

## ЦИНКЛИН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ НА ФОНЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

**Рыбаков С.В., Васильева А.И., Воробьева О.В.**

*Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины, г. Чебоксары*

**Ключевые слова:** алкоголь, экспериментальные животные, апоптоз, дезоксинуклеотидилтрансфераза, иммуногистохимия.

**Резюме:** проведен комплекс иммуногистохимических реакций, с помощью которых была воспроизведена модель алкогольной интоксикации на опытных животных, разделенных на группы согласно установленным критериям отбора. Тем самым были установлены формы влияния этанола на факторы Cyclin D1, P-53, TdT в костном мозге.

**Resume:** a complex of immunohistochemical reactions was carried out, with the help of which the model of alcohol intoxication was reproduced in experimental animals, divided into groups according to the established selection criteria. Thereby, the forms of ethanol influence on the factors Cyclin D1, P-53, TDT in the bone marrow were established.

**Актуальность.** Злоупотребление алкоголем - серьезная проблема во всем мире. Остаются мало изученные вопросы влияния этанола на красный костный мозг. Как известно, регуляция клеточного цикла необходима для контроля пролиферации и дифференцировки клеток, а также сохранения целостности генома. Помимо экстрацеллюлярных сигналов, способных модифицировать этот процесс, имеется и сложная внутриклеточная система контроля репликации. Экспрессия генов может иметь важные последствия как для конкретной клетки, так и для клеточной популяции в целом. Особый интерес представляет Cyclin D1, специфически регулирующий фазовый переход G1 / S-фаза в клеточном цикле, кодируется геном CCND1, расположенным в хромосомном локусе 11q13, его повышенная продукция способствует инициации клеточного деления. P-53 является центральным компонентом механизма, обеспечивающего удаление из организма патологически измененных клеток [1,2,3]. Специализированные механизмы инициируют апоптотический процесс, а сложный набор реакций приводит к характерным изменениям. Важное значение имеет иммунная система, которая представляет собой баланс между процессами иммунной активации и иммунной супрессии [3,4]. Таким образом, физиологическая значимость процессов пролиферации, апоптоза, возможность их целенаправленной регуляции в красном костном мозге имеет важное значение на фоне алкогольной интоксикации.

**Цель:** оценить и обосновать с помощью комплекса иммуногистохимических методов влияние этанола на красный костный мозг у экспериментальных животных.

### **Задачи:**

1. Воспроизвести модель алкогольной интоксикации у экспериментальных животных. Оценить вес и шерстяной покров у 3х групп животных.

2. Установить влияние этанола на факторы, регулирующие пролиферативную (Cyclin D1) и апоптотическую активность (p53) в костном мозге в 1 группе - в качестве

источника питья была вода, 2 группе - сразу после окончания введения этанола и 3 группе - через сутки (абстинентный синдром).

3. Оценить экспрессию терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (TdT) в костном мозге в 1 группе-в качестве источника питья была вода, 2 группе- сразу после окончания введения этанола и 3 группе-через сутки (абстинентный синдром).

4. Создать гипотетическую схему влияния этанола на факторы, регулирующие пролиферативную и апоптозную активность в костном мозге.

**Материал и методы исследования.** В работе использованы 21 беспородных белых крыс-самцов, весом 280 г, 6 месяцев (что соответствует среднему возрасту). Для проведения экспериментов взята стандартная модель алкогольной интоксикации.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Этапы исследования: 1 этап – проведение отборочного теста: -за сутки до проведения теста животные лишались пищи со свободным доступом к воде; - животные, помещенные в индивидуальные клетки, получали по 1 мл 40%-го раствора этанола на стандартных кусочках белого хлеба. Критерием отбора являлось количество съеденного хлеба в течение часа: животные, съедавшие менее половины кусочка, выбраковывались.

2 этап – разделение животных на группы: группа 1 - животные контрольной группы получали водопроводную воду в течение 1-го месяца (n=6); группа 2 - потребление животными опытной группы 30% раствора этанола через поилки (в качестве единственного источника питья) в течение одного месяца, забой которых осуществляли сразу после прекращения потребления этилового спирта (n=7); группа 3 – опытные животные, забой которых осуществляли через сутки после лишения алкоголя (в период развития абстинентного синдрома) (n=7).

