндоплазматической сети (Ji C., Kaplowitz N., 2004; Yang K., Yang J., Yi J., 2018; Majumder A. et al., 2019), но и инициирует формирование нуклеолярного стресса, возможно, обусловленного влиянием гомотеина на хроматин и гистоновые белки (Roy D.G. et al., 2020) и сопровождается дезорганизацией системы биосинтеза белковых продуктов в целом.

Гипергомоцистеинемия влияет на иммунный статус организма. D.G. Roy et al. (2020), S.Tang, X. Li, J.W. Locasale (2020) сообщают о метионине как «питательном факторе» для активированных Т-клеток, который поддерживает метилирование гистоновых белков H3K4 и опосредует функции, влияющие на аутоиммунные заболевания.

Макрофаги являются клетками иммунной системы, их присутствие и активизация в ткани железы доказывают факт иммунной перестройки организма при гипергомоцистеинемии. В процессе эксперимента нами выявлена ГГЦ-стимулированная экспрессия CD-68+ популяции макрофагов печени, обладающих провоспалительной направленностью. При гипергомоцистеинемии повышается как количество CD-68-позитивных клеток, так и интенсивность их свечения. CD-68 – белок-макросиалин, является трансмембранным белком и маркирует макрофаги M1-фенотипа (провоспалительного характера). Его значимое увеличение в печени указывает на наличие реактивного воспаления в железе. Клетки Купфера – это самообновляющиеся, резидентные и, в основном, не

мигрирующие фагоциты, обеспечивающие клеточный гомеостаз. Повреждение печени вызывает их активацию, что сопровождается высвобождением воспалительных цитокинов и хемокинов. Инфильтрация моноцитами приводит к образованию в печени большого количества воспалительных моноцитарных макрофагов (Tacke F., 2017).

На факт взаимосвязи повышенного количества метионина в крови и увеличения популяции макрофагов печени указывает ряд авторов (Dos Santos L.M., da Silva T.M., 2017; Franceschi T.S., Soares M.S.P., Pedra N.S., 2020). Обработка культуры макрофагов метионином и/или сульфоксидом метионина изменяет внеклеточный метаболизм нуклеотидов, способствует увеличению активности АТФазы/АДФазы в макрофагах (Dos Santos L.M., da Silva T.M., 2017).

Возможно также, что нарушение иммунитета может быть отчасти обусловлено измененным режимом питания, что сопровождается изменением состава комменсальной микробиоты кишечника, которая, по данным ряда авторов, обладает гепатопротекторными свойствами (Ye J.Z. et al., 2018; Schneider K.M. et al., 2019).

Еще одной популяцией клеток печени, которая оказывается активно задействована при гипергомоцистеинемии, являются клетки Ито (звездчатые клетки печени). Звездчатые клетки через пространство Диссе взаимодействуют с клетками Купфера и гепатоцитами, они оказывают влияние друг на друга за счет непосредственного контакта и паракринных взаимодействий (Kubes P., Jenne C., 2018; Bonnardel J. et al., 2019; Mishra V.K. et al., 2020). Активации звездчатых клеток Ито способствует гибель гепатоцитов, внеклеточные сигналы от резидентных и воспалительных клеток, включая макрофаги, естественные киллерные клетки, тромбоциты (Людуп А.В. и др., 2010; Tsuchida T., Friedman S.L., 2017). В спокойном (неактивированном) состоянии звездчатые клетки представляют собой тип интерстициальных клеток, характеризующихся способностью накапливать ретиноиды в липидных везикулах. При патологических состояниях они теряют свое ретиноидное содержание и

превращаются в фибробластоподобные клетки, способствуя фиброгенному ответу (Senoo H. et al., 2017; Carmona R., Barrena S., Muñoz-Chápuli R., 2019; Kisseleva T., Brenner D., 2020; Terkelsen M.K. et al., 2020). В эксперименте нами отмечено увеличение количества и размеров клеток Ито, при гипергомоцистеинемии они формируют группы, располагаются цепочками, экспрессируя значительное количество продукта гистохимической реакции. Интенсивность свечения маркируемого белка α -SAM (гладкомышечный актин) при гипергомоцистеинемии увеличивается в 1,5 раза, что свидетельствует о начале фиброгенеза в печени (Higashi T., Friedman S.L., Hoshida Y., 2017; Tsuchida T., Friedman S.L., 2017; Parola M., Pinzani M., 2019).

Клетки Ито также участвуют и в других функциях, включая вазорегуляцию, детоксикацию лекарств, иммунотолерантность и поддержание популяции гепатоцитов (Rohilla R. et al., 2016; Baffy G., 2018; Rohilla S., Bhatt D.C., 2018). Обнаруженное нами снижение объема функциональной паренхимы, увеличение популяции макрофагов с фенотипом M1, воспалительные инфильтраты в ткани печени могут быть напрямую связаны с активизацией звездчатых клеток. Измененный статус клеток Ито, обладающих сократительной активностью, может оказывать регулирующее влияние на кровоток в синусоидных капиллярах подобно перицитам (Trivedi P., Wang S., Friedman S.L., 2021).

Изменению сосудов при гипергомоцистеинемии придают особое значение в связи с воздействием повышенных доз гомоцистеина на эндотелиальную выстилку (Leng Y.P. et al., 2018; Chen Y. et al., 2019). Считается доказанным, что гомоцистеин оказывает первичное и выраженное влияние на эндотелий кровеносных сосудов, приводя к микроангиопатии, снижая активность эндотелиального производного – оксида азота (Sen U. et al., 2010; Toda N., Okamura T., 2016; Koller A. et al., 2018). Метаболиты из гипергомоцистеинемического эндотелия могут изменять компоненты нижележащих мышечных клеток, приводя к сосудистой дисфункции (Toda N., Okamura T., 2016; Koller A. et al., 2018). Повреждаться при гипергомоцистеинемии

могут сосуды головного мозга (Rosi J. et al., 2018; Wang Q. et al., 2020), сердца (Fu Y., Wang X., Kong W., 2018; Li T. et al., 2018), почек (Tan W., Abd Ghani F., Seong Lim C.T., 2019; Gao N. et al., 2020), конечностей (Lazzerini P.E. et al., 2010). Нами выяснено, что повышенный уровень гомоцистеина в крови затрагивает микроциркуляторное кровеносное русло печени, площадь которого резко увеличивается. Вокруг центральных вен отмечается формирование разной величины воспалительных лейкоцитарных инфильтратов. Известно, что в патогенезе сосудистых повреждений участвуют циркулирующие лейкоциты, включая моноциты/макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы (Fu Y., Wang X., Kong W., 2018), увеличение числа которых в крови продемонстрировано нами у экспериментальных животных. Одновременное снижение клеточной массы и увеличение площади сосудистого компонента железы при действии повышенных доз гомоцистеина могло бы свидетельствовать о застое крови, однако проведенный расчет коэффициента массы (масса органа/масса тела) для печени не изменяется (повышение на 8,8% является недостоверным, $p > 0,05$). Следовательно, можно предположить дисфункцию сосудов без выраженного застоя и гипертензии сосудистого русла печени, что согласуется с данными литературы о развивающейся при гипергомоцистеинемии дисфункции эндотелия (Rodríguez-Nieto S. et al., 2002; Toda N., Okamura T., 2016; Koller A. et al., 2018; Stojanović M. et al., 2018).

Реакция сосудов печени при сформировавшейся устойчивой умеренной форме гипергомоцистеинемии у крыс неоднозначна. На различных участках могут быть как расширение, так и спазмирование сосудов, опустошение или полнокровие. Выраженные изменения касаются площади синусоидных капилляров. Коэффициент Визотто, отражающий соотношение площади синусоидов к площади гепатоцитов, при гипергомоцистеинемии увеличивается в 4,5 раза ($p < 0,05$), что может быть связано как с увеличением площади гемокapилляров сосудистого русла, так и со снижением общей площади, занимаемой гепатоцитами. При гипергомоцистеинемии значимо увеличиваются

как диаметр, так и площади сосудов. Так, площадь центральной вены возрастает в 5,59 раза, междольковой артерии – в 1,85 раза, междольковой вены – в 2,12 раза ($p < 0,05$). В целом, морфологические критерии свидетельствуют о преобладании процессов дилатации в структурных составляющих микрогемоциркуляторного русла, которые затрагивают как системы притока, так и оттока крови на органном уровне, отражая, по всей видимости, системные поражения сосудистого русла. Обнаруженному нами при гипергомоцистеинемии увеличению объема соединительной ткани вокруг сосудов могут способствовать активированные клетки Ито, синтезирующие большое количество компонентов внеклеточного матрикса, включая коллаген, протеогликаны, гликозаминогликаны и адгезивные гликопротеины (Senoo H., 2004; Senoo H. et al., 2017; Luangmonkong T. et al., 2018). Эффект вазодилатации сосудистого русла в печени скорее всего обусловлен сложным сочетанием повышенного содержания гомоцистеина в крови, его цитотоксического влияния на эндотелиальную выстилку сосуда и возможного повреждения самого органа избыточными дозами пищевого метионина.

Состояние гипергомоцистеинемии и сопутствующая ему гепатопатия требует коррекции препаратами, одним из которых может являться оротовая кислота. Калия оротат – калиевая соль оротовой кислоты, позиционируется как источник оротовой кислоты, негормональное анаболическое средство с общим стимулирующим действием на обменные процессы. Всасывание оротатов происходит в тонком кишечнике, поглощение осуществляется в печени и почках, однако точный молекулярный механизм поступления в клетку в значительной степени неизвестен (Miura D. et al., 2011). Молекула оротовой кислоты хорошо известна как существенный промежуточный продукт синтеза пиримидина *de novo*. Для использования в пути рециркуляции пиримидин может быть поглощен эритроцитами и гепатоцитами для превращения в уридин (Löffler M. et al., 2015). Исследование Rosenfeldt F.L. с соавт. (1998) показало, что введение оротовой кислоты приводит к увеличению содержания сначала печеночного уридина и

цитидина, а затем к увеличению содержания уридина и цитидина в плазме крови. Через обмен нуклеиновых кислот оротовая кислота способна стимулировать кроветворение, а также регенерационные процессы в печени и сердце.

Соли оротовой кислоты слабо растворимы в воде и, как следствие, плохо усваиваются из желудочно-кишечного тракта. Методом, позволяющим изменить физико-химические свойства вещества, является способ механоактивации (Авакумов Е.Г., Болдырев В.В., 2009), с помощью которого получен ряд лекарственных препаратов, обладающих биологическими преимуществами по сравнению с исходными аналогами (Рыбин Д.С. и др., 2013; Чучкова Н.Н. и др., 2018). Известно, что фармацевтический эффект лекарственных препаратов, находящихся в различных изомерных формах, обычно обусловлен одной из них, другие могут быть неактивны или проявлять противоположные свойства (McConathy J., Owens M.J., 2003; Chhabra N., Aseri M.L., Padmanabhan D., 2013; Camille G.W., Aldous D., Raboisson P., 2015; Mao F. et al., 2016). Обработка в высокоэнергетичных мельницах приводит к различным превращениям в органических веществах, которые можно разделить на две группы (Дубинская А.М., 1989). Первую группу процессов составляют изменения, сопровождающиеся разрывом внутримолекулярных межатомных связей, деструкцией существующих соединений и образованием новых. Вторую группу составляют процессы, связанные с разрывом межмолекулярных связей, что приводит к изомерным превращениям, изменениям стерической структуры молекул (конформационные превращения), изменениям кристаллической структуры вещества (нанокристаллизация, аморфизация, полиморфные переходы). Обе группы преобразований приводят к изменениям физико-химических свойств вещества, его реакционной способности и биологических свойств. Выяснение закономерностей формирования биологических свойств органических веществ может стать основой эффективных технологий получения активных лекарственных препаратов.

