F. Valitov

PRL GENE POLYMORPHISM IN POPULATIONS OF CATTLE FOR BREED IMPROVEMENT IN BASHKORTOSTAN REPUBLIC*Key words: prolactin; allele; genotype; DNA markers; milk productivity; population; cattle.**Authors' personal details*

Valitov Farit, Candidate of agricultural sciences, head of the Beekeeping, private animal science and animal breeding department, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», 450001, Ufa, 50-letiya Otyabrya St., 34, phone: 8 (347) 252-72-52, e-mail: fvalitov@mail.ru.

The paper describes allele and prolactin genotype frequency and their correlation with milk productivity of cows for breed improvement in the Republic of Bashkortostan. It was found, that **AA** genotype black-and-white cows are of higher frequency, **AB** genotype ones are on the intermediate level, and **BB** genotype animal number is the lowest. **AB** heterozygotes prevail in simmental and bestuzhev breeds. There is low frequency of animals with **BB** genotype among simmental cattle and **AA** genotype among bestuzhev breeds. Allele **A** frequency was higher compared to allele **B** for black-and-white and bestuzhev breeds. Except simmental breed where allele **B** frequency was

higher and was 0,52. At the first sample black-and-white cows of **AB** genotype had the highest milk production capacity. This characteristic was the lowest for animals of **BB** genotype while their milk protein content was better. At the second sample of black-and-white cows better milk productivity was found for animals of **BB** genotype, the worst results were shown for **AA** genotype heads. The same result could be observed for bestuzhev breed. Simmental cows of **AA** genotype had advantage over cows of other genotypes, except milk fat content being better for cows of **AB** genotype. Thus, quantitative and quality indicators of milk are higher when there is prolactin gene in **B** allele.

© Валитов Ф.Р.

УДК 619:616.1:619:611.1-085

DOI: 10.31563/1684-7628-2018-46-2-66-71

И.Р. Гатиятуллин, Г.В. Базекин, И.В. Чудов

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА МИОКАРДА КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ*Ключевые слова: крысы; миокард; глицирризиновая кислота; адреналин; кардиомиоциты; кардиокенез; кардиопротектор; антиапоптотический эффект.*

Введение. Разработка, создание и изучение лекарственных средств на растительной основе постоянно растет, так как фитопрепараты имеют хорошую эффективность и безвредность по сравнению с химическими лекарственными средствами. Ранее было разработана глицирризиновая кислота, включающая в себя экстракт растительного происхождения. Глицирризиновая кислота — основной тритерпеновый гликозид корней солодки, являющийся одним из лидирующих природных соединений. Доклинические и клинические исследования данного гликозида выявили его высокую безопасность и эффективность, которая оказывает противовирусное, противовоспалительное, антиаритмиче-

ское и иммуномодулирующее действие. Учитывая свойства компонентов, входящих в состав лекарственного средства, на наш взгляд, было целесообразным изучение его возможных кардиопротекторных свойств на модели патологии сердца [1, 3, 5–7, 9–11].

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось изучение влияния глицирризиновой кислоты на морфологию миокарда белых крыс. Задачи: 1) доклинические исследования глицирризиновой кислоты при помощи адреналиновой модели поражения миокарда; 2) изучение гистологической и гистохимической картины миокарда крыс с применением адреналиновой нагрузки на миокард; 3) изуче-

ние иммуногистохимических исследований миокарда крыс с применением адреналиновой нагрузки на миокард.

Условия, материалы и методы исследования. Исследования были проведены в условиях кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ. Эксперимент проводили на белых крысах линии Wistar, самцах, массой 380–400 г с использованием адреналиновой модели поражения миокарда. В ходе работы использовали методические рекомендации, разработанные членом-корреспондентом РАМН, профессором И.Н. Тюренковым и доктором биологических наук В.Н. Перфиловой по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств [2, 4]. Крыс содержали в условиях, предписанных правилами по содержанию экспериментальных животных в виварии факультета биотехнологий и ветеринарной медицины. Подопытные крысы были клинически здоровы, условия кормления и поения одинаковые для всех крыс. В ходе исследований нами были сформированы 3 группы крыс по 10 в каждой: в 1 группе в течение 14 дней до однократного введения адреналина животные получали внутрь глицирризиновую кислоту ежедневно в дозе 50 мг/кг; во 2 группе применялось однократное введение адреналина; 3 группа – контроль (интактные).

