

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-4-41-44

ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И АНАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ НОВОРОЖДЕННЫХ БЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Д. В. Яковенко¹, Е. Н. Сазонова^{1, 2}, А. А. Симанкова¹, М. Ф. Рзянкина¹,
Т. В. Чепель¹, Т. В. Заболотских³, О. Г. Пинаева¹

Введение дигидрокверцетина новорожденным белым крысам в дозе 50 мг/кг ежесуточно с 2 по 6 сут жизни приводит к повышению ДНК-синтетической активности нейронов поля СА1 гиппокампа на 143,8 % ($p = 0,02$) и возрастанию количества ядрышек гепатоцитов на 8,8 % ($p = 0,01$). Антенатальная гипоксия вызывает существенные нарушения пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций новорожденных белых крыс. Наблюдается уменьшение массы тела 7-суточных крыс, перенесших антенатальную гипоксию, на 24,7 % ($p = 0,01$), угнетение ДНК-синтетической активности нейронов неокортекса на 48,18 % ($p = 0,003$) и поля СА1 гиппокампа на 53,42 % ($p = 0,016$), гепатоцитов — на 43,46 % ($p = 0,001$), эпителиоцитов кожи — на 29,75 % ($p = 0,02$); снижение количества ядрышек в ядрах нейронов неокортекса на 19,2 % ($p = 0,005$), гепатоцитов — на 6,2 % ($p = 0,01$), энамелобластов зубных зачатков — на 16 % ($p = 0,001$). Введение дигидрокверцетина новорожденным белым крысам, перенесшим антенатальную гипоксию, нормализует пролиферативную и анаболическую активность исследованных клеточных популяций.

Ключевые слова: антенатальная гипоксия; дигидрокверцетин; ядрышки; пролиферативная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс является важным патогенетическим механизмом патологии неонатального периода [4, 6]. Обсуждается необходимость использования антиоксидантов при различных патологических состояниях раннего детского возраста [3]. Одним из антиоксидантов растительного происхождения является биофлавоноид дигидрокверцетин (ДКВ, таксифолин) [8, 12, 14].

Биофлавоноиды характеризуются наличием 2 ароматических колец, соединенных трехуглеродным мостиком, образующим пирановый или пироновый цикл (соединения ряда С₆-С₃-С₆). По молекулярному строению и функциям ДКВ близок кверцетину и рутину, но превосходит их по фармакобиологической активности. Одна из важнейших особенностей этого вещества — наличие гидроксильных групп, что обеспечивает высокую анти-

оксидантную активность и низкую токсичность [13]. Однако данные об антипролиферативной активности ДКВ [7, 15] ограничивают его клиническое применение в детском возрасте. Сведений о влиянии ДКВ на пролиферативные и анаболические процессы в раннем периоде постнатального онтогенеза мы не обнаружили. В связи с этим целью исследования была оценка характера влияния ДКВ на синтез ДНК и количество ядрышек в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 58 белых крыс Вистар (виварий ЦНИЛ ДВГМУ, Хабаровск). Животных содержали в условиях вивария при температуре 20–22 °С, естественном световом режиме и доступе к корму и воде *ad libitum*. Кормление животных осуществляли полнорационным гранулированным кормом для лабораторных мышей и крыс.

В работе применяли фармакологическую субстанцию дигидрокверцетин (“Аметис”, Россия) со степенью очистки более 98 %, метод оценки чистоты субстанции — обращеннофазовая ВЭЖХ. ДКВ вводили белым крысам внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг [2].

Антенатальную гипоксию (АНГ) моделировали с помощью гипобарической камеры, в которую помещали

¹ ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный медицинский университет Минздрава РФ, Россия, Дальневосточный федеральный округ, 680000, Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35.

² Хабаровский филиал ДНЦ ФПД — НИИ охраны материнства и детства, Россия, Дальневосточный федеральный округ, 680022, Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп. 1.

³ ФГБОУ ВО Амурская государственная медицинская академия Минздрава РФ, Россия, Дальневосточный федеральный округ, Амурская область, 675000, Благовещенск, ул. Горького, 95.

беременных крыс-самок ежедневно с 14 по 19 сут гестации на 4 ч в день. В камере создавали давление 224 мм рт. ст., при этом парциальное давление кислорода составляло около 47 мм рт. ст. Контрольных животных гипоксическому воздействию не подвергали. Исследовали потомство контрольных и подопытных крыс-самок.

