

Евразийский Союз Ученых.
Серия: медицинские, биологические и химические науки

Ежемесячный научный журнал

№ 6 (107)/2023 Том 1

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Макаровский Денис Анатольевич

AuthorID: 559173

Заведующий кафедрой организационного управления Института прикладного анализа поведения и психолого-социальных технологий, практикующий психолог, специалист в сфере управления образованием.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

• **Карпенко Юрий Дмитриевич**

AuthorID: 338912

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА, Лаборатория эколого-гигиенической оценки отходов (Москва), доктор биологических наук.

• **Малаховский Владимир Владимирович**

AuthorID: 666188

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Факультеты, Факультет послевузовского профессионального образования врачей, кафедра нелекарственных методов терапии и клинической физиологии (Москва), доктор медицинских наук.

• **Ильясов Олег Рашитович**

AuthorID: 331592

Уральский государственный университет путей сообщения, кафедра техносферной безопасности (Екатеринбург), доктор биологических наук

• **Косс Виктор Викторович**

AuthorID: 563195

Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, НИИ спортивной медицины (Москва), кандидат медицинских наук.

• **Калинина Марина Анатольевна**

AuthorID: 666558

Научный центр психического здоровья, Отдел по изучению психической патологии раннего детского возраста (Москва), кандидат медицинских наук.

• **Сырочкина Мария Александровна**

AuthorID: 772151

Пфайзер, вакцины медицинский отдел (Екатеринбург), кандидат медицинских наук

Статьи, поступающие в редакцию, рецензируются. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несут авторы. Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов. При перепечатке ссылка на журнал обязательна. Материалы публикуются в авторской редакции.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Художник: Валегин Арсений Петрович
Верстка: Курпатова Ирина Александровна

Адрес редакции:

198320, Санкт-Петербург, Город Красное Село, ул. Геологическая, д. 44, к. 1, литера А

E-mail: info@euroasia-science.ru ;

www.euroasia-science.ru

Учредитель и издатель ООО «Логика+»

Тираж 1000 экз.

СОДЕРЖАНИЕ

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

Улуханова Л.У., Карнаева Н.С.

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПАРОТИТ: ПРИВИТОСТЬ
НАСЕЛЕНИЯ И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ В РЕСПУБЛИКЕ
ДАГЕСТАН 3

Хасанов К.С.

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ ИЗУЧЕНИЯ
ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 5

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г.

ОЦЕНКА ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ГЛУТАМАТА И NO-ГЕНЕРИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ
НА ЗЕРНИСТЫЕ КЛЕТКИ МОЗЖЕЧКА КРЫС 15

ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ

Веревкина М.Н.

ЗООГИГИЕНИЧЕСКИЕ НОРМЫ ПИТАНИЯ И
СОДЕРЖАНИЯ ТЕЛЯТ 25

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПАРОТИТ: ПРИВИТОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН

Улханова Л.У., Карнаева Н.С.

Дагестанский государственный медицинский университет

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2023.4.107.1832

Актуальность работы.

Эпидемический паротит (ЭП) представляет собой острое системное вирусное инфекционное заболевание, регистрируемое чаще у детей школьного возраста, так как возбудитель обладает достаточно высоким индексом контагиозности. Однако этот факт не исключает возможность развития заболевания у взрослых (основной диапазон охвата: лица от 2 до 25 лет). Заболевание характеризуется преимущественным поражением слюнных желез, а также других железистых органов и нервной системы.

Первичной локализацией возбудителя на слизистой верхних дыхательных путей с последующим поражением слюнных желез определяется воздушно-капельный путь распространения инфекции. Кроме того, допускается возможность передачи возбудителя путем прямого контакта с игрушками или посудой, контаминированных инфицированной слюной, однако следует помнить, что такой путь передачи может быть реализован только в детском коллективе, поскольку вирус ЭП нестойк во внешней среде. Одним из факторов, ускоряющих распространение вируса ЭП, является наличие сопутствующих острых респираторных инфекций — за счет существенного повышения выделения возбудителя во внешнюю среду [1-4].