1 и 2 группе провели адреналиновую нагрузку, однократно ввели 4 мг/кг 0,1 %-ный раствор адреналина гидрохлорида подкожно. Через 48 часов после введения адреналина крысы были декапитированы. Сердца крыс фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина, затем каждое сердце делили поперек на 3 сектора одинаковой толщины: верхний (основание сердца), средний и нижний (верхушка сердца). Образцы тканей обезжизняли в серии спиртов возрастающей концентрации. Затем заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления волокнистых структур соединительной ткани окрашивали по Маллори.

При проведении иммуногистохимических исследований использовали парафиновые срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве антитела применяли TIMP 2 (цитоплазматическое окрашивание) в разведении 1:300. Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиную систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов

без антитела. Подсчет клеток производили в 20 полях зрения каждого образца при увеличении $\times 400$. Осуществлялся подсчет позитивно окрашенных клеток против антитела TIMP-2 в реактивных зонах.

Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Результаты исследования. В миокарде крыс I группы, где применяли глицирризиновую кислоту с адреналином, наблюдали высокую клеточную плотность, признаков некроза сердечных мышечных клеток не обнаружено.

Преобладала инфильтрация миокарда макрофагами и клетками Аничкова. В зоне повреждения выявлялась гипертрофия кардиомиоцитов и их полиплоидия. Встречались оглушенные кардиомиоциты с явлениями пересокращения саркомер. В целом у клеток сохранялась поперечная исчерченность саркоплазмы. Ядра кардиомиоцитов базофильные, крупные, овальные, просветленные с четкой, не размытой кариолеммой. Кровеносные сосуды расширены, просветы свободные. Явлений стаза или тромбоза не обнаружено (рисунки 1, 2).

Выявлялась рыхлая, тонкая, паутинообразная сеть коллагеновых волокон на месте воспалительных клеточных инфильтратов. Патологически расширенных пространств, связанных с гидропической дистрофией, не обнаруживалось (рисунок 3).

В мышечной стенке левого желудочка у крыс II группы, где применяли адреналин, обнаруживались обширные воспалительно-клеточные инфильтраты (рисунок 4).

Выявлялись признаки зернистой дистрофии, а также колликативного некроза кардиомиоцитов, характеризующиеся изменением тинкториальных свойств цитоплазмы, лизисом и набуханием миофибрилл. В поврежденных клетках отмечался кариопикноз ядер. Ядра сморщенные, малых размеров, содержали преимущественно гетерохроматин. Возле поврежденных кардиомиоцитов наблюдались скопления макрофагов, фибробластов, лимфоцитов, адипоцитов. Определялись признаки гидропической, углеводной и жировой дистрофии миокарда (рисунок 5).

Лимфоциты были распределены в эндомизии миокарда диффузно по всей площади мышечной стенки. Выявлялись их скопления в периваскулярном пространстве (рисунок 6). В зонах повреждения миокарда определялся периваскулярный склероз. Помимо этого, в эндомизии диффузно разрастались толстые коллагеновые волокна (рисунок 7). Пучки сердечных мы-

шечных волокон в III контрольной группе плотно прилежали друг к другу. Кровеносные сосу-

ды полнокровные, содержали форменные элементы крови типичного строения (рисунок 8).

Рисунок 1
Кариокинез ядер миокарда (↑).
Инфильтрация макрофагами, клетками Аничкова.
Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 2
Инфильтрация миокарда макрофагами, клетками Аничкова, малодифференцированными клетками и их митоз (↑). Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 3
Сеть тонких коллагеновых волокон.
Окраска по Маллори

Рисунок 4
Воспалительно-клеточные инфильтраты в стенке левого желудочка. Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 5
Жировая дистрофия, некроз кардиомиоцитов.
Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 6
Диффузное распространение лимфоцитов.
Вставка – диапедез лимфоцитов из кровяного русла.
Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 7
Склероз миокарда. Окраска по Маллори

Ядра базофильные, овальные, вытянуты вдоль длинной оси клетки с четкой кариолем-

мой (рисунок 9). Саркомеры выявлялись с периодичной поперечной исчерченностью. При

окраске по Маллори (для выявления коллагеновых волокон) определялась тонкая сеть коллагеновых волокон в эндомизии в периваскулярном пространстве, что является нормой (рисунок 10). Таким образом, применение глицирризиновой кислоты оказывает положительное влияние на гистологическую картину миокарда.