Примечание. Каждая крыса располагалась в индивидуальной клетке со своим поильником, со стандартным рационом (зерно, иногда зеленая трава) при ежедневном употреблении около 15-20 мл этанола. Эксперименты проводились в летнее время (июль-август). Методика взятия материала: под эфирным наркозом у животных фиксировали задние конечности, обрабатывали операционное поле 70%-м этиловым спиртом, отделяли кожный лоскут, извлекали бедренную кость, декальцинировали в трилон-В (3 недели), обезжировали, проводили заливку в парафин, из эпифиза бедренной кости готовились срезы 4 мкм, наносили не стекла, проводили иммуногистохимическое исследование. Микропрепараты изучали под микроскопом Leica DM4000B и лицензионной программой Leica Application Suite 3.8.0. 3. Статистический анализ проведен в программе «Statistica 6.0». Использовался непараметрический статистический U-критерий Манна–Уитни.

Методы исследования иммуногистохимических маркеров:

Иммуногистохимическая реакция на Cyclin D1. Подсчет среднего количества клеток с позитивной экспрессией.

2. Иммуногистохимическая реакция на P-53. Выявление клеток с экспрессией на P-53.

3. Иммуногистохимическая реакция на терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу. Выявление позитивной экспрессии комплексов.

Обобщая результаты исследования можно заключить, что употребление этанола вызывает визуальные нарушения в поведении животных, изменяется вес и шерстяной покров у животных.

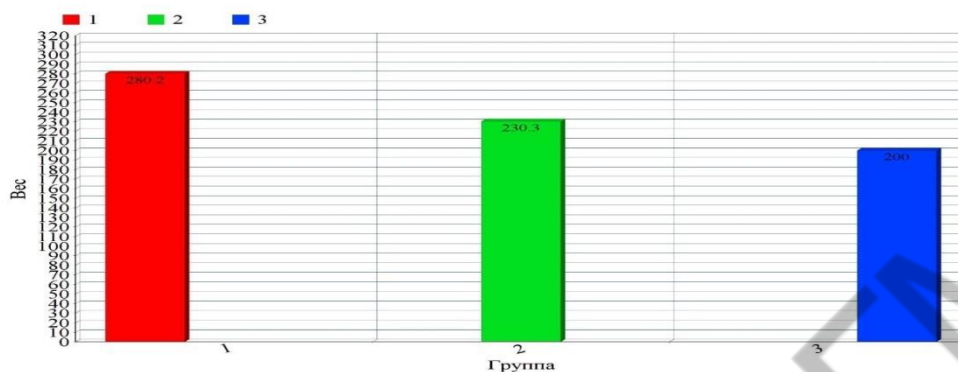


Рис. 1 - Изменение массы животных в разные сроки эксперимента, г

- А. 1 группа – костный мозг у контрольных животных;
- Б. 2 группа – костный мозг у опытных животных сразу после прекращения употребления этанола;
- В. 3 группа – через сутки после прекращения употребления этанола.

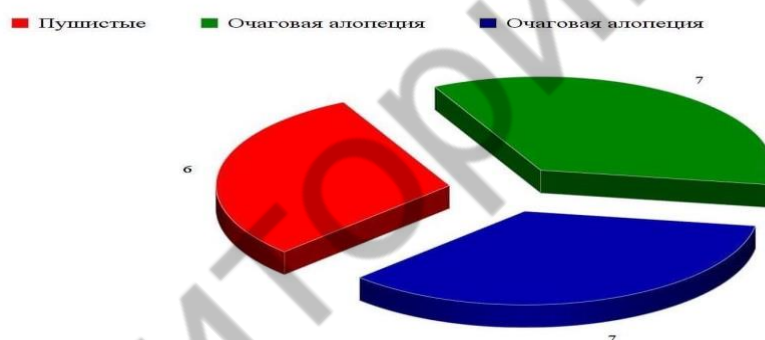
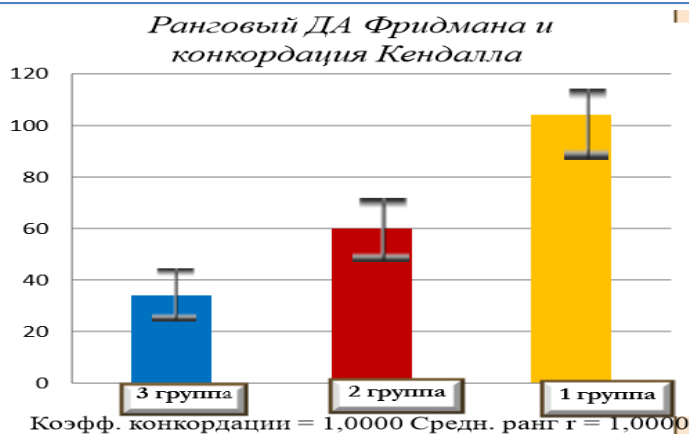