Таутомерия – одна из форм изомерии, при которой происходит внутримолекулярная миграция иона водорода (протона), сопровождающаяся превращением одинарной связи в двойную или наоборот. Изменение изомерной формы влечет за собой изменение физико-химических свойств препаратов, а это, в свою очередь, влияет на активность лекарственного препарата (Wermuth C. G., Aldous D., Raboisson P., 2015). Соли оротовой кислоты имеют три таутомерных изомера оротат-аниона:

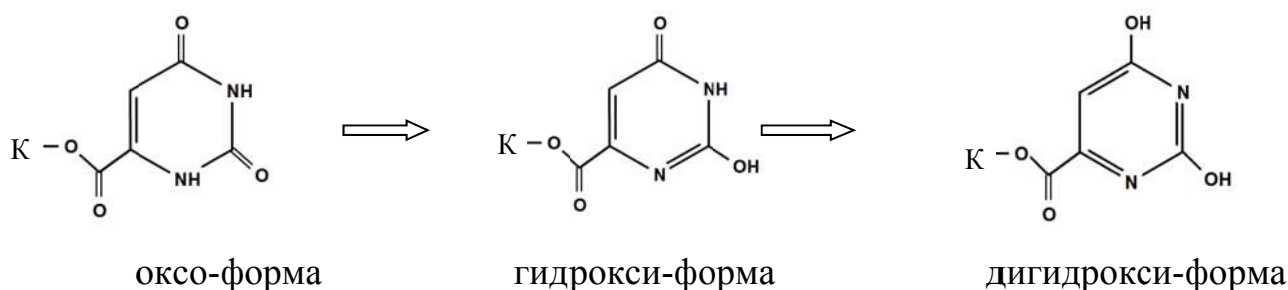


Рисунок 5.1 – Строение таутомеров оротат-аниона. Различие в количестве и составе функциональных групп: в оксо-форме присутствуют 2 группы: –NH- и C=O, в гидрокси-форме присутствуют 4 группы: –N=, C=O, –NH-, C–OH, в дигидрокси-форме присутствуют 2 группы: –N= и C–OH

Гидрокси- и дигидрокси-формы ранее не были получены, поскольку в твердом состоянии они переходят в наиболее устойчивую оксо-форму, которая и доминирует в составе лекарственного препарата. Механоактивация калия оротата в планетарной шаровой мельнице сопровождается формированием таутомеров оротовой кислоты, переходом оксо-формы сначала в гидрокси- (длительность обработки 1 час), а затем в дигидрокси-форму (длительность обработки 6 часов). Полученные формы устойчивы и способны к хранению в эксикаторе в течение нескольких месяцев.

Механоактивация калия оротата сопровождалась уменьшением размеров частиц порошков (до нанометрового диапазона), повышением дисперсности порошков, что обуславливает большую поверхность взаимодействия частиц с

водой, формированием аморфно-кристаллического состояния оротатов, что, что, в итоге, привело к увеличению растворимости и скорости растворения в воде. Увеличение растворимости в воде обусловлено также и различным строением оротат-аниона: гидроксильная группа, присоединенная к гетероциклу, обеспечивает подвижность водорода и способность диссоциировать в водных растворах.

В биологических системах необходимым условием является перенос препарата к месту действия, адсорбции его на клеточной мембране, взаимодействие функционально активных групп вещества с биомолекулами плазмолеммы, гидрофильность или гидрофобность вещества. В процессе механоактивации изменялась площадь гидратации оротат-аниона из-за изменения состава функциональных групп ($=O$ и $-OH$) таутомерных структур, что сопровождалось уменьшением объема гидратных оболочек вокруг оротат-анионов, т.е. увеличением их гидрофобности. Наибольшая гидрофобность характерна для гидрокси-формы оротат-аниона – во-первых, за счет образования ароматического гетероциклического кольца, во-вторых, за счет появления карбонильной группы, которая более липофильна в сравнении с карбоксильной группой. Ароматическая форма особенно существенна для проявления биологической активности, так как только в данной форме возможно образование водородных связей между остатками азотистых оснований в цепях нуклеиновых кислот.

Механизм взаимодействия действующего вещества с биомембраной клетки определяется стерическими факторами, например, разнообразием функциональных групп в молекуле. Наибольшее число разнообразных функциональных групп присуще гидрокси-форме оротат-аниона (Рисунок 5.1): она содержит пиррольный и пиримидиновый атомы азота, одну карбонильную и одну гидроксильную группы, что обеспечивает большее число мест взаимодействия с цитолеммой.

Выдвинутая гипотеза о различном биологическом действии таутомеров с измененными физико-химическими свойствами была проверена нами в экспериментах с введением разных форм таутомеров в организм животных.

В экспериментах было выяснено, что концентрация гомоцистеина в крови через 3 недели введения препаратов оротовой кислоты снижалась у всех экспериментальных животных независимо от вводимой таутомерной формы, однако более выражено снижение происходило в группах с введением механоактивированных препаратов. В работе Shimamoto с соавт., (2020), проведенной на цыплятах-бройлерах, показано, что оротовая кислота влияет на деградацию гомоцистеина.

Введение калия оротата благоприятно сказывалось на данных биохимического профиля экспериментальных животных. В крови крыс снижались уровни аланин- и аспаратаминотрансферазы, общего билирубина. Однако между показателями в группах с введением таутомерных форм препарата имелся ряд различий, подтвержденных с помощью сравнительного анализа статистических данных в программе MANOVA. Наиболее значимо эти различия касались фермента уровней содержания АСТ (он увеличивался в сравнении с группой ГГЦ при введении оксо- и дигидрокси-форм оротат-аниона), триглицеридов (увеличивались в сравнении с группой умеренной ГГЦ при введении исходной формы ОК) и ОХС (увеличивались в сравнении с группой ГГЦ при введении исходной формы ОК), ЛПВП (снижались в сравнении с группой ГГЦ при введении дигидрокси-формы ОК). Введение таутомеров оксо- и дигидрокси-форм оротовой кислоты при гипергомоцистеинемии ухудшало показатели липидного профиля. Возможно, ухудшение липидного состава крови могло быть связано с видовыми особенностями реакции экспериментальных животных на препарат. Согласно данным ряда авторов (Bang W.S. et al., 2019; Subali D. et al., 2020; Li Z. et al., 2021), у крыс, в отличие от мышей и других грызунов, оротовая кислота может индуцировать жировую болезнь печени. В наших экспериментах

исключение составила группа с введением гидрокси-таутомера, показатели которой оказались наиболее близки к данным интактного контроля.

В работе Громовой О.А. с соавт., (2015), посвященной исследованию механизмов действия оротовой кислоты, указывается на сходство молекулярной структуры оротат-аниона с нестероидными противовоспалительными препаратами, что, согласно предположению авторов, объясняет возможность взаимодействия его с циклооксигеназой; последнее, в свою очередь, снижает активность провоспалительных простагландинов. Согласно полученным нами данным, введение гидрокси-формы оротат-аниона снижало выраженность лейкоцитоза и содержание лейкоцитов было сравнимо с показателями интактного контроля, тогда как количество лейкоцитов, гранулоцитов, моноцитов в группах с введением оксо- и дигидрокси-форм продолжало увеличиваться и оставалось стабильно выше контрольных значений. Введение гидрокси-таутомера привело к повышению уровня эритроцитов и гемоглобина, снизило выраженность тромбоцитоза в отличие от двух других экспериментальных групп. В целом, эффективность действия по совокупности влияния таутомерных форм оротат-аниона на показатели крови при коррекции умеренной гипергомоцистеинемии можно представить следующей последовательностью: гидрокси-форма > оксо-форма > дигидрокси-форма.

На клеточном уровне коррекция гипергомоцистеинемии препаратами, содержащими оротат-анион в различных формах, привела к восстановлению количества гепатоцитов (более выражено – при использовании механомодифицированных форм препарата: исходной (оксо-формой) оротовой кислоты до 68,0% от интактного контроля и до 84,5% и 86,8% при введении гидрокси- и дигидрокси-форм препарата соответственно. Исследование показало, что введение оротовой кислоты оказывает основное влияние на ядро клетки, что вполне объяснимо с точки зрения механизма действия ОК. Известно, что оротовая кислота является промежуточным продуктом синтеза пиримидиновых нуклеотидов (оротидинфосфата, уридинтрифосфата, цитидинтрифосфата)

(Löffler M., Carrey E.A., Zameitat E., 2016), и ее основной наиболее вероятный механизм действия осуществляется через увеличение синтеза УМФ и других уридинфосфатов (Громова О.А. и др., 2015), обладающих цитопротективным действием (Choi J.W. et al., 2008; Bulion V.V., Selina E.N., Krylova I.B., 2019; Neumann J., Hofmann B., Gergs U., 2019). Введение гидрокси-формы ОК привело к увеличению в гепатоцитах количества ядер (в том числе за счет появления значительного количества двуядерных гепатоцитов) и суммарной площади, занимаемой ядерным аппаратом, в отличие от его исходного аналога (оксо-формы ОК). Таким образом, механомодифицированный препарат в гидрокси-форме оказывал более активное биологическое и терапевтическое действие в коррекции гепатопатии, вызванной избытком гомоцистеина в крови.

На фоне введения препаратов оротовой кислоты независимо от варианта таутомерной структуры отмечалось улучшение морфометрических показателей, характеризующих область ядрышкового организатора ядер гепатоцитов (количество и расположение ЯОр, гранулярной составляющей ЯОр), что свидетельствует о снижении выраженности гомоцистеин-индуцированного ядрышкового стресса. При этом интенсивность ядерно-нуклеоплазматического транспорта субъединиц рибосом, оцениваемая по количеству экстрануклеолярных аргирофильных включений, была наиболее близка к контрольным данным только в группе с введением гидрокси-формы препарата ОК.

Введение таутомеров оротовой кислоты снижало число Ki-67-положительных клеток и пролиферативный индекс у животных всех групп. Наиболее активным действием в отношении клеточной пролиферации себя показала оксо-форма препарата. В работах S. Manjeshwar с соавт. (1992, 1993), A. Sheikh с соавт. (1993) по исследованию механизмов действия оротовой кислоты указывается на ее митоз-ингибирующее действие, что предположительно, может быть связано с изменением нуклеотидного пула и снижением экспрессии гена рибонуклеозиддифосфатредуктазы. Учитывая факт того, что пролиферирующие гепатоциты составляют регенерационный резерв,

мягкое ингибирующее действие механомодифицированных препаратов оротовой кислоты (гидрокси- и дигидрокси-форм) следует считать положительным моментом в отношении восстановления клеточного гомеостаза в органе. В частности, это подтверждается полученными данными по более полному восстановлению клеточной популяции гепатоцитов при воздействии на организм животных гидрокси-формы препарата.

Противовоспалительное действие оротовой кислоты (более выраженное у гидрокси-формы препарата), регистрируемое по анализам крови экспериментальных животных, подтверждалось изменением популяции CD-68+ макрофагов печени. Известное разделение клеток Купфера на фенотипы M1 или M2 (You Q. et al., 2013) предполагает их адаптацию к местному микроокружению во время прогрессирования повреждения печени в зависимости от высокого разнообразия высвобождения цитокинов, маркеров клеточной поверхности и различных транскрипционных профилей (Tian S., Chen S.Y., 2015; Ельчанинов А.В. и др., 2019). Согласно полученным данным, количество макрофагов провоспалительной направленности M1 и интенсивность их свечения снижались только в печени крыс, получавших препараты после механомодификации – гидрокси- и дигидрокси-формы. В группе животных с введением оксо-формы препарата ОК, не подвергавшейся механообработке, количество макрофагов не изменялось. Клетки Купфера принадлежат к ретикулоэндотелиальной системе печени, высокодинамичной и сложной сети, которая представляет собой первичную линию защиты от вторгающихся микроорганизмов, функционируют как датчик измененной целостности тканей и в значительной степени способствуют поддержанию тканевого гомеостаза. Макрофаги занимают критическое положение в патогенезе повреждения и репарации печени, при котором инфильтрация ими рассматривается как основной признак острых, либо хронических заболеваний печени. Учитывая решающую роль макрофагов в заболеваниях печени (Sato K. et al., 2016; Li P. et al., 2017; van der Heide D., Weiskirchen R., Bansal R. et al., 2019), активное снижение их

представительства в железе при воздействии механоактивированных препаратов следует считать прогностически благоприятным признаком.

Влияние оротовой кислоты отражается также и на популяции звездчатых клеток печени. Введение таутомерных форм оротат-аниона снижало повышенное при умеренной гипергомоцистеинемии количество клеток Ито во всех экспериментальных группах, но интенсивность экспрессии гистохимического продукта была меньше и сравнима с контрольными показателями только в клетках печени крыс с введением гидрокси-формы препарата. Интенсивность свечения отражает концентрацию вещества – продукта гистохимической реакции (Lipra H., 1980). Так, выраженность экспрессии α SAM (маркер активированных фибробластических клеток Ито) в группе с введением гидрокси-формы была достоверно ниже (в 1,8 раза, $p=0,0001$), чем у крыс с гипергомоцистеинемией, и сравнима с контрольными показателями, что свидетельствует об ослаблении фиброгенеза у этой группы животных. Тогда как в группах крыс, получавших оксо- и дигидрокси-формы ОК, отличий от показателей, полученных при гипергомоцистеинемии, не наблюдалось. Более того, количество и интенсивность свечения клеток у животных этих групп были выше контрольных данных в 1,5 раза ($p=0,0001$).

Таким образом, только в группе с введением гидрокси-формы оротовой кислоты за счет модуляции активности клеток Ито снижается риск развития фибротических осложнений и обеспечивается возможность регенерации печени. Ослабление фиброза печени за счет селективного апоптоза звездчатых клеток показано для ряда лекарственных препаратов (Chong L.W. et al., 2015; Martí-Rodrigo A. et al., 2020; Romualdo G.R. et al., 2021). Необходимо учитывать, что динамические взаимодействия между многочисленными популяциями иммунных клеток в печени являются ключом к поддержанию баланса и устойчивости морфологического гомеостаза тканей (Kubes P., Jenne C., 2018).