Экспериментальные группы формировали методом расщепленных выводков для нивелирования межвыводковых генетических отличий:

“Контроль” — новорожденные животные ($n = 14$), не подвергавшиеся антенатальному гипоксическому воздействию, получавшие с 2 по 6 сут жизни внутрибрюшинно изотонический раствор хлорида натрия;

“АНГ” — новорожденные животные ($n = 15$), подвергнутые антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сут жизни внутрибрюшинно изотонический раствор хлорида натрия;

“ДКВ” — новорожденные животные ($n = 14$), не подвергавшиеся антенатальному гипоксическому воздействию, получавшие с 2 по 6 сут жизни внутрибрюшинно ДКВ в дозе 50 мг/кг;

“АНГ + ДКВ” — новорожденные животные ($n = 15$), подвергнутые антенатальной гипоксии и получавшие с 2 по 6 сут жизни внутрибрюшинно ДКВ в дозе 50 мг/кг.

В возрасте 7 сут, через 24 ч после заключительного воздействия, животных взвешивали и выводили из эксперимента быстрой декапитацией под наркозом парами хлороформа. За 1 ч до эвтаназии животным внутрибрюшинно вводили ^3H -тимидин в дозе 1 мк Кюри на 1 г массы (удельная активность 84 Кюри/моль, Россия) для проведения автордиографических исследований.

Тотчас после эвтаназии осуществляли забор для гистологического исследования левого полушария головного мозга, фрагмента печени, фрагмента кожи с передней поверхности брюшной стенки, фрагмента нижней челюсти. Оценивали следующие клеточные популяции: нейроны неокортекса собственной теменной доли головного мозга и поля СА1 гиппокампа; эпителиоциты и фибробласты кожи; гепатоциты; энамелобласты и одонтобласты зубных зачатков; хондроциты хрящевой закладки нижней челюсти, glanduloциты слюнных желез.

Для исследования пролиферативной активности клеток использовали метод автордиографии с меченым тритием тимидином. Обработанные с помощью стандартной гистологической процедуры срезы тканей по-

мещали на обезжиренные стекла, депарафинировали и покрывали ядерной фотоэмульсией Kodak. После инкубации в течение 14 сут радиоавтографы проявляли проявителем Д-19, фиксировали в 33 % растворе гипосульфита натрия и окрашивали гематоксилином и эозином. Индекс меченных ядер (ИМЯ), характеризующий долю клеток в S-фазе клеточного цикла, определяли при просмотре не менее 2000 ядер каждой клеточной популяции и выражали в процентах.

Анализ количества ядрышек в ядрах клеток проводили на гистологических срезах, окрашенных азотнокислым серебром. Количество и размер ядрышек отражает активность белок-синтетических процессов в клетке [5]. Подсчитывали среднее количество ядрышек на основании просмотра не менее 100 ядер в каждой клеточной популяции. Микроскопирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа медицинского “Микмед-6”, увеличение 10×100 .

При проведении экспериментов руководствовались положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На исследование было получено разрешение Этического комитета ФГБОУ ВО ДВГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 5.06.2018).

Проверку выборок на нормальность распределения и статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью стандартной программы Statistica 6.0. Определяли средние показатели, стандартную ошибку средней и различия выборок по критерию Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У 7-суточных белых крыс, перенесших АНГ, имело место уменьшение массы тела (“Контроль” — $14,40 \pm 0,36$ г; “АНГ” — $10,83 \pm 0,41$ г; $p < 0,05$). Введение ДКВ с 2 по 6 сут жизни не оказывало корректирующего влияния на массу тела животных, перенесших АНГ. Исследуемый параметр оставался достоверно ниже контрольного значения (“Контроль” — $14,40 \pm 0,36$ г; “АНГ + ДКВ” — $11,08 \pm 0,45$ г; $p < 0,05$).

При анализе пролиферативных процессов в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс,

Таблица 1. Индекс меченных ^3H -тимидином ядер (%) в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс исследуемых групп ($M \pm m$)

Клеточная популяция	Контроль	АНГ	ДКВ	АНГ + ДКВ
Гепатоциты	$2,37 \pm 0,44$	$1,34 \pm 0,26^*$	$2,34 \pm 0,46$	$2,98 \pm 0,28$
Эпителиоциты кожи	$10,79 \pm 1,38$	$7,58 \pm 0,68^*$	$10,06 \pm 0,98$	$9,72 \pm 1,73$
Фибробласты кожи	$5,59 \pm 0,62$	$4,53 \pm 0,29$	$9,42 \pm 1,88$	$5,29 \pm 0,5$
Нейроны неокортекса	$1,10 \pm 0,23$	$0,57 \pm 0,05^*$	$1,38 \pm 0,08$	$1,66 \pm 0,14$
Нейроны поля СА1 гиппокампа	$0,73 \pm 0,16$	$0,34 \pm 0,06^*$	$1,78 \pm 0,16^*$	$2,02 \pm 0,15^*$

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.