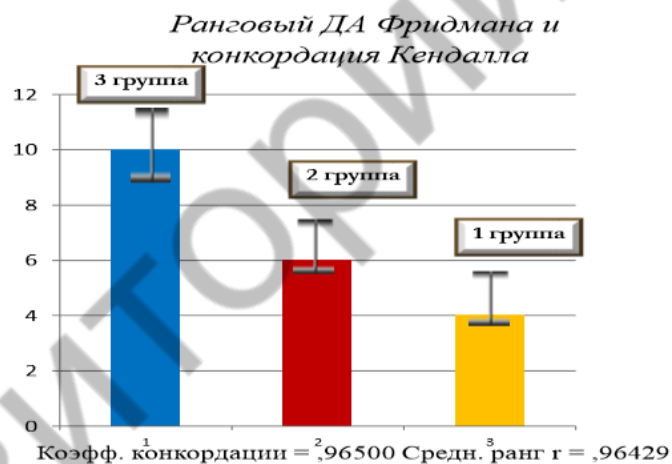
Рис. 2 - Изменение качества шерсти животных в разные сроки эксперимента

Во 2 группе эксперимента (животные, которым прекращен доступ этанола сразу, после 1-го месяца употребления) в костном мозге выявлена более низкая экспрессия фактора, регулирующего клеточную пролиферацию - Cyclin D1 по сравнению с 1 группой (у животных этой группы в качестве источника питья была вода), вероятно это связано с действием этанола на клетки, преимущественно на ядра. В 3 группе эксперимента (абстинентный синдром) наблюдается еще более низкая экспрессия Cyclin D1, что способствует угнетению пролиферации, как известно пролиферативный потенциал является необходимым для восстановления гемопоэза после различных воздействий.



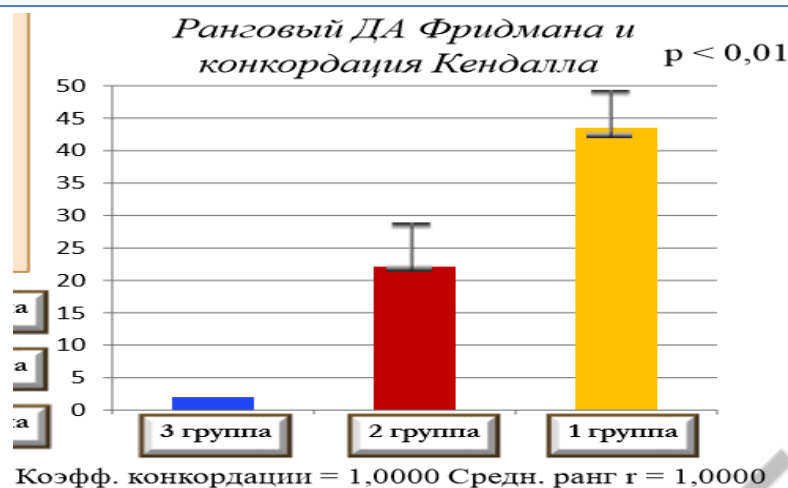
**Рис. 3** – Экспрессия фактора, регулирующего пролиферацию Cyclin D1

При сравнительном анализе активности экспрессии Р-53-позитивных клеток в красном костном мозге можно судить об интенсивности апоптоза. Как известно, в случае разного рода влияний на ДНК клеток, белок Р-53 осуществляет репарацию ДНК, если это невозможно, то запускается процесс апоптоза, в этом случае повышается экспрессия Р-53 позитивных клеток, что видим во 2 и 3 группе эксперимента.