Паротитная инфекция относится к «управляемым» инфекциям, уровень заболеваемости которых зависит от проведения вакцинации. В 2022 году в Российской Федерации зарегистрировано 573 случая эпидемического паротита, показатель заболеваемости составил 0,39 на 100 тыс. населения, что превышает показатель за 2021 года в 2,1 раза (2021 – 0,19 на 100 тыс.). В возрастной структуре заболевших 64 % составили дети до 17 лет в 2022 году.

Летальность невелика, но недостаточное внимание врачей к особенностям течения данного заболевания у взрослых таит в себе серьезную опасность из-за возможности поражения, в частности, нервной системы и репродуктивного аппарата мужчин. С этим заболеванием могут быть связаны такие последствия как бесплодие, глухота и сахарный диабет. На сегодняшний день только в 38% странах мира вакцинация против эпидемического паротита включена в национальные прививочные календари, поэтому мероприятия по снижению заболеваемости этой инфекцией и ее профилактики остаются по-прежнему весьма важными.

Цель исследования.

Провести анализ охвата вакцинации против данной инфекции, а также изучить особенности течения эпидемического паротита у больных с поражением других железистых органов и ЦНС.

Результаты исследования

Паротитная инфекция относится к «управляемым» инфекциям, уровень заболеваемости которых зависит от проведения вакцинации. Период с 2007 по 2015 гг. был наиболее благоприятным в республике Дагестан по этой инфекции, но с начала 2016 года эпидобстановка стала ухудшаться. В результате массовых отказов от прививок по республике Дагестан за 2017 г. зарегистрировано 2632 случая паротитной инфекции. для сравнения за весь 2016 г. было зарегистрировано 148 больных, а в 2015 г. только 1 больной.

Зарегистрировано за 2022 год - 479 сл. против 212 за аналогичный период 2021г (рост в 2,2 раза.). Из числа заболевших дети до 17 лет – 389 сл. (81,2 % уд. вес. в возрастной структуре). Случаи зарегистрированы на 20-ти административных территориях, на 4-х с превышением республиканского показателя. Эпидемический характер распространения продолжается на территориях г. Махачкалы, г. Хасавюрт, Хасавюртовский и Новоллакский районы. В городской местности эпидпроцесс проявляется более интенсивно (выше в 5,9 раза), чем в сельской местности. В эпидпроцесс было вовлечено: 40 дошкольных образовательных учреждений; 30 средних образовательных учреждений; 3 высших учебных заведений. Всего контактных 8416 чел., из них детей 7406, взрослых 1010.

Болезнь протекала как с поражением слюнных желез (чаще всего околоушных), так и с одновременным поражением поджелудочной железы, орхита и серозного менингита. В 100% случаев отмечалось острое начало заболевания, с повышения температуры до 38-40С, появления отека в проекции околоушных желез, сама железа мягкоэластичная, безболезненная при пальпации. При надавливании позади мочки уха отмечалась выраженная болезненность (симптом Филатова). Лихорадка чаще достигала максимальной выраженности на 1-3 сутки заболевания и продолжалась до 4-8 дней с последующим снижением. Длительность лихорадки до трех дней наблюдалась у 80%, 5-6 дней – у 16%, 7-8 дней – у 4% больных, продолжительность лихорадки было связано с вовлечением в процесс других железистых органов и ЦНС.

В случае менингита больные жаловались на головную боль, тошноту, рвоту, чаще неоднократную. Одновременно наблюдались и менингеальные знаки: ригидность затылочных мышц, симптом Кернига. Признаки менингита на фоне паротита отмечались на 4-5 сутки, средний возраст больных составил 6 и 30 лет. Признаки интоксикации и менингеальные симптомы, продолжались в среднем 4-5 дней, с последующим исчезновением на фоне лечения. При изучении показателей ЦСЖ выявлялся лимфоцитарный плеоцитоз (до 1000 клеток) с незначительным повышением белка до 0,4г/л. Течение заболевания было гладким, ликвор санировался на 14-16 сутки от начала заболевания. Полное выздоровление отмечалась в 100% случаев.