подвергнутых АНГ, выявлено снижение ДНК-синтетической активности гепатоцитов, эпителиоцитов кожи и клеток неокортекса собственной теменной доли и гиппокампа (табл. 1).

Введение ДКВ с 2 по 6 сут жизни животным, перенесшим АНГ, полностью нивелировало постгипоксическое угнетение ДНК-синтетической активности гепатоцитов, эпителиоцитов кожи и нейронов неокортекса и гиппокампа у 7-суточных животных. Более того, у животных группы “АНГ + ДК” мы зарегистрировали активацию синтеза ДНК в клетках гиппокампа.

У 7-суточных животных, перенесших АНГ, мы выявили достоверное уменьшение количества ядрышек в гепатоцитах, энамелобластах и нейронов II слоя неокортекса.

Пятикратное введение ДКВ с 2 до 6 сут жизни животным, перенесшим АНГ, нивелировало негативные изменения ядрышкового аппарата клеток. В группе “АНГ + ДКВ” количество ядрышек в исследованных клеточных популяциях не отличалось от контрольных показателей.

Введение ДКВ с 2 по 6 сут жизни животным, не подвергавшимся АНГ, не оказывало влияние на массу тела 7-суточных крыс (“Контроль” — $(14,40 \pm 0,36)$ г; “ДКВ” — $(14,26 \pm 0,47)$ г; $p > 0,05$). При анализе пролиферативных и анаболических процессов в различных тканях животных этой группы была выявлена активация ДНК-синтетических процессов в поле СА1 гиппокампа (табл. 1) и увеличение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов (табл. 2). В других исследованных клеточных популяциях животных этой экспериментальной группы изменений пролиферативной и анаболической активности клеток не выявлено.

Анализируя результаты проведенного исследования, следует отметить, что введение ДКВ новорожденным животным не вызывало токсических и повреждающих эффектов. В большинстве исследованных клеточных популяций новорожденных белых крыс не зарегистрированы какие-либо изменения пролиферативных и анаболических процессов после введения ДКВ. Вместе с тем ДКВ активировал ядрышкового аппарата гепатоцитов у интактных (не подвергавшихся АНГ) новорожденных животных. В литературе описано стимулирующее влияние растительных биофлавоноидов на синтез рРНК в ге-

патоцитах как *in vivo*, так и в условиях клеточной культуры [9]. Поскольку у новорожденных детей нередко выявляется первичная гипоальбуминемия, способность ДКВ стимулировать белок-синтетическую функцию печени представляет значительный клинический интерес. Также ДКВ активировал синтез ДНК в гиппокампе подопытных животных. Этот эффект косвенно подтверждается данными литературы о способности биофлавоноидов проникать через гематоэнцефалический барьер и связываться с TrkB-рецепторами, через которые реализует свое действие нейротрофин BDNF [11].

Введение ДКВ животным, перенесшим АНГ, приводило к нивелированию неблагоприятных отклонений в организме новорожденных белых крыс. АНГ угнетает пролиферативную и анаболическую активность клеток, что приводит к гипотрофии и структурному дефициту во многих тканях и органах. После АНГ выявлено существенное (на 24,8 %) снижение массы тела 7-суточных животных; угнетение синтеза ДНК в эпидермисе, печени и головном мозге; уменьшение анаболической активности гепатоцитов; энамелобластов зубных зачатков и нейронов неокортекса. Неонатальный период сопровождается состоянием физиологического окислительного стресса, который значительно усиливается в организме, подвергавшемся гипоксическому воздействию антенатально или интранатально [6]. Выраженный окислительный стресс индуцирует угнетение пролиферативной и анаболической активности клеток [1]. Вместе с тем в некоторых исследованных клеточных популяциях не выявлено изменений биосинтетических процессов после гипоксического воздействия: не было изменений пролиферативной активности фибробластов кожи; отклонений количества ядрышек в ядрах хондроцитов нижней челюсти, одонтобластов зубных зачатков и glanduloцитов слюнных желез. Причинами различной чувствительности клеточных популяций к гипоксическому воздействию могут быть тканеспецифические особенности кровоснабжения, интенсивности обмена веществ и активности гликолитических процессов.