Протективный эффект введения оротовой кислоты на клеточные популяции печени оказывал положительное влияние и на органном уровне, что отражалось в

изменениях микроциркуляторного кровеносного русла железы. В группах животных, которым вводились препараты оротовой кислоты, гомоцистеин-индуцированная дилатация сосудов становилась менее выраженной, хотя полной нормализации параметров не происходило. Так, совокупная площадь, приходящаяся на кровеносные микрососуды, снижалась по сравнению с животными из группы с гипергомоцистеинемией, но все-таки оставалась выше контрольных значений. Последнее, предположительно, может быть связано с относительно кратким курсом введения препаратов. Нами отмечено, что у животных, получавших дигидрокси-форму оротовой кислоты, наблюдается тенденция к снижению морфометрических показателей ниже контрольных уровней в системе притока крови (междольковые вена и артерия) и совокупной площади синусоидов. Возможно, в случае применения этой формы таутомера мы наблюдаем его вазоконстрикторное действие. Суммируя показатели, полученные при морфометрическом анализе кровеносных микрососудов печени, можно сделать вывод, что эффективность действия таутомеров оротат-аниона на кровеносное русло печени различна и может быть представлена следующей последовательностью: гидрокси-форма > оксо-форма > дигидрокси-форма. Ингибирующее влияние оротовой кислоты на инсулин- и метформин-индуцированную вазодилатацию отмечено в работе Choi Y.J. с соавт. (2015).

Таким образом, наиболее выраженным нормализующим эффектом в отношении гипергомоцистеинемической вазодилатации микрососудов кровеносного русла печени обладает гидрокси-форма оротат-аниона.

В целом, отмеченные различия в эффективности разных форм оротовой кислоты объясняются изменением физико-химических свойств препаратов. Так, этим эффектам способствует повышение скорости растворения механомодифицированных форм оротовой кислоты в воде за счет снижения размеров кристаллитов порошка, перехода частиц в нанодисперсное состояние (без изменения кристаллической решетки). Кроме того, переход частиц препарата в нанодисперсное состояние повышает адсорбцию лекарственного средства в

кишечнике. Увеличение скорости растворения препаратов гидрокси- и дигидрокси-форм оротовой кислоты способствует активному проникновению лекарственного вещества через мембрану клеток желудочно-кишечного тракта и, как следствие, более быстрому накоплению в тканях с последующей высокой эффективностью биологического ответа.

Полученное в экспериментах на животных преимущество гидрокси-формы оротовой кислоты в отношении купирования последствий, вызванных гипергомоцистеинемией, можно связать также с наличием большего количества функционально активных групп в молекуле таутомера, что обеспечивает большее количество мест связывания с плазмолеммой клетки. Исследованиями на изолированных клетках человека (буккальные эпителиоциты и эритроциты) и крысы (эритроциты) было установлено, что электрофоретическая подвижность клеток наиболее высока при погружении их в раствор, содержащий гидрокси-форму оротовой кислоты (Чучкова Н.Н. и др., 2018). Nassani A. с соавт. (2019) показали, что наночастицы оротовой кислоты, полученные методом сублимационной сушки, проявляют *in vitro* мощный ингибирующий эффект АПФ, что позволило авторам предложить композицию наночастиц оротовой кислоты для использования в целях повышения антиоксидантных и антигипертензивных свойств.

Таким образом, различные таутомеры оротат-аниона оказывают неодинаковые по выраженности эффекты действия на клеточном и органном уровнях, обеспечивая различный гепатопротекторный эффект. По совокупности данных наиболее выраженный результат присущ гидрокси-форме оротат-аниона, что связано с ее физико-химическими особенностями. Это предполагает целесообразность дальнейшего исследования ее в условиях клинической апробации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Избыточное поступление пищевого метионина в организм экспериментальных животных нарушает процессы его трансметиличирования в серосодержащую аминокислоту гомоцистеин в печени, следствием чего является состояние гипергомоцистеинемии. Повышенная функциональная нагрузка на клетки печени приводит к избытку гомоцистеина в крови, что вызывает морфологические изменения на тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Показатели развивающейся дисфункции печеночной ткани в наших экспериментальных исследованиях: увеличение количества маркерных ферментов печени (АСТ, АЛТ), билирубина, ухудшение липидного профиля (повышение уровня триглицеридов, тенденция к повышению уровня холестерина ЛПНП), воспалительные изменения крови (лейкоцитоз, моноцитоз), снижение количества эритроцитов и гемоглобина, тромбоцитоз. Морфологические изменения в печени представлены снижением объема функциональной паренхимы (совокупной площади гепатоцитов), количества ядер гепатоцитов и их совокупной площади, формированием нуклеолярного стресса. Альтерация печени при умеренной гипергомоцистеинемии сопровождалась активацией звездчатых макрофагов с провоспалительным фенотипом CD-68+ (клеток Купфера), повышению экспрессии клеток Ито, обладающих в активированном состоянии фиброгенным эффектом, увеличению экспрессии Ki-67-положительных клеток. Измененный метаболизм гомоцистеина оказал выраженное действие на внутриорганный кровообращение, что проявилось в гомоцистеин-обусловленной дилатации микрососудистого русла печени.

Суммарный алгоритм действия можно представить краткой схемой (Рисунок 5.2):

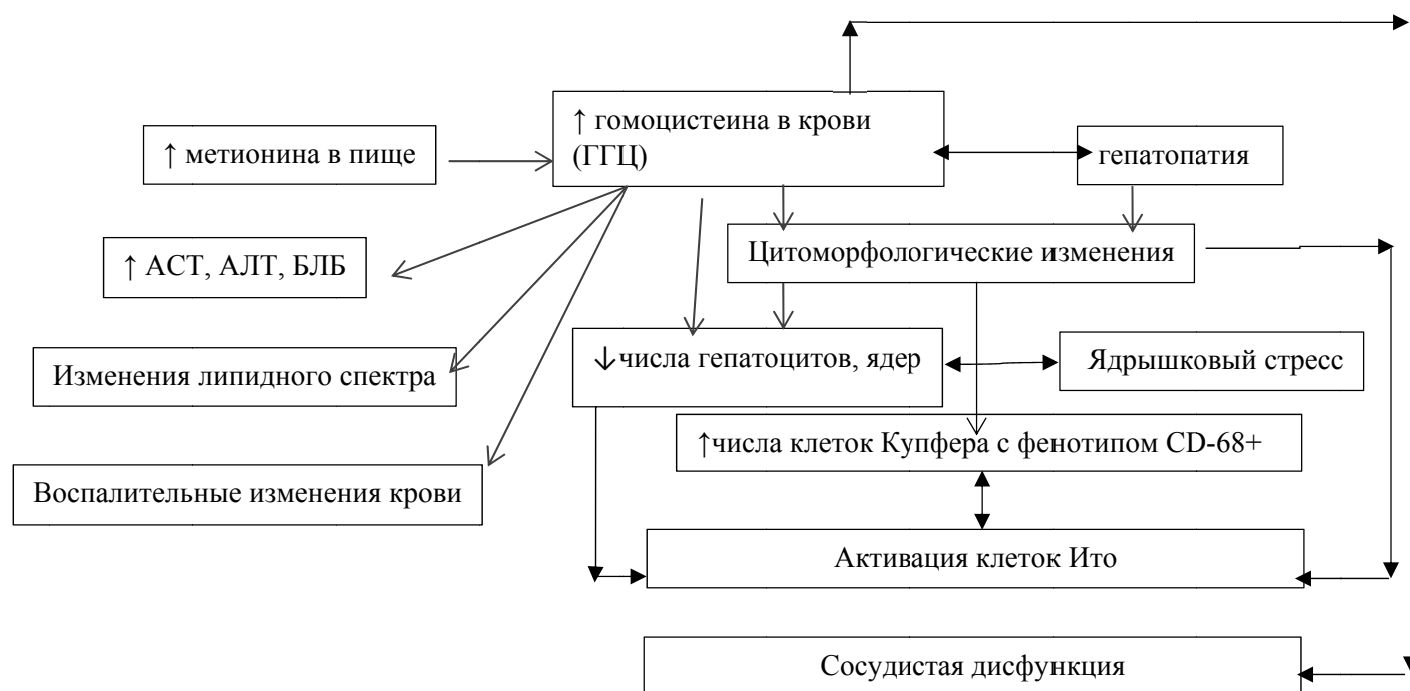


Рисунок 5.2 – Влияние повышенного уровня гомоцистеина на параметры печени и их взаимосвязь

С целью коррекции умеренной гипергомоцистеинемии экспериментальным животным вводились препараты оротовой кислоты, содержащие различные формы оротат-аниона, которые были получены с помощью механоактивации исходного препарата «Оротат калия». В процессе механоактивации исходной (оксо-формы) оротовой кислоты были получены таутомерные формы препарата в зависимости от длительности его обработки: гидроксиформа – после механоактивации в течение 1 часа, дигидроксиформа – после механоактивации в течение 6 часов. Впервые эти формы были получены в твердотельном варианте и отличались от присутствующей в исходном образце своими физико-химическими свойствами: изменялась их дисперсность (уменьшались размеры частиц порошка), в связи с чем увеличивалась растворимость и скорость растворения в воде, и растворимость в октаноле. По совокупности проанализированных физико-химических характеристик преимущество оказалось за гидроксиформой.

В целом оротовая кислота, независимо от варианта преобладающего в составе препарата оротат-аниона, обладала нормализующим действием на морфофункциональное состояние печени при гипергомоцистеинемии, однако таутомеры, вводимые экспериментальным животным, оказывали различный эффект. Введение препарата ОК в гидроксид-форме наиболее благоприятно сказывалось на данных биохимического профиля животных (понижались уровни АСТ и АЛТ), снижалась выраженность лейкоцитоза, повышалось количество эритроцитов и уровень гемоглобина, снижалась выраженность тромбоцитоза. Введение таутомеров оксо- и дигидроксид-форм оротат-аниона для коррекции ГГЦ в отличие от гидроксид-формы не только не улучшало, но даже ухудшало показатели липидного профиля (повышались: количество триглицеридов, общего холестерина, холестерина ЛПВП), уровня печеночных ферментов (повышалось количество АСТ при введении оксо-формы). Эффективность влияния разных таутомерных форм на ферментный состав, показатели белой и красной крови при коррекции умеренной гипергомоцистеинемии, можно представить следующей последовательностью: гидроксид-форма > оксо-форма >/~ дигидроксид-форма.

Динамические взаимодействия между многочисленными популяциями иммунных клеток в печени являются ключом к поддержанию баланса и устойчивости морфологического гомеостаза тканей. Более выраженное положительное влияние на клеточные популяции печени оказывает гидроксид-форма оротовой кислоты. Так, если введение исходной оксо-формы ОК приводило к восстановлению количества клеток до 68,0% от интактного контроля, то при использовании гидроксид-формы до 84,5%. Основное влияние все препараты ОК с разным составом оротат-аниона оказывали на ядро клетки, отмечалось улучшение морфометрических показателей ядрышкового организатора ядер гепатоцитов, что характеризовало снижение выраженности гомоцистеин-индуцированного ядрышкового стресса, однако степень проявления положительных изменений была более показательна для группы, получавшей гидроксид-форму ОК. В печени снижалось число Ki-67 положительных клеток и

пролиферативный индекс у животных всех групп, получавших таутомеры (резко – при введении исходного препарата и более мягко – при введении механомодифицированных форм). Количество звездчатых макрофагов провоспалительной направленности M1 и интенсивность их экспрессии также снижались после коррекции препаратами ОК в сравнении с группой гипергомоцистеинемии, но только в печени крыс, получавших механомодифицированные формы. Количество звездчатых клеток уменьшалось во всех экспериментальных группах, но интенсивность экспрессии гистохимического продукта была снижена и сравнима с контрольными показателями только в клетках печени крыс с введением гидроксиформы препарата ОК. В группах животных, получавших таутомеры оротат-аниона, становилась менее выраженной гомоцистеин-индуцированная дилатация сосудов, хотя полной нормализации микрогемодикуляторного русла при применении препаратов ОК не происходило.

Более выраженный эффект гидроксиформы на организм экспериментальных животных с умеренной гипергомоцистеинемией объясняется не только увеличением дисперсности порошка, а, следовательно, его растворимости и скорости растворения, но и тем, что оротат-анион в гидроксиформе несет четыре функциональные группы (в отличие от 2-х, представленных в оксо- и дигидроксиформами таутомеров), имеющих разную химическую природу ($-N=$, $C=O$, $-NH-$, $C-OH$), что расширяет возможность взаимодействия с клеточной мембраной по сравнению с оксо- и дигидроксиформами, в каждой из которых функциональные группы только двух типов ($-N=$ и $C=O$ в оксо-форме, $-NH-$ и $C-OH$ в дигидроксиформе).