Орхит, на фоне паротита развивался чаще односторонний (в 95% случаев), средний возраст больных составил от 15 до 42 лет. Исход болезни у всех больных был благоприятный.

Течение панкреатита при данной инфекции имел доброкачественный характер, без ярко выраженной клинической симптоматики, полное выздоровление наблюдалось через 7-10 дней. У всех больных имело место повышение активности амилазы крови в 2-10 раз выше нормы.

Комплексное лечение включало: соблюдение постельного режима, диета с ограничением жирной, острой, кислой еды; назначение витаминов, десенсибилизирующая терапия, полоскание полости рта после приема пищи, противовирусного препарата – циклоферона, дегидратационная и дезинтоксикационная терапия. При орхите в проводимую терапию включали преднизолон из расчета 2 мг/кг в сутки коротким курсом на 5-6 дней. При панкреатите внутривенно вводили гордокс.

Результаты серомониторинга выявили высокий процент серонегативных лиц к эпидпаротиту (23%-32,9%), превышающий нормативный показатель почти в 2 раза. Недостаточный уровень защиты был выявлен в возрастной группе 20-29 лет. Тенденция «повзреления» опасна тем, что появляется риск заболевания женщин детородного возраста и, следовательно, развития врожденных форм эпидемического паротита, а также их новорожденные дети, не обладая материнским иммунитетом, не защищены от этой инфекции с момента рождения и могут активно вовлекаться в эпидемический процесс паротитной инфекции в течение первого года жизни.

Из числа заболевших полный курс иммунизации получили 220 чел. (45,9%), не привитые 259 чел. (55,0%), из них по причине отказов - 161 (62,1%), медицинских отводов-15 (5,8%) и с неизвестным прививочным анамнезом 83 чел. (32,0%).

Случаи заболевания у привитых лиц в отдаленные сроки после полного курса иммунизации обусловлены угасанием постпрививочного иммунитета, недостаточной биологической активностью вакцины и нарушениями в соблюдении «холодовой цепи» при транспортировке и хранении вакцины.

Привито по **эпидемическим показаниям** 5970 контактных (детей 5087, взрослых 226), из них в домашних очагах 330 контактных (детей 249, взрослых 81), в организованных очагах 5340 контактных (детей 5195, взрослых 145). Не привито по показаниям 565 контактных (детей 425 взрослых 140). По причине отказов 289 контактных (детей 223, взрослых 66), временных мед. отводов 9 контактных (детей 3, взрослых 6), не известный прививочный анамнез у 267 человек.

Таким образом, вирус эпидемического паротита в большинстве случаев вначале поражает околоушные слюнные железы, затем присоединяются поражения других железистых органов и ЦНС. Клиническая картина паротитной инфекции у взрослых имеет ту же клинику, что у детей. Результаты серомониторинга выявили высокий процент серонегативных лиц к эпидпаротиту (23%-32,9%), превышающий нормативный показатель почти в 2 раза. Недостаточный уровень защиты был выявлен в возрастной группе 20-29 лет.

Список литературы:

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 г.» <http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php>.
2. СП 3.1.2952-11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита» <http://05.rospotrebnadzor.ru/docums/regional/sanpin/>
3. Малов В.А., Горобченко А.Н. Эпидемический паротит. Лечащий врач. - 2003.- № 9.
4. Харченко Г.А., Кимирилова О.Г. Эпидемический паротит у детей - актуальность проблемы. Детские инфекции, 2017;16 (3): 28-31.

УДК:618.19-089

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(Обзор литературы)

Хасанов К.С.

*Республиканский специализированный научно-практический
медицинский центр онкологии и радиологии*

THE BASIC APPROACHES TO STUDYING THE LYMPHATIC SYSTEM IN BREAST CANCER (Literature review)

Khasanov K.S.