Неонатальное введение ДКВ животным, перенесшим АНГ, устраняет постгипоксическое снижение ДНК-синтетической активности клеток и нормализует количество ядрышек в ядрах клеток, что отражает восстановление анаболических процессов. Эффект, по-видимому, обусловлен способностью ДКВ быть “уборщиком” ак-

Таблица 2. Среднее количество ядрышек в различных клеточных популяциях 7-суточных белых крыс исследуемых групп ($M \pm m$)

Клеточная популяция	Контроль	АНГ	ДКВ	АНГ + ДКВ
Гепатоциты	$2,73 \pm 0,04$	$2,56 \pm 0,04^*$	$2,97 \pm 0,07^*$	$2,92 \pm 0,09$
Хондроциты нижней челюсти	$2,50 \pm 0,07$	$2,46 \pm 0,06$	$2,52 \pm 0,09$	$2,54 \pm 0,06$
Энамелобласты зубных зачатков	$4,19 \pm 0,16$	$3,52 \pm 0,17^*$	$3,86 \pm 0,15$	$3,79 \pm 0,14$
Одонтобласты зубных зачатков	$3,07 \pm 0,14$	$3,07 \pm 0,11$	$3,05 \pm 0,06$	$3,10 \pm 0,13$
Гландулоциты слюнных желез	$2,57 \pm 0,10$	$2,50 \pm 0,05$	$2,42 \pm 0,08$	$2,74 \pm 0,14$
Нейроны II слоя неокортекса	$1,98 \pm 0,09$	$1,60 \pm 0,02^*$	$1,86 \pm 0,03$	$1,80 \pm 0,05$
Нейроны V слоя неокортекса	$1,46 \pm 0,06$	$1,35 \pm 0,05$	$1,42 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,02$
Нейроны поля СА1 гиппокампа	$1,92 \pm 0,08$	$1,81 \pm 0,06$	$1,97 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,05$

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.

тивированных кислородных метаболитов [10]. Вместе с тем в механизмы анаболического и цитопротективного эффектов биофлавоноидов могут быть вовлечены внутриклеточные пути стимуляции митоген-активированных протеинкиназ, в частности, ERK1/2; PI3K-Акт-пути, протеинкиназы С [11].

Результаты проведенного исследования свидетельствуют об отсутствии негативных последствий воздействия ДКВ, а также о нивелировании ДКВ угнетающего влияния АНГ на пролиферативную и анаболическую активность различных клеточных популяций у млекопитающих в неонатальном периоде онтогенеза. Таким образом, ДКВ может быть перспективным фармакологическим средством для неонатологической и педиатрической практики.

ВЫВОДЫ

1. Введение ДКВ в дозе 50 мг/кг новорожденным белым крысам ежесуточно с 2 по 6 сут жизни приводит к повышению ДНК-синтетической активности нейронов поля СА1 гиппокампа на 143,8 % ($p = 0,02$) и возрастанию количества ядрышек гепатоцитов на 8,8 % ($p = 0,01$).

2. АНГ (гипобарическое воздействие с 14 по 19 сут гестации; $pO_2 = 47$ мм рт. ст.) индуцирует у новорожденных белых крыс снижение массы тела на 24,7 % ($p = 0,01$); угнетение ДНК-синтетической активности гепатоцитов на 43,5 % ($p = 0,045$), эпителиоцитов кожи на 26,3 % ($p = 0,04$), нейронов неокортекса собственной теменной доли головного мозга на 48,18 % ($p = 0,003$), нейронов поля СА1 гиппокампа на 53,42 % ($p = 0,016$); уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов на 6,2 % ($p = 0,01$), энамелобластов зубных зачатков на 16 % ($p = 0,001$), нейронов неокортекса собственной теменной доли головного мозга на 19,2 % ($p = 0,005$).