Однократное введение крысам раствора адреналина гидрохлорида подкожно в дозе 4 мг/кг вызывает через 48 часов гистологические изменения в миокарде, характерные для начальной стадии некроза кардиомиоцитов. Профилактическое применение глицирризиновой

кислоты крысам в течение 14 дней в дозе 50 мг/кг предотвращало указанные изменения у крыс с адреналиновой нагрузкой (4 мг/кг). В контрольной и опытной группах выявлена высокая клеточная активность и исход заживления может принять различные формы. Поэтому, исходя из полученных данных, провели иммуногистохимические исследования с применением антитела TIMP-2 с последующей морфометрией, чтобы не только констатировать факт улучшения миокарда после применения глицирризиновой кислоты, но и осветить механизм действия на морфологическом уровне.

Рисунок 8
Миокард левого желудочка.
Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 9
Поперечная исчерченность кардиомиоцитов.
Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 10
Левый желудочек сердца.
Окраска по Маллори

Рисунок 11
Выявление TIMP-2⁺ клеток в миокарде контрольной группы. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления TIMP-2⁺ с докраской гематоксилином

Рисунок 12
Выявление TIMP-2⁺ клеток в миокарде опытной группы 1. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления TIMP-2⁺ с докраской гематоксилином

Рисунок 13
Выявление TIMP-2⁺ клеток в миокарде опытной группы 2. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления TIMP-2⁺ с докраской гематоксилином

Иммуногистохимическое исследование — метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое

выявление в них искомым веществ и основанный на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веще-

ству, которое в данной ситуации служит антигеном (рисунки 11–13). В разновидностях заживления сердечной мышечной ткани существенную роль играет система цинкзависимых ферментов – матриксных металлопротеиназ (ММП) и их ингибиторов (TIMP). В контрольной группе TIMP 2 обнаруживался в интерстиции миокарда в эндомизии, в цитоплазме гистиоцитов или фибробластов (↑).

В опытной группе 1, где применяли адреналин с глицирризиновой кислотой, TIMP 2⁺ клетки выявлялись в интерстиции миокарда в зоне ремоделирования, а также концентрировались возле кровеносных сосудов. В опытной группе 2, где применяли адреналин, TIMP 2⁺ клетки выявлялись в единичных количествах в периваскулярном пространстве (↑).

При исследовании TIMP 2⁺ клеток выявлено, что в опытной группе 1 их количество увеличивалось по сравнению с контролем в 27,5 раза. В опытной группе 2 численность данных клеток практически не отличалась от контрольной группы. Следовательно, глицирризиновая кислота стимулирует в миокарде выраженность клеток TIMP 2⁺. TIMP-2 обладает свойствами, присущими всем TIMPs, ингибирующим MMPs, формируя нековалентные комплексы с активными ферментами. Помимо этого, известна роль семейства TIMP оказывать антиапоптотический эффект, тем самым способствовать росту и выживаемости тканеспецифичных клеток [8]. Поэтому высокое содержание TIMP-2 в

опытной группе 1 указывает на гистопротекторный эффект в поврежденном миокарде, вызванный использованием ГК. Известно, что металлопротеиназы и их ингибиторы секретируются клетками соединительной ткани, где ключевыми участниками являются в том числе и макрофаги [12]. Они являются полиморфной клеточной популяцией, фенотип которых определяется сигналами микроокружения. В опытной группе 1 после использования глицирризиновой кислоты TIMP-2 стимулирует выраженность стромальными или воспалительными клетками. В связи с этим, помимо кардиопротекторного эффекта TIMP-2, не отрицается роль клеточного кардиомиогенеза. Следовательно, кардиомиогенез в опытной группе 1 происходит за счет антиапоптотического эффекта, клеточной и внутриклеточной регенерации – гипертрофии кардиомиоцитов, что гораздо предпочтительнее рубца.

Выводы. Применение глицирризиновой кислоты оказывало положительное влияние на гистологическую картину миокарда крыс. Профилактическое применение глицирризиновой кислоты крысам в течение 14 дней в дозе 50 мг/кг предотвращало гистологические изменения в миокарде, характерные для начальной стадии некроза кардиомиоцитов у крыс с адреналиновой нагрузкой (4 мг/кг). Установлено, что глицирризиновая кислота обладает кардиопротекторным и антиапоптотическим действием.