Таким образом, введение препаратов оротовой кислоты оказывало противовоспалительный (преимущество имела гидроксиформа), цитопротекторный (преимущественное нормализующее действие на гепатоциты оказывала гидроксиформа), антифибротический (преимущество имела гидроксиформа), митоз-ингибирующий (отчетливо проявлялся у оксо-формы, менее

выраженно – у механоактивированных форм), ангиопротективный (лучшее действие проявляла гидрокси-форма) эффекты. Суммируя показатели, можно сделать вывод, что эффективность действия таутомеров оротовой кислоты различна и может быть представлена следующей последовательностью: гидрокси-форма > оксо-форма >/~ дигидрокси-форма (Рисунок 5.3).

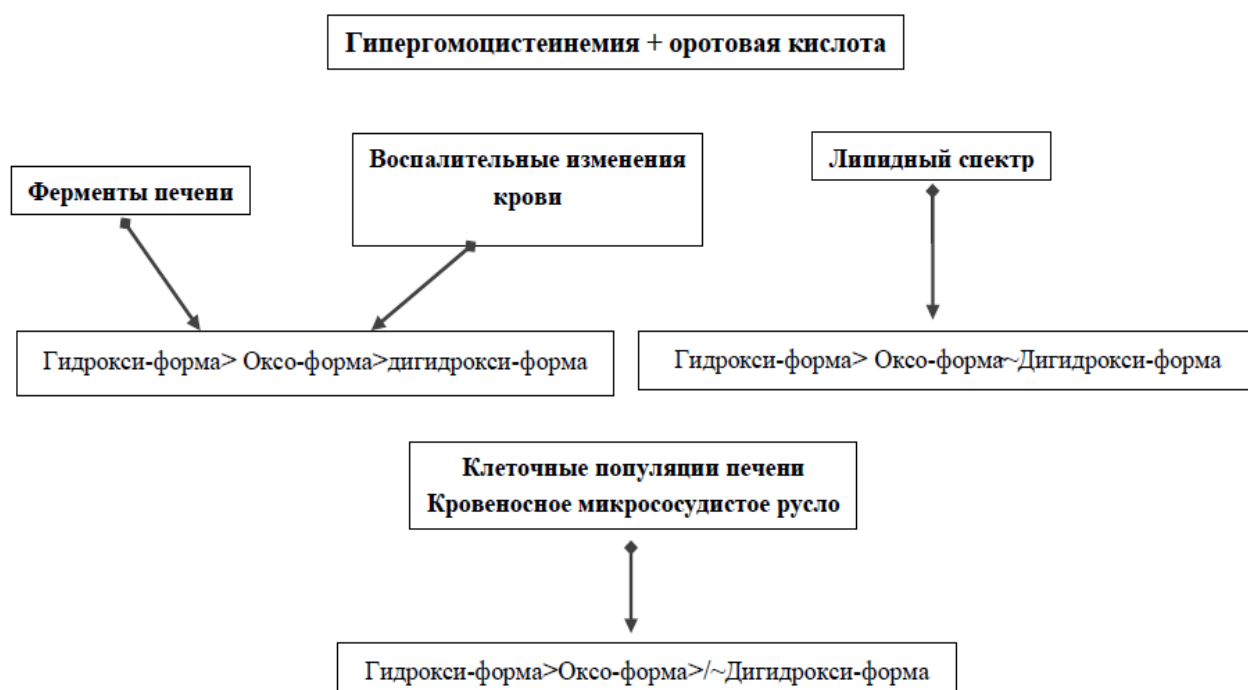


Рисунок 5.3 – Влияние таутомеров оротовой кислоты при коррекции умеренной гипергомоцистеинемии

ВЫВОДЫ

1. Умеренная форма гипергомоцистеинемии с уровнем гомоцистеина 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 приводит 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 октанолу; последовательным таутомерным превращениям оротат-аниона: оксо- → гидрокси- → дигидрокси-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.

РАСШИФРОВКА АББРЕВИАТУР И СОКРАЩЕНИЙ

- ГГЦ – гипергомоцистеинемия (умеренная гипергомоцистеинемия)
- CBS – цистатион- β -синтаза
- ОК – оротовая кислота
- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- ТГ – триглицериды
- ОХ – общий холестерин
- ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
- ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- ЯОр – ядрышковый организатор
- Ag-ЯОр – область ядрышкового организатора при окраске азотнокислым серебром
- ЗФР – забуференный физиологический раствор
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- MANOVA – многофакторный дисперсионный анализ
- ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ
- БЛБ – билирубин
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- МКО – массовые коэффициенты органов
- ИНГ – интрануклеоллярные гранулы
- ЭНГ – экстрануклеоллярные гранулы
- КК – Клетки Купфера
- α SAM – гладкомышечный α -актин
- РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
- ИОК – исходный оротат калия
- ОК-1 – оротат калия, 1 час механоактивации
- ОК-6 – оротат калия, 6 часов механоактивации

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакумов, Е.Г. Фундаментальные основы механической активации, механосинтеза и механохимических технологий / Е.Г. Авакумов, В.В. Болдырев. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. – 343 с.
2. Андриюшкова, О.В. Механохимия создания материалов с заданными свойствами: учебное пособие 2-е изд. / О.В. Андриюшкова, В.А. Полубояров, И.А. Паули. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2010. – 352 с.
3. Биомаркеры регуляции иммунного гомеостаза в печени / В.С. Красовский, А.К. Ажикова, Л.Г. Сентюрова, Б.В. Фельдман, М.А. Самотруева // Астраханский медицинский журнал. – 2020. – №1. – С. 73–84.
4. Болдырев, В.В. Механохимия и механическая активация твердых веществ / В.В. Болдырев // Успехи химии. – 2006. – Т. 75. – № 3. – С. 203–216.
5. Влияние механохимически активированного доксорубина и облучения с частотой 40 МГц на клетки карциномы легких человека А-549 / Н.Н. Дзятковская, А.В. Романов, Ю.И. Кудрявец [и др.] // Экспериментальная онкология. – 2004. – № 4. – С. 271–277.
6. Гомоцистеин вызывает повреждения не только клубочкового, но и канальцевого отдела нефрона (экспериментальное исследование) / А.В. Смирнов, В.А. Добронравов, А.И. Неворотин [и др.] // Нефрология. – 2005. – № 3. – С. 81–87.
7. Грабан, А.Ю. Гипергомоцистеинемия - независимый фактор риска атеросклероза / А.Ю. Грабан, Д. Рыглевич // Вестник ВГМУ. – 2003. – №3. – С. 14–18.
8. Григорьева, К.М. Рit-клетки как специфические натуральные киллеры печени человека // К.М. Григорьева // FORCIPE. – 2019. – № 2. – С. 365–366.
9. Громова, О.А. Метаболомный компендиум по магнию оротату / О.А. Громова, И.Ю. Торшин, А.Г. Калачева // Эффективная фармакотерапия. – 2015. – №44. – С. 14–26.

10. Дубинская, А.М. Механохимия лекарственных веществ / А.М. Дубинская // Хим.-фарм. журн. – 1989. – Т. 23. – С. 755–763.
11. Душкин, А.В. Механохимическая технология для повышения растворимости лекарственных веществ / А.В. Душкин, Л.П. Сунцова, С.С. Халиков // Fundamental research. – 2013. – № 1. – С. 448–457.
12. Зуев, М.Г. Новые материалы для медицины / М.Г. Зуев, Л.П. Ларионов. – Екатеринбург: УРО РАН, 2006. – 166 с.
13. Каркищенко, Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии / Н.Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2006. – №4. – С. 1–23.
14. Карпухин, С.Д. Атомно-силовая микроскопия / С.Д. Карпухин, Ю.А. Быков. – Москва: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2012. – 41 с.
15. Клиническая цитология печени: звездчатые клетки Ито / В.М. Цыркунов, В.П. Андреев, Р.И. Кравчук, И.А. Кондратович // Журнал ГрГМУ. – 2016. – Т. 4. – №56. – С. 90–99.
16. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
17. Кривошеева, Е.М. Спектр фармакологической активности растительных адаптогенов / Е.М. Кривошеева, Е.В. Фефелова, С.Т. Кохан // Фундаментальные исследования. – 2011. – №6. – С. 85–88.
18. Лазарева, Е.Ю. Патолофизиологические аспекты трансфузиологической помощи пациентам с циррозом печени / Е.Ю. Лазарева, А.В. Колосков // Вестн. хир. – 2019. – № 1. – С. 86–89.
19. Лебедева, А.Ю. Гипергомоцистеинемия: современный взгляд на проблему / А.Ю. Лебедева, К.В. Михайлова // Российский кардиологический журнал. – 2006. – Внеочередной выпуск. – С. 149–157.
20. Лебедева, Е. И. Клеточно-молекулярные механизмы фиброгенеза печени / Е. И. Лебедева, О.Д. Мяделец // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – № 2. – С. 119–126.

21. Ломовский, О.И. Прикладная механохимия: фармацевтика и медицинская промышленность / О.И. Ломовский // Обработка дисперсных материалов и сред: межд. периодический сб. научн. трудов. – Одесса, 2001. – Вып.11. – С. 81–100.
22. Лякишев, Н.П. Энциклопедический словарь по металлургии / Н.П. Лякишев. – М.: Интермет Инжиниринг, 2000. – 821 с.
23. Медведев, Д.В. Молекулярные механизмы токсического действия гомоцистеина / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Кардиологический вестник. – 2017. – № 1. – С. 52–57.
24. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2014. – №4. – С. 42–46.
25. Механоактивированный лекарственный препарат кальция глюконат: рентгеноструктурные, микроскопические и рентгеноэлектронные исследования / Г.Н. Коньгин, Ф.З. Гильмутдинов, С.Г. Быстров [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – Т. 13. – № 2. – С. 249–252.
26. Механохимическая солюбилизация пироксикама с использованием микрокристаллической целлюлозы, полученной способом каталитической делигнификации опилок древесины осины / С.А. Мызь, Т.П. Шахтшнейдер, А.С. Медведева [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2007. – Т. 15. – №6. – С. 677–682.
27. Механохимически индуцированные структурные превращения в глюконатах калия, натрия и кальция / Д.С. Рыбин, Г.Н. Коньгин, В.Е. Порсев [и др.] // Химическая физика и мезоскопия. – 2013. – №3. – С. 429–440.
28. Молекулярные аспекты прогрессирования фиброза печени алкогольной этиологии / Я.В. Киселева, Ю.О. Жариков, Р.В. Масленников, Ч.С. Павлов, В.Н. Николенко // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – №2. – С. 288–293.

29. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии / Я.И. Новгородская, Р.И. Кравчук, О.Б. Островская, М.Н. Курбат // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – № 1. – С. 93–98.
30. О роли синусоидальных клеток печени и клеток костного мозга в обеспечении регенераторной стратегии здоровой и поврежденной печени / А.В. Люндуп, Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – №1. – С. 78–85.
31. Осьмушко, И.С. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия твёрдых тел: теория и практика / И.С. Осьмушко, В.И. Вовна, В.В. Короченцев. – Владивосток, 2010. – 42 с.
32. Полиморфизм и свойства лекарственных средств / И.П. Рудакова, И.Г. Ильина, С.Я. Скачилова [и др.] // Фармация. – 2009. – №8. – С. 42–44.
33. Получение, физико-химические и биологические свойства таутомерных наночастиц препарата «МАГНЕРОТ» / О.М. Канунникова, О.В. Карбань, Н.Н. Чучкова [и др.] // Нанотехнологии. Наука и производство. – 2014. – Т. 4. – № 31. – С. 80–88.
34. Савицкая, А.В. Тезисы докладов 9 Всес. симпозиума Механохимия и механоэмиссия твердых тел / А.В. Савицкая, М.Л. Езерский. – М., 1990. – С. 47–49.
35. Сивкович, С.А. Применение механохимически активированных заряженных наночастиц доксорубина при полихимиотерапии больных злокачественными лимфомами / С.А. Сивкович, В.Э. Орел, Н.Н. Дзятковская // Онкология. – 2007. – Т. 9. – № 3. – С. 234–237.
36. Сметанина, М.В. Морфометрическая характеристика щитовидной железы при различных моделях атеросклероза / М.В. Сметанина // Морфологические ведомости. – 2014. – №1. – С. 106–111.
37. Создание антигельминтных препаратов повышенной эффективности на основе межмолекулярных комплексов действующих веществ с водорастворимыми полимерами, в том числе с полисахаридами / С.С. Халиков,

Ю.С. Чистяченко [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2015. – Т.23. – №5. – С. 567–577.

38. Сравнительное исследование эффективности применения таутомеров оротата магния для компенсации дефицита магния. Часть I. Влияние таутомеров оротата магния на изолированные клетки лабораторных животных и человека / Н.Н. Чучкова, М.М. Канунников, М.В. Сметанина, В.Б. Комиссаров, А.А. Соловьев // Уральский медицинский журнал. – 2018. – Т. 159. – № 4. – С. 141–146.