*Republican Specialized Scientific and Practical
Medical Center of Oncology and Radiology
DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2023.4.107.1833*

РЕЗЮМЕ

Рак молочной железы является одной из наиболее важных причин преждевременной смертности среди женщин и одной из наиболее часто диагностируемых опухолей во всем мире. Данная статья направлена на обзор новых методологических исследований для оценки анатомии лимфатической сети, а также молекулярного и физиологического контроля функции лимфатических сосудов, с целью объяснить, как лимфатическая система способствует процессу развития заболевания, уделяя особое внимание раку молочной железы. Новые методы лимфатической визуализации и вмешательства, включая внутривенную лимфангиографию, магнитно-резонансную лимфангиографию с динамическим контрастом и лимфатическую эмболизацию, расширили знания об анатомии лимфатической системы.

SUMMARY

Breast cancer is one of the most important causes of premature death among women and one of the most frequently diagnosed tumors worldwide. This article aims to review new methodological studies for assessing the anatomy of the lymphatic network, as well as the molecular and physiological control of the function of the lymphatic vessels, with the aim of explaining how the lymphatic system contributes to the disease process, with a particular focus on breast cancer. New methods of lymphatic imaging and intervention, including intranodal lymphangiography, magnetic resonance lymphangiography with dynamic contrast, and lymphatic embolization, have increased knowledge of the anatomy of the lymphatic system.

Ключевые слова: рак молочной железы, лимфатическая система; лимфатические метастазы, лечение противоопухолевыми препаратами, лучевая терапия.

Keywords: breast cancer, lymphatic system; lymphatic metastases, treatment with anticancer drugs, radiation therapy.

Лимфатическая система, включая лимфатические сосуды и лимфатические узлы, играет ключевую роль как в балансе тканей и жидкости, так и в переносе иммунных клеток; и ответ. Несмотря на всю важность, грубая анатомия этой системы долгое время игнорировалась. Действительно, в отличие от сердечно-сосудистой системы, лимфатическая сеть характеризуется почти невидимыми и хрупкими сосудами, по которым транспортируется лимфа, прозрачная и бесцветная жидкость [6].

При рассмотрении исторической идентификации лимфатической системы неудивительно, что лимфатическая система была первоначально открыта случайно, поскольку анатомы столкнулись с техническими трудностями при открытии и демонстрации этой системы. В 1622 г. итальянский анатом Аселли (581-1625) показал лимфатические сосуды кишечника у сытых собак. Периферические отделы лимфатической системы полупрозрачны и содержат бесцветную жидкость (лимфу) [6,8]. Поэтому их необходимо контрастировать, чтобы отличить эти крошечные сосуды. Таким образом, в восемнадцатом веке были

разработаны методы инъекций для идентификации лимфатической системы, и несколько ученых смогли описать ее общую анатомию [10].

В 1787 г. итальянский анатом Маскани опубликовал очень подробный труд о лимфатической системе *Vasorum lymphaticorum corporis humani historia et ichnographia* [13]. Эта система появилась также в его последующей работе *Atatomiae universae icones*, включая аксиальную область [14], но лимфатические сосуды молочной железы еще не были представлены.

Первое изображение лимфатических сосудов груди было предоставлено Саппеем (Sappey) в 1874 г., опять же с использованием подхода с инъекцией ртути [15]. Эта знаковая работа Саппея содержала такие детали, что уже давно считается безупречной и в настоящее время по-прежнему является основным источником информации о лимфатической системе как для анатомов, так и для клиницистов [16]. После Саппея румынский анатом Герота разработал контрастное вещество на основе синей масляной краски для замены инъекций токсичной ртути [17], а Пуарье и Кунео в 1902 году представили обзор лимфатического дренажа груди

[18]. Однако этот новый контрастный агент продвигался только на короткое расстояние внутри лимфатических сосудов, и поэтому было необходимо применить эту технику к трупам детей или эмбрионов [17,19]. Поскольку молочные железы у детей еще не сформировались, дополнительная информация о лимфодренаже молочной железы была недоступна до тех пор, пока Суами и его коллеги не разработали новую технику инъекций, которую можно было применять у взрослых трупов и которая также позволила сделать рентгенографию в 2005 г. [20,21]. Последние анатомические изображения лимфатической системы молочной железы получены на основе методологии Суами, и в последние годы они предприняли тщательные усилия для картографирования поверхностных лимфатических сосудов руки и груди либо с использованием инъекционных растворов на основе оксида свинца или индоцианинового зеленого [22-25].