Библиографический список

1. Вебер, В.Р. Воздействие больших и малых доз адреналина на ремоделирование миокарда левого и правого желудочков сердца крыс линии Вистар в хроническом эксперименте [Текст] / В.Р. Вебер, М.П. Рубанова, П.М. Губская, В.Е. Карев, С.В. Жмайлова, М.Е. Евсеев // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10-2. С. 258–264.
2. Перфилова, В.Н. Кардиопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты при стрессорном воздействии [Текст] / В.Н. Перфилова, В.М. Берестовицкая, О.С. Васильева // *Экспер. и клин. фарм.* 2014. Т. 77. № 9. С. 13–17.
3. Сулейманова, Г.Ф. Возможности получения экологически безопасной продукции животноводства [Текст] / Г.Ф. Сулейманова // *Актуальные проблемы агропромышленного производства (материалы Международной научно-практической конференции, 23–25 января 2013 г., Курск)*. Курск, 2013. С. 298–300.

4. Тюренков, И.Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К, 2012. Ч. I. С. 375–384.
5. Чуваев, И.В. Изучение кардиопротекторных свойств препарата гепакардин [Текст] / И.В. Чуваев, С.В. Глотова, А.А. Кудряшов, Ю.В. Ганкина // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2010. № 2. С. 26–33.
6. Чуваев, И.В. Оптимизация адреналиновой модели инфаркта миокарда на крысах [Текст] / И.В. Чуваев, С.В. Глотова // *Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии. Материалы Всероссийского съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов*. СПб., 2009. С. 28–31.
7. Шакирова, Г.Р. Морфологические изменения в миокарде крыс при интоксикации

гербицидом и коррекции [Текст] / Г.Р. Шакирова, Н.А. Муфазалова, С.М. Шакирова // Успехи современного естествознания. Пенза: Издательский Дом «Академия Естествознания», 2009. № 2. С. 20–21.

8. Adamcová M., Potáčová A., Popelová O. et al. Cardiac remodeling and MMPs on the model chronic daunorubicin – induced cardiomyopathy in rabbit. *Physiol. Res.* 2010; 59: 831–836.

9. Anversa P., Kajstura J., Rota M., Leri A. Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest.* 2013. 123 (1): P. 62–70.

10. Kim W.U., Min S.Y., Cho M.L. et al. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis Arthritis. *Res Ther.* 2005; 7 (1): P. 71–79.

11. Lluri G., Langlois G.D., Soloway P.D. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates myogenesis and beta1 integrin expression in vitro. *Exp. Cell Res.* 2008; 314: P. 11–24.

12. Valente P., Fassina G., Melchiori A. et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int. J. Cancer* 1998; 75: P. 246–253.

Сведения об авторах

1. **Гатиятуллин Ильдар Рафисович**, аспирант кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, e-mail: gatiy-irina@yandex.ru.

2. **Базекин Георгий Вячеславович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, тел.: +7 (347) 228-08-57, e-mail: george.bazekin@rambler.ru.

3. **Чудов Иван Владимирович**, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, тел.: +7 (347) 228-08-57.

В работе представлены экспериментальные данные о влиянии глицирризиновой кислоты на миокард белых крыс при использовании адреналиновой модели поражения миокарда. Уста-

новлено, что глицирризиновая кислота обладает кардиопротекторным и антиапоптотическим свойством.

I. Gatiyatullin, G. Bazekin, I. Chudov

MORFOFUNCTIONAL ASSESSMENT OF A MYOCARDIUM OF WISTAR LINE RATS WHEN USING GLYCYRRHIZIC ACID

Key words: rats; myocardium; glycyrrhizic acid; adrenaline; cardiomyocytes; karyokinesis; cardioprotector; antiapoptotic effect.

Authors' personal details

1. **Gatiyatullin Ildar**, Post-graduate student, the department of morphology, pathology, pharmacy and noncontagious diseases, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», 450001, Ufa, 50-let Octyabrya St., 34, e-mail: gatiy-irina@yandex.ru.

2. **Bazekin George**, Candidate of biological sciences, associate professor of the department of morphology, pathology, pharmacy and noncontagious diseases, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», 450001, Ufa, 50-let Octyabrya St., 34, phone: +7 (347) 228-08-57, e-mail: george.bazekin@rambler.ru.

3. **Chudov Ivan**, Doctor of biological sciences, professor of the Morphology, Pathology, Pharmacy and Non-Contagious Diseases department, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», Ufa, 50-letiya Octyabrya St., 34, phone: +7 (347) 228-08-57.

The paper presents experimental data on influence of glycyrrhizic acid on a myocardium of white rats when using adrenergic model of myocar-

dium damage. Glycyrrhizic acid is found to have cardioprotecting and antiapoptotic properties.

© Гатиятуллин И.Р., Базекин Г.В., Чудов И.В.