39. Сравнительное исследование эффективности применения таутомеров оротата магния для компенсации дефицита магния. Часть II. Влияние оксо- и гидроксиформы оротата магния на элементный состав крови и тканей органов лабораторных животных / Н.Н. Чучкова, М.В. Сметанина, В.Б. Комиссаров [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2018. – Т. 159. – № 4. – С. 147–153.

40. Структурные аспекты полиморфизма лекарственных веществ / Г.Н. Гильдеева, Д.Ф. Гуранда // Вестник РГМУ. – 2009. – № 6. – С. 74–79.

41. Тулегенова, А.У. Полиморфизм лекарственных веществ / А.У. Тулегенова // Казахстанский фармацевтический вестник. – 2002. – Т.157. – № 9.

42. Фенотипический полиморфизм клеток Купфера печени крыс в норме / А.В. Ельчанинов, А.В. Лохонина, А.В. Макаров [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 35–39.

43. Фетисов, Г.В. Синхротронное излучение: методы исследования структуры веществ / Фетисов Г.В.; под ред. Л.А. Асланова. – М.: Физматлит, 2007. – 672 с.

44. Физико-химические аспекты получения полиморфных модификаций лекарственных веществ / Н.Б. Леонидов, В.П. Шабатин, В.И. Першин, С.И. Савинова, О.Б. Серегина // Российский химический журнал. – 1997. – Т. 41. – №5. – С. 37–40.

45. Фролова, О. Е. Морфофункциональная характеристика моноцитов. Значение исследования нуклеолярного аппарата / О.Е. Фролова // Клинико-лабораторная диагностика. – 1998. – №10. – С. 3–8.
46. Цыркунов, В.М. Клиническая морфология печени: гепатоциты, эндомембранная система / В.М. Цыркунов, В.П. Андреев, Р.И. Кравчук // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – №1. – С. 28–42.
47. Шахтшнейдер, Т.П. Влияние механических воздействий на физико-химические свойства лекарственных веществ: дис. ... доктора хим. наук: 02.00.04 / Т.П. Шахтшнейдер. – Новосибирск, 2013. – 297 с.
48. Элбакидзе, Г.М. Механизмы протекторного действия активированных эндотоксином клеток Купфера на гепатоциты / Г.М. Элбакидзе // Вестник РАМН. – 2012. – № 5. – С. 48–54.
49. Эрназаров, К.К. Анализ расчета липофильности биологически активных веществ/ К.К. Эрназаров // Известия национальной академии наук Республики Казахстан. –2013. – Серия химии и технологии. – № 3. – С. 15–19.
50. A novel approach in the management of hyperhomocysteinemia / S.S. Qureshi, J.K. Gupta, A. Goyal, H. Narayan // Med Hypotheses. – 2019. – № 129.
51. AgNOR as an effective diagnostic tool for determining the proliferative nature of different types of odontogenic cysts / K.K. Tyagi, L. Chandra, M. Kumar [et al.] // J. Family Med. Prim. Care. – 2020. – №9. – P.125–130.
52. Al Mutairi, F. Hyperhomocysteinemia: Clinical Insights / F. Al Mutairi // J Cent Nerv Syst Dis. – 2020. – № 12. – P.1–8.
53. Alemán, G. Homocysteine metabolism and risk of cardiovascular diseases: importance of the nutritional status on folic acid, vitamins B6 and B12 / G. Alemán, A.R. Tovar, N. Torres // Rev Invest Clin. – 2001. – V. 53. – № 2. – P. 141–51.
54. Aljamali, N.M. Review Inchemical Structures of Drugs / N.M. Aljamali // International Journal of Engineering & Technology. – 2018. – № 7. – P. 644–654.
55. Ampuero, J. Influencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en la enfermedad cardiovascular [Influence of non-alcoholic fatty liver disease on

cardiovascular disease] / J. Ampuero, M. Romero-Gómez // *Gastroenterol Hepatol.* – 2012. – V. 35. – № 8. – P. 585–593.

56. Analgesic Effect of Several Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Nanoaerosols / S.V. An'kov, T.G. Tolstikova, A.A. Onishchuk [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 2016. – № 49. – P. 680–682.

57. Anatskaya, O.V. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion evidence from tissue-specific mammal transcriptome / O.V. Anatskaya, A.E. Vinogradov // *Funct Integr Genomics.* – 2010. – V. 10. – № 4. – P. 433–46.

58. Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells / S. Rodríguez-Nieto, T. Chavarría, B. Martínez-Poveda [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – V. 293. – № 1. – P. 497–500.

59. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages / W.K. Ip, N. Hoshi, D.S. Shouval, S. Snapper, R. Medzhitov // *Science.* – 2017. – V. 356. – № 6337. – P. 513–519.

60. Antioxidant Potential and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Orotic Acid-Loaded Gum Arabic Nanoparticles / A. Hassani, S.A. Hussain, N. Abdullah // *AAPS PharmSciTech.* – 2019. – V. 20. – № 2. – P. 53.

61. Application of physical methods of pharmacy to improve the properties of dosage forms / E.G. Zevak, A.G. Ogienko, S.A. Myz' [et al.] // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering.* – 2014. – № 48. – P. 722–732.

62. Association between human hair loss and the expression levels of nucleolin, nucleophosmin, and UBTF genes / S. Tasdemir, R. Eroz, H. Dogan [et al.] // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2016. – V. 20. – № 4. – P. 197–202.

63. Association of hyperhomocysteinemia with increased coronary microcirculatory resistance and poor short-term prognosis of patients with acute myocardial infarction after elective percutaneous coronary intervention / Y.P. Peng, M.Y. Huang, Y.J. Xue, J.L. Pan, C. Lin // *Biomed Res Int.* – 2020. – № 69. doi: 10.1155/2020/1710452.

64. Autophagy activation is required for homocysteine-induced apoptosis in bovine aorta endothelial cells / K. Sato, T. Nishii, A. Sato, R. Tatsunami // *Heliyon*. – 2020. – V. 6. – № 1. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03315.
65. Baffy, G. Origins of portal hypertension in nonalcoholic fatty liver disease / G. Baffy // *Dig Dis Sci*. – 2018. – V. 63. – № 3. – P. 563–576.
66. Baïbekova, E.M. Structure of the liver after correction of experimental chronic hepatitis with benzonal and potassium orotate / E.M. Baïbekova, L.I. Sultanova // *Arkh Anat Gistol Embriol*. – 1990. – V. 98. – № 2. – P. 88–94.
67. Baral, S.S. Nucleolar stress in *Drosophila* neuroblasts, a model for human ribosomopathies / S.S. Baral, M.E. Lieux, P.J. DiMario // *Biol Open*. – 2020. – V. 9. – № 4. doi: 10.1242/bio.046565.
68. Baßler, J. Eukaryotic ribosome assembly / J Baßler, E. Hurt // *Annu Rev Biochem*. – 2019. – № 88. – P. 281–306.
69. Beamson, G. High resolution XPS of organic polymers: the scienta ESCA 300 Database / G. Beamson, D. Briggs // *Wiley Interscience*. – 1992. – P. 306.
70. Blocking PERK reduces vascular smooth muscle cells from homocysteine-induced ER stress and apoptosis / W. Li, F. Shang, X. Li [et al.] // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2020. – № 25. – P. 536–548.
71. Boldyrev V.V. Mechanochemistry and mechanical activation of solids / V.V. Boldyrev // *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. Division of Chemical Science*. – 1990. – V. 39. – № 10. – P. 2029–2044.
72. Bulion, V.V. Zashchitnoe deĭstvie uridina na metabolicheskie protsessy v miokarde krys pri ego reperfuzionnom povrezhdenii [Protective effect of uridine on metabolic processes in rat myocardium during its ischemia/reperfusion damage] / V.V. Bulion, E.N. Selina, I.B. Krylova // *Biomed Khim*. – 2019. – V. 65. – № 5. – P. 398–402.
73. Carmona, R. Retinoids in Stellate Cells: Development, Repair, and Regeneration / R. Carmona, S. Barrena, R. Muñoz-Chápuli // *J Dev Biol*. – 2019. – V. 7. – № 2. – P.10.

74. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance / J. Kim, H. Kim, H. Roh [et al.] // Arch Pharm Res. – 2018. – № 41(4). – P.372–383.
75. Cell cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels / M. Sobecki, K. Mrouj, J. Colinge [et al.] // Cancer Res. – 2017. – V. 77. – № 10. – P. 2722–2734.
76. Characterization of macrophage phenotype, redox, and purinergic response upon chronic treatment with methionine and methionine sulfoxide in mice / T.S. Franceschi, M.S. Soares, N.S. Pedra [et al.] // Amino Acids. – 2020. – V. 52. – №4. – P. 629–638.
77. Chemical structure-related drug-like criteria of global approved drugs / F. Mao, W. Ni, X. Xu [et al.] // Molecules. – 2016. – V. 21. – № 1. – P. 75.
78. Chhabra, N. A review of drug isomerism and its significance / N. Chhabra, M.L. Aseri, D. Padmanabhan // Int J Appl Basic Med Res. – 2013. – V. 3. – № 1. – P. 16–18.
79. Chow, E.H. Mechanochemistry of magnesium oxide revisited: Facile derivatisation of pharmaceuticals using coordination and supramolecular chemistry / E.H. Chow, F. Strobridge, T. Friscić // Chem. Commun. – 2010. – № 4. – P. 6368–6370.
80. Classen, H.G. Magnesium orotate--experimental and clinical evidence / H.G. Classen // Rom J Intern Med. – 2004. – V. 42. – № 3. – P. 491–501.
81. Comparative Analysis of EPA/DHA-PL Forage and Liposomes in Orotic Acid-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Rats and Their Related Mechanisms / M. Chang, T. Zhang, X. Han // J Agric Food Chem. – 2018. – V. 66. – № 6. – P. 1408–1418.
82. Coronary microvascular and cardiac dysfunction due to homocysteine pathometabolism; A complex therapeutic design / A. Koller, A. Szenasi, G. Dornyei [et al.] // Curr Pharm Des. – 2018. – V. 24. – № 25. – P. 2911–2920.
83. Cottington, E.M. Adverse event associated with methionine loading test: a case report / E.M. Cottington // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2002. – V. 22. – №6. – P. 1046–1050.

84. Cysteine is a better predictor of coronary artery disease than conventional homocysteine in high-risk subjects under preventive medication / A. Lima, R. Ferin, A. Fontes [et al.] // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2020. – V. 30. – № 8. – P. 1281–1288.
85. Derenzini, M. The AgNORs / M. Derenzini // *Micron.* – 2000. – V. 31. – № 2. – P. 117–120.
86. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells / F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung [et al.] // *Science.* – 2010. – № 327. – P. 656–661.
87. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice / J. Zhou, J. Møller, C.C. Danielsen // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2001. – № 21. – P. 1470–1476.
88. Djuric, D. Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems / D. Djuric, V. Jakovljevic, V. Zivkovic, I. Srejovic // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2018. – V. 96. – № 10. – P. 991–1003.
89. Dubinskaya, A.M. Mechanochemical transformations in organic substances / A.M. Dubinskaya // *Chemistry Reviews.* – 1998. – V.23. – P. 201–261.
90. Dynamic alterations in the gut microbiota and metabolome during the development of methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis / J.Z. Ye, Y.T. Li, W.R. Wu [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2018. – V. 24. – № 23. – P. 2468–2481.
91. Dysregulated hepatic methionine metabolism drives homocysteine elevation in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease / T. Pacana, S. Cazanave, A. Verdianelli [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – № 8. doi: 10.1371/journal.pone.0136822
92. Effect of homocysteine on survival of human glial cells / H. Škovierová, S. Mahmood, E. Blahovcová [et al.] // *Physiol Res.* – 2015. – V. 64. – № 5. – P. 747–754.
93. Effect of mechanoactivation on the structure, physical, chemical and biological properties of calcium lactate, calcium gluconate and calcium citrate /

O. Kanunnikova, O. Karban, V. Aksenova [et al.] // MAYFEB Journal of Chemistry and Chemical Engineering. – 2017. – № 1. – P. 10–23.

94. Effect of moxibustion on hyperhomocysteinemia and oxidative stress induced by high-methionine diet / H. Wang, L. Ha, X. Hui, Y. Lin, R. He, Z. Baixiao // Evid Based Complement Alternat Med. – 2020. – № 9. – P. 1–8.

95. Effect of α - and γ -polymorphs of glycine on the intranasal delivery of manganese hydroxide nanoparticles into brain structures / A.F. Achkasov, E.V. Boldyreva, V.I. Bukhtiyarov [et al.] // Dokl Biochem Biophys. – 2014. – V. 454. – № 1. – P. 6–9.