Более подробно Суами (Suami) и др. [16] и Вай (Wai) [26] опубликовали интересные исторические статьи, посвященные описанию лимфатических сосудов молочной железы, от прошлых анатомических исследований до современных методик. Несмотря на эти исследования, анатомию и физиологию лимфатических сосудов груди необходимо пересмотреть и лучше разъяснить, чтобы получить дополнительные знания. Эта информация важна для патологов, хирургов, онкологов, фармакологов, рентгенологов и радиотерапевтов, занимающихся профилактикой и терапией рака молочной железы [27]. Неудивительно, что анатомия лимфатической системы оказывается различной и меняет свою организацию в зависимости от органа, в котором эта сеть развита. Таким образом, помимо менингеальных лимфатических путей [28], в центральной нервной системе, где классическая лимфатическая сеть не распознается, интригующий лимфатический путь был описан как альтернативная система удаления отходов [28,29].

В последнее время были разработаны новые анатомические и физиологические концепции для лучшего понимания лимфатической системы. Поскольку нормальная анатомия лимфатической системы важна для прогнозирования того, какие лимфатические узлы могут быть поражены метастазами после первичной опухоли, знание топографии может помочь в этом подходе. Эта концепция также актуальна для понимания вторичного лимфатического отека, возникающего после удаления лимфатических узлов у онкологических больных [30].

Собирающие лимфатические сосуды снабжены классическими клапанами, а недавно было обнаружено, что они также окружены специализированными лимфатическими мышечными клетками. Мышечный сегмент между двумя клапанами вызывает сокращение и ведет себя как автономный насос, обеспечивающий однонаправленное перемещение лимфы к

лимфатическим узлам. Этот специализированный сегмент получил название «лимфангион». Механизмы этой лимфатической сократимости, по-видимому, зависят от различных факторов, включая оксид азота и динамику внутриклеточного кальция. После сокращения оксид азота, индуцированный ток лимфы по лимфатическим эндотелиальным клеткам, вызывает мышечную релаксацию и расширение сосудов, что позволяет заполнить лимфангионы [31-35].

Вопрос о метастазировании раковых клеток до сих пор остается предметом дискуссий. Были предложены различные модели распространения от первичной опухоли до системного кровообращения. Некоторые злокачественные клетки, по-видимому, получают доступ непосредственно к месту первичной опухоли. Поскольку опухоли имеют повышенное давление интерстициальной жидкости, это может способствовать проникновению раковых клеток через эндотелиальные клетки лимфатических капилляров. Кроме того, открытие того, что опухоли могут индуцировать ангиогенез, то есть образование новых кровеносных или лимфатических сосудов, подтвердило эту гипотезу, и для этой концепции был придуман термин «лимфоваскулярная инвазия» [36]. Было показано, что в случае рака молочной железы большинство сосудов, вовлеченных в эту инвазию, являются лимфатическими. В соответствии с этим утверждением радикальная мастэктомия для хирургического лечения рака молочной железы представляла собой наилучший подход. Также показано, что раковые клетки могут попадать в системный кровоток через сторожевой лимфатический узел, где описана премеастатическая фаза. В этом случае раковые клетки пролиферируют в этом лимфатическом узле, где они сталкиваются с различными типами сосудов, в том числе с расширенными высокоэндотелиальными венами и новообразованными кровеносными и лимфатическими капиллярами, индуцированными факторами роста эндотелия сосудов. Таким образом, раковые клетки попадают в кровоток для распространения. Скорее всего, клетки рака молочной железы попадают в системный кровоток не в первичном очаге, а главным образом через сторожевой лимфатический узел, и биопсия этого основного индикатора может повлиять на подмышечную диссекцию во время хирургического доступа к патологии. **Тем не менее, роль подмышечных лимфатических узлов в метастазировании в отдаленные органы еще предстоит выяснить [6,35-41].**