3. Введение дигидрокверцетина в дозе 50 мг/кг с 2 по 6 сут жизни новорожденным белым крысам, перенес-

шим АНГ, нормализует ДНК-синтетическую активность гепатоцитов и нейронов неокортекса; количество ядрышек в ядрах гепатоцитов; энамелобластов зубных зачатков и нейронов неокортекса. У животных, подвергнутых АНГ и введению ДКВ, имеет место стимуляция ДНК-синтетической активности нейронов поля СА1 гиппокампа в 2,76 раза по отношению к показателю группы “Контроль” ($p = 0,00005$) и в 5,94 раза по отношению к показателю группы “АНГ” ($p = 0,00001$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. В. Антонова, В. Г. Матвеева, М. Н. Чернова и др., *Цитология*, **56**(1), 67 – 76 (2014).
2. В. П. Жердев, Г. В. Кольванов, А. А. Литвин и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(1), 23 – 25 (2010).
3. К. И. Исмаилов, С. Н. Кудратова, *Вестн. Авиценны*, **62**(1), 122 – 127 (2015).
4. Ю. В. Кореновский, Е. В. Горбено, О. В. Ремнева и др., *Сиб. мед. ж.*, **1**, 19 – 21 (2007).
5. Н. Н. Мамаев, С. Е. Мамаева, *Цитология*, **10**, 3 – 12 (1992).
6. Г. А. Шишко, А. В. Сапотницкий, Ю. А. Устинович и др., *Мед. новости*, **6**, 23 – 25 (2011).
7. M. Alzaharna, I. Alqouqa, H. Y. Cheung, *PLoS One*, **12**(2), 1 – 22 (2017).
8. T. V. Arutyunyan, A. F. Korystova, L. N. Kublik, et al., *Age (Dordr.)*, **35**(6), 2089 – 2097 (2013).
9. C. Loguercio, D. Festi, *World J. Gastroenterol.*, **17**(18), 2288 – 2301 (2011).
10. K. Manigandan, R. L. Jayaraj, K. Jagatheesh, N. Elangovan, *Environ Toxicol Pharmacol.*, **39**(3), 1252 – 1261 (2015).
11. F. Moosavi, R. Hosseini, L. Saso, O. Firuzi, *Drug Des. Devel. Ther.*, **10**, 23 – 24 (2016).
12. S. Schaffer, B. Halliwell, *Genes Nutr.*, **7**(2), 99 – 109 (2012).
13. A. G. Schauss, S. S. Tselyico, V. A. Kuznetsova, I. Yegorova, *Int. J. Toxicol.*, **34**(2), 162 – 181 (2015).
14. X. Sun, R. C. Chen, Z. H. Yang, et al., *Food Chem Toxicol.*, **63**, 221 – 232 (2014).
15. J. Y. Yang, J. S. Wang, H. B. Liu, *Genet. Mol. Res.*, **14**(3), 7671 – 7679 (2015).

Поступила 03.02.19

THE EFFECT OF DIHYDROQUERCETIN ON THE PROLIFERATIVE AND ANABOLIC PROCESSES IN VARIOUS CELL POPULATIONS OF NEWBORN ALBINO RATS EXPOSED TO ANTENATAL HYPOXIA

D. V. Yakovenko¹, E. N. Sazonova^{1,2}, A. A. Simankova¹, M. F. Rzyankina¹,
T. V. Chepel¹, T. V. Zabolotskikh³, and O. G. Pinaeva¹

¹ Far Eastern State Medical University, ul. Murav'eva-Amurskogo 35, Khabarovsk, 680000 Russia

² Scientific Research Institute of Mother and Child Care, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Votonezhskaya 49/1, Khabarovsk, 680000 Russia

³ Amur State Medical Academy, ul. Gorkogo 95, Blagoveshchensk, Amur oblast, 675000 Russia

Administration of dihydroquercetin (50 mg/kg) to newborn albino rats aged 2 to 6 days caused an increase in the DNA-synthetic activity of hippocampal neurons by 143.8% ($p = 0.02$) and growth in the hepatocyte nucleoli number by 8.8% ($p = 0.01$). Antenatal hypoxia caused significant disturbance of the proliferative and anabolic activity of various cell populations in newborn albino rats as manifested by a decrease in the body mass of 7-day-old rats exposed to antenatal hypoxia (by 24.7%, $p = 0.01$) and inhibition of the DNA-synthetic activity of neocortex (by 48.18%, $p = 0.003$), hippocampus neurons (by 53.42%, $p = 0.016$), hepatocytes (by 43.46%, $p = 0.001$), and skin epithelial cells (by 29.75%, $p = 0.02$). In addition, there was a decrease in the nucleoli number in neocortex neurons (by 19.2%, $p = 0.005$), hepatocytes (by 6.2%, $p = 0.01$), enameloblasts (by 16%, $p = 0.001$). The administration of dihydroquercetin to newborn albino rats exposed to antenatal hypoxia normalized the proliferative and anabolic activity of cell populations studied.

Keywords: antenatal hypoxia; dihydroquercetin; nucleoli; proliferative activity.