96. Effects of cyclic high ambient temperature and dietary supplementation of orotic acid, a pyrimidine precursor, on plasma and muscle metabolites in broiler chickens / S. Shimamoto, K. Nakamura, S. Tomonaga // Metabolites. – 2020. – V. 10. – № 5. – P. 189.

97. Effects of extracellular orotic acid on acute contraction-induced adaptation patterns in C2C12 cells / T. Beiter, J. Hudemann, C. Burgstahler // Mol Cell Biochem. – 2018. – V. 448. – № 1-2. – P. 251–263.

98. Effects of hyperhomocysteinemia and betaine-homocysteine S-methyltransferase inhibition on hepatocyte metabolites and the proteome / I. Selicharová, M. Kořínek, Z. Demianová [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2013. – V. 1834. – № 8. – P. 1596–1606.

99. Effects of Orotic Acid-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver on the Pharmacokinetics of Metoprolol and its Metabolites in Rats / W.S. Bang, Y.R. Hwang, Z. Li [et al.] // J Pharm Pharm Sci. – 2019. – V. 22. – № 1. – P. 98–111.

100. Efficacy of folic acid therapy in patients with hyperhomocysteinemia / H. Tian, D. Tian, C. Zhang [et al.] // J Am Coll Nutr. – 2017. – V. 36. – № 7. – P. 528–532.

101. Epigallocatechin Gallate Reduces Homocysteine-Caused Oxidative Damages through Modulation SIRT1/AMPK Pathway in Endothelial Cells / P.Y. Pai, W.C. Chou, S.H. Chan [et al.] // Am J Chin Med. – 2021. – V. 49. – № 1. – P. 113–129.

102. Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes / T. Kamiya, M. Machiura, J. Makino [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – № 61. – P. 197–205.
103. ER stress mediates homocysteine-induced endothelial dysfunction: Modulation of IKCa and SKCa channels / X.C. Wang, W.T. Sun, C.M. Yu [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2015. – V. 242. – № 1. – P. 191–198.
104. Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells / L.W. Chong, Y.C. Hsu, T.F. Lee [et al.] // *BMC Gastroenterol.* – 2015. – № 15. – P. 15–22.
105. Fu, Y. Hyperhomocysteinaemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets / Y. Fu, X. Wang, W. Kong // *Br J Pharmacol.* – 2018. – V. 175. – № 8. – P. 1173–1189.
106. Fujii, H. Fibrogenesis in alcoholic liver disease / H. Fujii, N. Kawada // *World J Gastroenterol.* – 2014. – V. 20. – № 25. – P. 8048–8054.
107. Functional analysis of mouse hepatocytes differing in DNA content: volume, receptor expression, and effect of IFN γ / N.C. Martin, C.T. McCullough, P.G. Bush [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2002. – V. 191. – № 2. – P. 138–44.
108. Gordon, S. Alternative activation of macrophages / S. Gordon // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – № 3. – P. 23–35.
109. Gorla, G.R. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells / G.R. Gorla, H. Malhi, S. Gupta // *J Cell Sci.* – 2001. – № 114. – P. 2943–2951.
110. Guillot, A. Liver macrophages: old dogmas and new insights / A. Guillot, F. Tacke // *Hepatol Commun.* – 2019. – V. 3. – № 6. – P. 730–743.
111. Guo, G. Comparison of oxidative stress biomarkers in hypertensive patients with or without hyperhomocysteinemia / G. Guo, W. Sun, G. Liu, H. Zheng, J. Zhao // *Clin Exp Hypertens.* – 2018. – V. 40. – № 3. – P. 262–266.

112. Hammoutene, A. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease / A. Hammoutene, P.E. Rautou // *J Hepatol.* – 2019. – V. 70. – № 6. – P. 1278–1291.
113. Hannibal, L. Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? / L. Hannibal, H.J. Blom // *Mol Aspects Med.* – 2017. – №53. – P. 36–42.
114. Hasan, T. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer / T. Hasan, R. Arora, A.K. Bansal // *Exp Mol Med.* – 2019. – V. 51. – № 2. – P. 1–13.
115. Heneghan, H.M. Homocysteine, the cholesterol of the 21st century. Impact of hyperhomocysteinemia on patency and amputation-free survival after intervention for critical limb ischemia / H.M. Heneghan, S. Sultan // *J Endovasc Ther.* – 2008. – V. 15. – № 4. – P. 399–407.
116. Hepatic stellate cells and hepatocarcinogenesis / A.E. Barry, R. Baldeosingh, R. Lamm [et al.] // *Frontiers in cell and developmental biology.* – 2020. – № 8. – P. 709.
117. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes / M.J. Wang, F. Chen, J.T.Y. Lau, Y.P. Hu // *Cell Death Dis.* – 2017. – V. 8. – № 5. doi: 10.1038/cddis.2017.167.
118. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia / W.H. Liu, Y.S. Zhao, S.Y. Gao [et al.] // *Am J Pathol.* – 2010. – V. 177. – № 5. – P. 2357–2365.
119. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis / S. Gaul, A. Leszczynska, F. Alegre [et al.] // *J Hepatol.* – 2021. – V. 74. – № 1. – P. 156–167.
120. Herbal and polymeric approaches for liver-targeting drug delivery: novel strategies and their significance / R. Rohilla, T. Garg, A.K. Goyal, G. Rath // *Drug Deliv.* – 2016. – V. 23. – № 5. – P. 1645–1661.

121. Heterologous expression of the transcriptional regulator escargot inhibits megakaryocytic endomitosis / A. Ballester, J. Frampton, N. Vilaboa, C. Calés // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276. – № 46. – P. 43413–43418.
122. Higashi, T. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis / T. Higashi, S.L. Friedman, Y. Hoshida // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2017. – № 121. – P. 27–42.
123. Highly Water-Soluble Orotic Acid Nanocrystals Produced by High-Energy Milling / J. de Cássia Zaghi Compri, V.M. Andres Felli, F.R. Lourenço [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2019. – V. 108. – № 5. – P. 1848–1856.
124. Homocysteine and asymmetrical dimethylarginine in diabetic rats treated with docosahexaenoic acid-loaded zinc oxide nanoparticles / J. Hussein, M. El-Naggar, E. Badawy [et al.] // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2020. – V. 191. – № 3. – P. 1127–1139.
125. Homocysteine and cardiovascular disease / H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygård, S.E. Vollset // *Annu. Rev. Med.* – 1998. – № 49. – P. 31–62.
126. Homocysteine and diabetes: Role in macrovascular and microvascular complications / E. Muzurović, I. Kraljević, M. Solak, S. Dragnić, D.P. Mikhailidis // *J Diabetes Complications.* – 2021. – V. 35. – № 3. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2020.107834.
127. Homocysteine and hyperhomocysteinaemia / B.L. Zaric, M. Obradovic, V. Bajic [et al.] // *Curr Med Chem.* – 2019. – V. 26. – № 16. – P. 2948–2961.
128. Homocysteine and Raynaud's phenomenon: a review / P.E. Lazzerini, P.L. Capecchi, S. Bisogno [et al.] // *Autoimmun Rev.* – 2010. – V. 9. – № 3. – P. 181–187.
129. Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis / X. Wu, L. Zhang, Y. Miao [et al.] // *Redox Biol.* – 2019. – № 20. – P.46–59.
130. Homocysteine directly interacts and activates the angiotensin II type I receptor to aggravate vascular injury / T. Li, B. Yu, Z. Liu [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 11.

131. Homocysteine enhances cell proliferation in hepatic myofibroblastic stellate cells / C.G. Zou, S.Y. Gao, Y.S. Zhao [et al.] // *J Mol Med (Berl)*. – 2009. – V. 87. – № 1. – P.75–84.
132. Homocysteine induces collagen I expression by downregulating histone methyltransferase G9a / W. Lei, Y. Long, S. Li [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 7. – P. 1–16.
133. Homocysteine Induces Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in High Methionine Diet-Fed Mice / Y. Ai, Z. Sun, C. Peng [et al.] // *Nutrients*. –2017. – V. 9. – № 4. – P. 346.
134. Homocysteine induces inflammation in retina and brain / N.M. Elsherbiny, I. Sharma, D. Kira [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10. – № 3. – P. 393.
135. Homocysteine inhibits hepatocyte proliferation via endoplasmic reticulum stress / X. Yu, J. Lv, Y. Zhu, L. Duan, L. Ma // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 1. doi: 10.1371/journal.pone.0054265.
136. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension / U. Sen, P.K. Mishra, N. Tyagi, S.C. Tyagi // *Cell Biochem Biophys*. – 2010. – V. 57. – № 2-3. – P. 49–58.
137. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways / G.H. Werstuck, S.R. Lentz, S. Dayal [et al.] // *J Clin Invest*. – 2001. – № 107. – P. 1263–1273.
138. Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes / Y. Jiang, J. Jiang, J. Xiong [et al.] // *J Exp Biol*. – 2008. – V. 211. – № 6. – P. 911–920.
139. Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling / W. Shen, C. Gao, R. Cueto [et al.] // *Redox Biol*. – 2020. – № 28. – P. 1–12.
140. Howell, W.M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method / W.M. Howell, D.A. Black // *Experientia*. – 1980. – V. 36. – № 8. – P. 1014–1015.

141. Human urate transporter 1 (hURAT1) mediates the transport of orotate / D. Miura, N. Anzai, P. Jutabha [et al.] // *J Physiol Sci.* – 2011. – V. 61. – № 3. – P. 253–257.
142. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model / M.A.K. Azad, P. Huang, G. Liu [et al.] // *Amino Acids.* – 2018. – № 50. – P. 3–9.
143. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Intracranial Aneurysms: A Case-Control Study / J. Rosi, B.A. Morais, L.S. Pecorino // *World Neurosurg.* – 2018. – № 119. – P. 272–275.
144. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model / M.A. Hofmann, E. Lalla, Y. Lu [et al.] // *J Clin Invest.* – 2001. – №107. – P. 675–683.
145. Hyperhomocysteinemia exacerbates cisplatin-induced acute kidney injury / Y. Long, X. Zhen, F. Zhu [et al.] // *Int J Biol Sci.* – 2017. – V. 13. – № 2. – P. 219–231.
146. Hyperhomocysteinemia in Liver Cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis / E.R. Garcia-Tevijano, C. Berasain, J.A. Rodriguez [et al.] // *Hypertension.* – 2001. – № 38. – P. 1217–1221.
147. Hyperhomocysteinemia inhibits post-injury reendothelialization in mice / H. Tan, X. Jiang, F. Yang [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2006. – V. 69. – № 1. – P. 253–262.
148. Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for intracranial aneurysms: a case-control study in a Chinese Han population / Q. Wang, J. Zhang, K. Zhao [et al.] // *Neurosurg Rev.* – 2020. – V. 43. – № 4. – P. 1127–1134.
149. Hyperhomocysteinemia-Induced Oxidative Stress Aggravates Renal Damage in Hypertensive Rats / N. Gao, Y. Zhang, L. Li [et al.] // *Am J Hypertens.* – 2020. – V. 33. – № 12. – P. 1127–1135.
150. Identifying the therapeutic significance of mesenchymal stem cells / V.K. Mishra, H.H. Shih, F. Parveen [et al.] // *Cells.* – 2020. – V. 9. – № 5. – P. 1145.

151. IgG immune complex binding to and activation of liver cells / A.G. Johansson, T. Sundqvist, T. Skogh // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2000. – № 121. – P. 329–336.
152. Impact of hyperhomocysteinemia on insulin resistance in patients with H-type hypertension / Y. Zhang, G. Wang, J. Liu, Y. Xu // *Clin Exp Hypertens.* – 2018. – V. 40. – № 1. – P. 28–31.
153. Implication of hyperhomocysteinemia in Blood Retinal Barrier (BRB) Dysfunction / A. Tawfik, Y.A. Samra, N.M. Elsherbiny, M. Al-Shabrawey // *Biomolecules.* – 2020. – V. 10. – № 8. – P. 1119.
154. Improvement of the energy supply and contractile function in normal and ischemic rat hearts by dietary orotic acid / L.C. Pôrto, C.H. de Castro, S.S. Saverghini [et al.] // *Life Sci.* – 2012. – V. 90. – № 13-14. – P. 476–483.
155. In vivo lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration / T. Matsumoto, L. Wakefield, B.D. Tarlow, M. Grompe // *Cell Stem.* – 2020. – V. 26. – № 1. – P. 34–47.
156. Influence of orotic acid on multistage hepatocarcinogenesis in the rat: resistance of hepatocytes from nodules to the mitoinhibitory effects of orotic acid / S. Manjeshwar, E. Laconi, P.M. Rao [et al.] // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1993. – V. 202. – № 1. – P. 25–29.
157. Interaction of smoking, hyperhomocysteinemia, and metabolic syndrome with carotid atherosclerosis: A cross-sectional study in 972 non-diabetic patients / M.R. Azarpazhooh, M.S.S. Andalibi, D.G. Hackam, J.D. Spence // *Nutrition.* – 2020. – № 79–80. doi: 10.1016/j.nut.2020.110874
158. Interference in mevalonate pathway ameliorates homocysteine-induced endothelium-dysfunction / B. Zhang, L. Qiu, M. Fu, S. Hu // *Eur J Pharmacol.* – 2012. – V. 692. – № 1-3. – P. 61–68.
159. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer

working group / M. Dowsett, T.O. Nielsen, R. A'Hern // *J Natl Cancer Inst.* – 2011. – V. 103. – № 22. – P. 1656–1664.