Однако раковые клетки могут также распространяться из первичного рака молочной железы через кровеносные сосуды после интенсивного неоангиогенеза (стимулируемого проангиогенными факторами роста, такими как VEGF-A), который поэтому называется гематогенным распространением. Новые ангиогенные кровеносные сосуды обычно

аномальные, без перicyтов и с многочисленными фенестрациями. Эти характеристики делают возможной интравасацию и распространение циркулирующих онкологических клеток (ЦОК) [42]. Например, легочные метастазы рака молочной железы имеют гематогенный механизм своего наиболее распространенного пути распространения [43]. Более того, при раке молочной железы количественная оценка ЦОК использовалась в качестве прогностического биомаркера для проведения лечения метастатического заболевания [44]. Гематогенное распространение раковых клеток зависит не только от микроокружения опухоли и ангиогенеза, но и от особенностей раковых клеток. Недавно Калинкова Л. (Kalinkova) с коллегами продемонстрировали, что снижение метилирования в генах *SNAI2* и *ADAM23* связано с дедифференцировкой клеток рака молочной железы и их гематогенным распространением [45]. Наконец, недавние данные свидетельствуют о том, что скопления циркулирующих опухолевых клеток, обогащенных стромальными фибробластами, ассоциированными с раком, у пациентов с раком молочной железы увеличивают их гематогенный метастатический потенциал [46].

Метастатические поражения лимфатических узлов являются одним из наиболее важных прогностических факторов у больных раком молочной железы. Понимание механизмов, управляющих метастазированием в лимфатические узлы при раке молочной железы, из-за их клинического значения является ключевым аспектом любого будущего исследования [48]. Например, два хемокиновых рецептора, *CXCR4* и *CCR7*, вовлечены в регуляцию метастатического процесса. Более того, лимфангиогенез в значительной степени управляется путем *VEGFR-3*, тирозинкиназным рецептором, экспрессируемым главным образом на лимфатическом эндотелии, при этом *VEGF-C* и *VEGF-D* являются основными регуляторами этого пути. *VEGF-C* и *VEGF-D* могут способствовать образованию внутриопухолевых лимфатических сосудов путем связывания с *VEGFR-3*, а также могут вызывать морфологические изменения в околоопухолевых лимфатических сосудах, которые способствуют проникновению опухолевых клеток в лимфатические сосуды. Моделирование на мышах, показало, что *VEGF-C* увеличивает внутриопухолевый лимфангиогенез и частоту метастазирования в лимфатические узлы. Кроме того, многочисленные исследования показывают, что повышенный уровень *VEGF-C* регистрируется в 30-40% случаев рака молочной железы и коррелирует с высокой частотой лимфоваскулярной инвазии, метастазированием в лимфатические узлы и более низкой выживаемостью без признаков заболевания. Идентификация лимфатических биомаркеров, включая подоплайн и *LYVE-1*, значительно расширила область изучения лимфатического метастазирования [49-51]. Таким образом, разработка моделей, воссоздающих процесс

лимфатического метастазирования на животных, имеет важное значение, а включение протеомных и геномных платформ в клинические исследования имеет основополагающее значение для обнаружения потенциально новых лимфатических биомаркеров и возможных новых терапевтических мишеней [52].