**Рис. 4** – Экспрессия Р-53

При анализе данных мы выявили, что экспрессия TdT – позитивных комплексов также начинает уменьшаться со снижением экспрессии оптической плотности клеток во 2 и 3 группе. По литературным данным, TdT – фермент относится к факторам трофического обеспечения синтеза лимфоидных клеток и поэтому TdT-клетки при определенных условиях способны приобретать морфогенетическую активность и участвовать в процессах восстановления и поддержания регенерации. Полученные результаты исследований у 2-й и 3-ей группы животных выявляют нарушение иммунного гомеостаза, затрагивающее его различные звенья, включая изменения функциональной активности и перераспределение лимфоцитов. [1,2,3]



**Рис. 5** – Экспрессия терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, %

Очевидно, что на фоне массивной гибели клеток в период абстинентного синдрома возможно развитие дисрегенерации и возникновение повреждения клеточности костного мозга, что приведет в дальнейшем к тяжелым клиническим изменениям, и даже к летальному исходу.

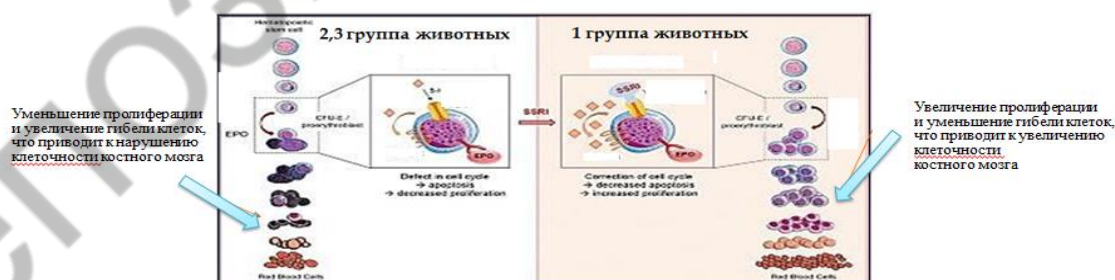
**Выводы:**

1. Воспроизведена модель алкогольной интоксикации, которая позволила продемонстрировать влияние этанола на вес, шерстяной покров (у 2,3 групп – очаговая аллопеция), на факторы регулирующие пролиферативную и апоптозную активность, а также на экспрессию TdT (фермент, локализованный в лимфобластах).

2. Клетки костного мозга очень чувствительны к длительному воздействию этанола. Этанол действует на клетки костного мозга угнетающе во 2 и 3 группе эксперимента, что проявляется изменением экспрессии Cyclin D1 и p53, что приводит к существенной депрессии между пролиферацией и гибелью клеток.

3. Этанол приводит к изменению экспрессии TdT, затрагивает иммуннопоз в сторону его деградации у 2-ой и 3-группы.

4. Создана гипотетическая схема влияния этанола на клетки.



**Рис. 6** – Гипотетическая схема влияния этанола на клетки

**Практические рекомендации:**

1. В процессе изучения данной темы создаются условия для понимания того, что употреблять алкогольные напитки не только вредно, но и опасно для жизни, здоровья.

2. Полученные данные можно использовать в дальнейших научно-исследовательских работах для поиска методов воздействия на эту систему клеток, с



целью выявления механизмов управления процессами, происходящими как локально, так и на уровне целостного организма.

3. Полученные в ходе исследования результаты о влиянии этанола на процессы пролиферации, апоптоза, иммуногенеза дополняют современные представления об регуляции кроветворения.

4. Длительное воздействие этанола на организм и резкая отмена дальнейшего употребления с развитием абстинентного синдрома даёт возможность для прогнозирования дальнейшего развития процессов, протекающих в красном костном мозге.

#### Литература

1. Воробьева О.В. Общепатологические процессы в патологической анатомии: учеб. пособие / О.В. Воробьева, Л.А. Любовцева, Е.В. Москвичев. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2018. – 280 с.
2. Воробьева О.В. Динамика морфо–функционального состояния клеточных дифференгов костного мозга как органа кроветворения/ О.В. Воробьева// Журнал анатомии и гистопатологии. - 2017. – Т. 6. - №2. – С.26-29.
3. Алкогольная болезнь: Поражения внутренних органов при алкоголизме / Кол. авторов: Траянова Т. Г., Николаев А. Ю., Виноградова Л. Г., Жарков О. Б., Лукомская М. И., Моисеев В. С. / Под ред. В. С. Моисеева: Учеб. пособие,-М.: Изд-во УДН, 1990.- 129 с.,
4. А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова «Молекулярная биология», г. Москва, 2012 г.