160. Intestinal Microbiota Protects against MCD Diet-Induced Steatohepatitis / K.M. Schneider, A. Mohs, K. Kilic [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – № 2. – P. 308.

161. Investigation of argyrophilic nucleolar organizing region / M. Nisari, R. Eroz, M. Nisari [et al.] // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2016. – № 117. – P. 345–350.

162. Involvements of Hyperhomocysteinemia in Neurological Disorders / M. Cordaro, R. Siracusa, R. Fusco [et al.] // *Metabolites.* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 37.

163. Jellinek, H. Course of the progression of experimentally induced arteriosclerotic vessel wall changes after treatment with magnesium orotate / H. Jellinek, E. Takacs // *Arzneimittelforschung.* – 2000. – V. 50. – № 12. – P. 1071–1077.

164. Ji, C. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury / C. Ji, N. Kaplowitz // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – № 10. – P. 1699–1708.

165. Jonsson, W.O. Dietary sulfur amino acid restriction and the integrated stress response: Mechanistic Insights / W.O. Jonsson, N.S. Margolies, T.G. Anthony // *Nutrients.* – 2019. – № 11. – P. 1349.

166. Ju, C. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies / C. Ju, F. Tacke // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – № 13. – P. 316–327.

167. Kang, S.S. Analytic approaches for the treatment of hyperhomocysteinemia and its impact on vascular disease / S.S. Kang, R.S. Rosenson // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 2018. – V. 32. – № 2. – P. 233–240.

168. Kaplanski, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis / G. Kaplanski // *Immunol Rev.* – 2018. – V. 281. – № 1. – P. 138–153.

169. Kawada, T. Smoking, hyperhomocysteinemia, metabolic syndrome, and cardiovascular risk / T. Kawada // *Nutrition.* – 2021. – № 81. doi: 10.1016/j.nut.2020.111031.

170. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes / S. Cuylen, C. Blaukopf, A.Z. Politi [et al.] // *Nature*. – 2016. – V. 535. – № 7611. – P. 308–312.
171. Ki-67 contributes to normal cell cycle progression and inactive X heterochromatin in p21 checkpoint-proficient human cells / X. Sun, A. Bizhanova, T.D. Matheson [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 2017. – V. 37. – № 17. – P.e00569–e00516.
172. Kisseleva, T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / T. Kisseleva, D. Brenner // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2020. – V. 18. – № 3. – P.151–166.
173. Kmiec, Z. Cooperation of liver cells in health and disease / Z. Kmiec // *Adv Anat Embryol Cell Biol*. – 2001. – №161. – P. 1–151.
174. Kostallari, E. Pericytes in the liver / E. Kostallari, V.H. Shah // *Adv Exp Med Biol*. – 2019. – №1122. – P. 153–167.
175. Kowluru, R.A. Faulty homocysteine recycling in diabetic retinopathy / R.A. Kowluru, G. Mohammad, N. Sahajpal // *Eye Vis (Lond)*. – 2020. – № 7. – P. 1–11.
176. Kubes, P. Immune responses in the liver / P. Kubes, C. Jenne // *Annu Rev Immunol*. – 2018. – № 36. – P. 247–277.
177. L-cystathionine protects against homocysteine-induced mitochondria-dependent apoptosis of vascular endothelial cells / X. Wang, Y. Wang, L. Zhang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev*. – 2019. – № 2019. – P. 1–15.
178. l-Homocysteine-induced cathepsin V mediates the vascular endothelial inflammation in hyperhomocysteinaemia / Y.P. Leng, Y.S. Ma, X.G. Li [et al.] // *Br J Pharmacol*. – 2018. – V. 175. – № 8. – P. 1157–1172.
179. Li, J. Polymer mechanochemistry: from destructive to productive / J. Li, C. Nagamani, J.S. Moore // *Acc Chem Res*. – 2015. – V. 48. – № 8. – P. 2181–2190.
180. Limmer, A. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell / A. Limmer, P.A. Knolle // *Arch Immunol Ther Exp*. – 2001. – № 49. – P. 7–11.

181. Liver sinusoidal endothelial cells / K.K. Sørensen, J. Simon-Santamaria, R.S. McCuskey, B. Smedsrød // *Compr Physiol.* – 2015. – V. 5. – № 4. – P. 1751–1774.
182. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases / J. Poisson, S. Lemoine, C. Boulanger // *J Hepatol.* – 2017. – V. 66. – № 1. – P. 212–227.
183. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms / M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, A. Miyajima // *J Biochem.* – 2011. – № 149. – P. 231–239.
184. Löffler M. Orotic acid, more than just an intermediate of pyrimidine de novo synthesis / M. Löffler, E.A. Carrey, E. Zameitat // *J Genet Genomics.* – 2015. – V. 42. – № 5. – P. 207–219.
185. Löffler, M. Orotate (orotic acid): An essential and versatile molecule / M. Löffler, E.A. Carrey, E. Zameitat // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2016. – V. 35. – № 10-12. – P. 566–577.
186. Lu, S.C. Role of abnormal methionine metabolism in alcoholic liver injury / S.C. Lu, H. Tsukamoto, J.M. Mato // *Alcohol.* – 2002. – V. 27. – № 3. – P. 155–162.
187. Lippa, H. Fundamentals histochemistry. M.: Mir, 1980. – 344 p.
188. Madalena, C.R. Chromatin structure of ribosomal RNA genes in dipterans and its relationship to the location of nucleolar organizers / C.R. Madalena, J.L. Díez, E. Gorab // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – № 8. – P.e44006.
189. Maron, B.A. The treatment of hyperhomocysteinemia / B.A. Maron, J. Loscalzo // *Annu Rev Med.* – 2009. – № 60. – P. 39–54.
190. Matos-Perdomo, E. TORC1, stress and the nucleolus / E. Matos-Perdomo, F. Machín // *Aging (Albany NY).* – 2018. – № 10. – P.857–858.
191. McConathy, J. Stereochemistry in Drug Action / J. McConathy, M.J. Owens // *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* – 2003. – V. 5. – № 2. – P.70–73.
192. McCully, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis / K.S. McCully // *Am. J. Pathol.* – 1969. – № 56. – P.111–128.

193. McStay, B. Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination / B. McStay // *Genes Dev.* – 2016. – V. 30. – № 14. – P. 1598–1610.
194. Mechanisms of homocysteine-induced damage to the endothelial, medial and adventitial layers of the arterial wall / B. Balint, V.K. Jepchumba, J.L. Guéant, R.M. Guéant-Rodriguez // *Biochimie.* – 2020. – № 173. – P.100–106.
195. Mechanochemical substances as mechanochemical activation of pharmaceutical substances as a factor for modification of their physical, chemical and biological properties / A. V. Syroeshkin, E. V. Uspenskaya, T. V. Pletneva, // *International Journal of Applied Pharmaceutics.* – 2019. – №3. – P. 118–123.
196. Mechanochemical synthesis of drug–drug and drug–nutraceutical multicomponent solids of olanzapine / K.K. Sarmah, N. Nath, D.R. Raob, R. Thakuria // *CrystEngComm.* – 2020. – №22. – P.1120–1130.
197. Mechanochemistry applied to reformulation and scale-up production of Ethionamide: Salt selection and solubility enhancement / C.C. de Melo, C.C. da Silva, C.C. Pereira, P.C. Rosa, J. Ellena // *Eur J Pharm Sci.* – 2016. – V. 81. – P. 149–156.
198. Mentch, S.J. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity / S.J. Mentch, J.W. Locasale // *Ann N Y Acad Sci.* – 2016. – V. 1363. – № 1. – P. 91–98.
199. Metformin decreased myocardial fibrosis and apoptosis in hyperhomocysteinemia-induced cardiac hypertrophy / Q. Zhao, W. Song, J. Huang, D. Wang, C. Xu // *Curr Res Transl Med.* – 2020. – V. 69. – № 1. doi: 10.1016/j.retram.2020.103270.
200. Metformin inhibited homocysteine-induced upregulation of endothelin receptors through the Sirt1/NF- κ B signaling pathway in vascular smooth muscle cells / Y. Chen, X. Su, Q. Qin [et al.] // *Vascul Pharmacol.* – 2020. – № 124. – P. 106613.
201. Methionine adenosyltransferases in liver cancer / B. Murray, L. Barbier-Torres, W. Fan, J.M. Mato, S.C. Lu // *World J Gastroenterol.* – 2019. – V. 25. – № 31. – P. 4300–4319.

202. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells / N. Shiraki, Y. Shiraki, T. Tsuyama // *Cell Metab.* – 2014. – V. 19. – № 5. – P. 780–794.
203. Methionine metabolism shapes T helper cell responses through regulation of epigenetic reprogramming / D.G. Roy, J. Chen, V. Mamane [et al.] // *Cell Metab.* – 2020. – V. 31. – № 2. – P. 250–266.
204. Mice deficient in cystathionine β -synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia / M. Watanabe, J. Osada, Y. Aratani // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1995. – № 92. – P. 1585–1589.
205. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration / G.K. Michalopoulos // *J Cell Physiol.* – 2007. – № 213. – P. 286–300.
206. Modulation of cystathionine beta-synthase level regulates total serum homocysteine in mice / L. Wang, K.H. Jhee, X. Hua [et al.] // *Circ Res.* – 2004. – V. 94. – № 10. – P. 1318–1324.
207. Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism / X. Hu, Y. Bonde, G. Eggertsen [et al.] // *J Intern Med.* – 2014. – V. 275. – № 1. – P. 27–38.
208. Németh, A. Dynamic regulation of nucleolar architecture / A. Németh, I. Grummt // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2018. – № 52. – P. 105–111.
209. Neumann, J. On inotropic effects of UTP in the human heart / J. Neumann, B. Hofmann, U. Gergs // *Heliyon.* – 2019. – V. 5. – № 8. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02197.
210. Nucleolar stress: is there a reverse version? / L. Lu, H. Yi, C. Chen [et al.] // *J. Cancer.* – 2018. – № 9. – P. 3723–3727.
211. Nucleolin and nucleophosmin expression patterns in pulmonary adenocarcinoma invading the pleura and in pleural malignant mesothelioma / M. Masiuk, P. Waloszczyk, M. Lewandowska, E. Dobak, E. Urasinska // *Thorac Cancer.* – 2020. – V. 11. – № 9. – P. 2529–2535.

212. Orotic acid induces hypertension associated with impaired endothelial nitric oxide synthesis / Y.J. Choi, Y. Yoon, K.Y. Lee [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2015. – V. 144. – № 2. – P. 307–317.
213. Orotic acid, nucleotide-pool imbalance, and liver-tumor promotion: a possible mechanism for the mitoinhibitory effects of orotic acid in isolated rat hepatocytes / S. Manjeshwar, A. Sheikh, G. Pichiri-Coni [et al.] // *Cancer Res.* – 1992. – V. 52. – № 7. – P. 2078–2081.
214. Orotic acid-treated hepatocellular carcinoma cells resist steatosis by modification of fatty acid metabolism / J. Matilainen, A.M. Mustonen, K. Rilla // *Lipids Health Dis.* – 2020. – V. 19. – № 1. – P.70.
215. Ostwald, W. Lehrbuch der Allgemeinen Chemie, Bd.2 Stöchiometrie / W. Ostwald. – Leipzig: Engelmann, 1891. – 1163 p.
216. Parola, M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues / M. Parola, M. Pinzani // *Mol Aspects Med.* – 2019. – № 65. – P. 37–55.
217. Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury / K. Sato, C. Hall, S. Glaser [et al.] // *Am J Pathol.* – 2016. – V. 186. – № 9. – P. 2238–2247.
218. Patterson, M. Residual Diploidy in Polyploid Tissues: A Cellular State with Enhanced Proliferative Capacity for Tissue Regeneration? / M. Patterson, S.K. Swift // *Stem Cells Dev.* – 2019. – V. 28. – № 23. – P. 1527–1539.
219. Perła-Kaján, J. Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia / J. Perła-Kaján, H. Jakubowski // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – № 13. – P. 3140.
220. Pharmacokinetic changes of clozapine and norclozapine in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease induced by orotic acid / Z. Li, S.H. Lee, H.J. Jeong [et al.] // *Xenobiotica.* – 2021. – V. 51. – № 3. – P. 324–334.
221. Poddar, R. Hyperhomocysteinemia is an emerging comorbidity in ischemic stroke / R. Poddar // *Exp Neurol.* – 2021. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113541.

222. Polyploid hepatocytes facilitate adaptation and regeneration to chronic liver injury / P.D. Wilkinson, F. Alencastro, E.R. Delgado // *Am J Pathol.* – 2019. – V. 189. – № 6. – P. 1241–1255.
223. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease / R. Donne, M. Saroul-Aïnama, P. Cordier, S. Celton-Morizur, C. Desdouets [et al.] // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2020. – V. 17. – № 7. – P. 391–405.
224. Prediction of Methionine and Homocysteine levels in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats as a T2DM animal model after consumption of a Methionine-rich diet / N. Han, J.W. Chae, J. Jeon // *Nutr Metab (Lond).* – 2018. – № 10. – P. 14.
225. Preziosi, M.E. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration / M.E. Preziosi, S.P. Monga // *Semin Liver Dis.* – 2017. – V. 37. – № 2. – P. 141–151.
226. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME / P. Godoy, N.J. Hewitt, U. Albrecht [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2013. – V. 87. – № 8. – P. 1315–1530.
227. Reddy, V.S. Implication of homocysteine in protein quality control processes / V.S. Reddy, J. Trinath, G.B. Reddy // *Biochimie.* – 2019. – № 165. – P. 19–31.
228. Restoration of skeletal muscle homeostasis by hydrogen sulfide during hyperhomocysteinemia-mediated oxidative/ER stress condition / A. Majumder, M. Singh, A.K. George [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2019. – № 97. – P. 441–456.
229. Rilpivirine attenuates liver fibrosis through selective STAT1-mediated apoptosis in hepatic stellate cells / A. Martí-Rodrigo, F. Alegre, A.B. Moragrega [et al.] // *Gut.* – 2020. – V. 69. – № 5. – P. 920–932.
230. Roblin, X. Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C [Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine] / X. Roblin, J. Pofelski, J.P. Zarski // *Gastroenterol Clin Biol.* – 2007. – V. 31. – № 4. – P. 415–420.

231. Rohilla, S. Significance of Hepatoprotective Liver Specific Targeted Drug Delivery: A Review on Novel Herbal and Formulation Approaches in the Management of Hepatotoxicity / S. Rohilla, D.C. Bhatt // *Curr Drug Targets*. – 2018. – V. 19. – № 13. – P. 1519–1549.
232. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury / Q. You, M. Holt, H. Yin // *Biochem Pharmacol*. – 2013. – № 86. – P. 836–843.
233. Role of hyperhomocysteinemia and hyperuricemia in pathogenesis of atherosclerosis / J. Zhao, H. Chen, N. Liu [et al.] // *J Stroke Cerebrovasc Dis*. – 2017. – V. 26. – № 12. – P. 2695–2699.
234. Role of macrophages in acetaminophen (paracetamol)-induced hepatotoxicity / R.D. Goldin, I.D. Ratnayaka, C.S. Breach, I.N. Brown, S.N. Wickramasinghe // *J Pathol*. – 1996. – V. 179. – № 4. – P. 432–435.
235. Role of the Kupffer Cell in Mediating Hepatic Toxicity and Carcinogenesis / R.A. Roberts, P.E. Ganey, C. Ju [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2006. – V. 96. – № 1. – P. 2–15.
236. Rosenfeldt, F.L. Metabolic supplementation with orotic acid and magnesium orotate / F.L. Rosenfeldt // *Cardiovasc Drugs Ther*. – 1998. – № 2. – P. 147–152.
237. Russo, A. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress / Russo A., Russo G. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2017. – № 18. – P.140.
238. Selhub, J. Sulfur amino acids and atherosclerosis: a role for excess dietary methionine / J. Selhub, A.M. Troen // *Ann N Y Acad Sci*. – 2016. – № 1363. – P. 18–25.
239. Semela, D. Liver sinusoidal endothelial cells / D. Semela, V.H. Shah // *Architecture of the liver*. – 2008. – №1. – P. 29–35.
240. Senoo, H. Structure and function of hepatic stellate cells / H. Senoo // *Med Electron Microsc*. – 2004. – V. 37. – № 1. – P. 3–15.

241. Senoo, H. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system) / H. Senoo, Y. Mezaki, M. Fujiwara // *Anat Sci Int.* – 2017. – V. 92. – № 4. – P. 387–455.
242. Singh, N. Identification of the anti-oxidant components in a two-step solvent extract of bovine bile lipid: Application of reverse phase HPLC, mass spectrometry and fluorimetric assays / N. Singh, D. Bhattacharyya // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2016. – № 1019. – P. 83–94.
243. Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis / O. Krenkel, J. Hundertmark, T.P. Ritz, R. Weiskirchen, F. Tacke // *Cells.* – 2019. – V. 8. – № 5. – P. 503.
244. Sjøberg, K.A. Effects of short-term dietary protein restriction on blood amino acid levels in young men / K.A. Sjøberg, D. Schmoll, M.D. Piper, B. Kiens, A.J. Rose // *Nutrients.* – 2020. – V. 12. – № 8. – P. 2195.
245. Smith, R.L. Thalidomide-type teratogenicity: structure-activity relationships for congeners / R.L. Smith, S.C. Mitchell // *Toxicol Res (Camb).* – 2018. – V. 7. – № 6. – P. 1036–1047.
246. Son P. Hyperhomocysteinemia / P. Son, L. Lewis // *StatPearls [Internet].* – 2021.
247. Sorafenib reduces steatosis-induced fibrogenesis in a human 3D co-culture model of non-alcoholic fatty liver disease / G.R. Romualdo, T.C. Da Silva, M.F. de Albuquerque Landi [et al.] // *Environ Toxicol.* – 2021. – V. 36. – № 2. – P. 168–176.
248. Stanasic, D. Hyperhomocysteinemia: an instigating factor for periodontal disease / D. Stanasic, A.K. George, I. Smolenkova, M. Singh, S.C. Tyagi // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2021. – V. 99. – № 1. – P. 115–123.
249. ST-elevation myocardial infarction, pulmonary embolism, and cerebral ischemic stroke in a patient with critically low levels of natural anticoagulants / E.V. Reznik, E.S. Shcherbakova, S.V. Borisovskaya // *J Cardiol Cases.* – 2019. – V. 21. – № 3. – P. 106–109.

250. Stellate cells, hepatocytes, and endothelial cells imprint the kupffer cell identity on monocytes colonizing the liver macrophage niche / J. Bonnardel, W. T'Jonck, D. Gaublonne [et al.] // *Immunity*. – 2019. – V. 51. – № 4. – P. 638–654.
251. Stress for the Treatment of Liver Fibrosis / T. Luangmonkong, S. Suriguga, H.A.M. Mutsaers [et al.] // *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. – 2018. – № 175. – P. 71–102.
252. Subchronic methionine load induces oxidative stress and provokes biochemical and histological changes in the rat liver tissue / M. Stojanović, D. Todorović, L. Šćepanović [et al.] // *Mol Cell Biochem*. – 2018. – V. 448. – № 1-2. – P. 43–50.
253. Sun, X. Ki-67: more than a proliferation marker / X. Sun, P.D. Kaufman // *Chromosoma*. – 2018. – V. 127. – № 2. – P. 175–186.
254. Sun, X. New aspects of hepatic endothelial cells in physiology and nonalcoholic fatty liver disease / X. Sun, E.N. Harris // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2020. – V. 318. – № 6. – P. 1200–1213.
255. Synthesis of conjugated bile acids/azastilbenes as potential antioxidant and photoprotective agents / J.A. dos Santos, H.C. Polonini, É.Y. Suzuki [et al.] // *Steroids*. – 2015. – № 98. – P. 114–121.
256. Tan, W. Partially Reversible Acute Renal Cortical Necrosis Secondary to Hyperhomocysteinemia - A Case Report and Literature Review / W. Tan, F. Abd Ghani, C.T. Seong Lim // *Indian J Nephrol*. – 2019. – V. 29. – № 4. – P. 288–290.
257. Tang, S. Dietary Methionine in T Cell Biology and Autoimmune Disease / S. Tang, X. Li, J.W. Locasale // *Cell Metab*. – 2020. – V. 31. – № 2. – P. 211–212.
258. Tauro- β -muricholic acid restricts bile acid-induced hepatocellular apoptosis by preserving the mitochondrial membrane potential / G.U. Denk, C.P. Kleiss, R. Wimmer [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2012. – V. 424. – № 4. – P. 758–764.
259. The pharmacokinetics of mycophenolic acid in rats with orotic acid induced nonalcoholic fatty liver disease / D. Subali, M.H. Kwon, W.S. Bang [et al.] // *Can J Physiol Pharmacol*. – 2020. – V. 98. – № 3. – P. 169–176.

260. The relationship of argyrophilic proteins of the nuclear-organized regions and atopic dermatitis in children / M. Gunduz, M.A. Okan, A.Z. Sengil [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2019. – № 28. – P. 1309–1312.
261. The role of Kupffer cells in hepatic diseases / P. Li, K. He, J. Li, Z. [et al.] // *Mol Immunol.* – 2017. – № 85. – P. 222–229.
262. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases / Y. Martínez, X. Li, G. Liu [et al.] // *Amino Acids.* – 2017. – V. 49. – № 12. – P. 2091–2098.
263. The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice / P. Vig, F.P. Russo, R.J. Edwards [et al.] // *Hepatology.* – 2006. – V. 43. – № 2. – P. 316–324.
264. Tian, S. Macrophage polarization in kidney diseases / S. Tian, S.Y. Chen // *Macrophage.* – 2015. – №2. – P. 1–10.
265. Tickling, a technique for inducing positive affect when handling rats / S. Cloutier, M.R. LaFollette, B.N. Gaskill // *J. Vis. Exp.* – 2018. – № 135. – P. 57190.
266. Toda, N. Hyperhomocysteinemia impairs regional blood flow: involvements of endothelial and neuronal nitric oxide / N. Toda, T. Okamura // *Pflugers Arch.* – 2016. – V. 468. – № 9. – P. 1517–1525.
267. Toll-like receptor 4 mediates vascular remodeling in hyperhomocysteinemia / A. Familtseva, N. Jeremic, G.H. Kunkel, S.C. Tyagi // *Mol Cell Biochem.* – 2017. – V. 433. – № 1-2. – P. 177–194.
268. Towards medicinal mechanochemistry: evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs) / D. Tan, L. Lootsa, T. Frišćić // *Chem. Commun.* – 2016. – № 52. – P. 7760–7781.
269. Transcriptional Dynamics of Hepatic Sinusoid-Associated Cells After Liver Injury / M.K. Terkelsen, S.M. Bendixen, D. Hansen [et al.] // *Hepatology.* – 2020. – V. 72. – № 6. – P. 2119-2133.

270. Trivedi, P. The Power of Plasticity-Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells / P. Trivedi, S. Wang, S.L. Friedman // *Cell Metab.* – 2021. – V. 33. – № 2. – P. 242–257.
271. Tsuchida, T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation / T. Tsuchida, S.L. Friedman // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2017. – V. 14. – № 7. – P. 397–411.
272. Turan Sönmez, F. The role of argyrophilic nucleolar organizing region-associated proteins in clinical exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease / F. Turan Sönmez, R. Eröz // *J. Int. Med. Res.* – 2018. – №46. – P. 4995–5003.
273. Ulanovskaya, O.A. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink / O.A. Ulanovskaya, A.M. Zuhl, B.F. Cravatt // *Nat Chem Biol.* – 2013. – V. 9. – № 5. – P. 300–306.
274. Uridine protects cortical neurons from glucose deprivation-induced death: possible role of uridine phosphorylase / J.W. Choi, C.Y. Shin, M.S. Choi [et al.] // *J Neurotrauma.* – 2008. – V. 25. – № 6. – P. 695–707.
275. Van der Heide, D. Therapeutic Targeting of Hepatic Macrophages for the Treatment of Liver Diseases / D. van der Heide, R. Weiskirchen, R. Bansal // *Front Immunol.* – 2019. – № 10. – P. 2852.
276. Van, Z.C. Mikroskopische identificatie van sulfanilamide / Z.C. Van // *Pharm. Weekbl.* – 1938. – № 75. – P. 585–587.
277. Wang, L. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury through stimulating ROS production and the ERK1/2 signaling pathway / L. Wang, H. Niu, J. Zhang // *Exp Ther Med.* – 2020. – V. 20. – № 2. – P. 938–944.
278. Wermuth, C. G. Optical Isomerism in Drugs. In *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)* / C. G. Wermuth, D. Aldous, P. Raboisson. – London: Academic Press. – 2015. – P. 429–447.
279. Yang, K. Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases / K. Yang, J. Yang, J. Yi // *Cell Stress.* – 2018. – № 2. – P. 125–140.