В дополнение к этим новым методам, классические техники инъекций все еще могут помочь анатомам и онкологам в понимании конкретных клинических состояний. Крайне важно определить соответствующие биомаркеры, которые могут отличить лимфатические узлы, склонные к метастазированию. Хирургическое удаление метастазов в лимфатических узлах может уменьшить распространение рака, но в то же время может ослабить системные противоопухолевые иммунные реакции и усугубить лимфатический отек. Кроме того, визуализация лимфатических сосудов молочной железы или выявление морфологических изменений лимфатической системы, указывающих на лимфедему молочной железы, имеет важное значение для качества жизни больных раком. Опять же, знание анатомии важно для наложения хирургического лимфовенулярного анастомоза с целью улучшения оттока лимфы.

2. Методы описания лимфатической анатомии молочной железы

После разработки своей техники лимфатических инъекций группа Суами в основном сосредоточилась на лимфедеме для своих лимфатических инъекций, и поэтому их больше всего интересовали поверхностные лимфатические узлы; Между тем, полный обзор поверхностных и глубоких лимфатических узлов и их соединений может дать еще более полное представление об анатомии лимфатической системы. Представляя свои результаты только на 2D-рентгенограммах, которые не отображают пространственные отношения между лимфатическими сосудами и окружающими анатомическими структурами, может показаться, что результаты Суами все еще можно улучшить. Выводы Суами противоречили изображениям лимфатической системы груди, представленной Саппием. Саппей показал, что субареолярное сплетение получает все лимфатические сосуды, дренирующие грудь, но Суами и его коллеги показали альтернативные схемы дренирования [22]. Недавние исследования лимфосцинтиграфии также показали, что Саппею не удалось захватить весь объем лимфатических сосудов молочной железы, поскольку иногда регистрировались альтернативные пути лимфатического оттока [53]. Здесь следует отметить, что лимфосцинтиграфия выполняется только в клинических условиях, чтобы картировать распространение опухоли на сигнальный лимфатический узел, таким образом фокусируясь только на небольшой области в непосредственной близости от опухоли. Путем введения красителя (радиоактивного красителя в случае лимфосцинтиграфии и нерадиоактивного красителя в случае лимфангиографии) вблизи

опухоли можно визуализировать дренаж опухоли и идентифицировать сторожевой лимфатический узел для биопсии, т.к. он будет выделен красителем [54,55]. Обратное аксиллярное картирование — это особый вид лимфатического картирования, который может быть выполнен во время хирургического вмешательства. При обратном подмышечном картировании краситель вводится в руку, а не в ткань молочной железы, окружающую опухоль. Целью этой процедуры является отсечение красителя до лимфатических узлов, которые дренируют плечо, чтобы определить пути дренажа руки. Эта процедура дает важную информацию для предотвращения лимфатического отека руки, который может возникнуть как побочный эффект хирургического вмешательства, если после хирургического вмешательства не остается жизнеспособного пути оттока лимфы из руки [56]. Оба метода выполняются как можно скорее, чтобы избежать ненужного воздействия радиоактивного индикатора или длительной операции, и поэтому они не подходят для картирования всей лимфатической сети в области, например, в анатомическом исследовании. Наконец, Тернер-Уорвик даже предположил, что Саппей перепутал млечный проток с лимфатическим, основываясь на инъекциях пациентам радиоактивного коллоидного золота [57].

Учитывая тот факт, что лимфатические сосуды, как известно, трудно визуализировать, изображение лимфатической системы по отношению к костям и мягким тканям в этой области имеет решающее значение для области лучевой терапии, поскольку планирование лечения выполняется на КТ пациентов, которые не показывают расположение лимфатических сосудов [61,62]. Для этой цели доступны рекомендации по разграничению лимфатических мишеней, но они основаны на сосудистой сети (которая, как было показано, находится в непосредственной близости от лимфатических сосудов [63]), а не на фактическом расположении лимфатической системы [63,64]. Таким образом, когда пространственно точные изображения лимфатической системы могут быть предоставлены вместе с анатомическими структурами, которые могут быть идентифицированы на КТ пациента, рекомендации по разграничению могут быть уточнены, а лучевая терапия может стать более точной, а это означает, что доза облучения в ткани-мишени (лимфатические узлы) могут быть максимально увеличены, а доза облучения здоровых тканей (сердца и легких) может быть сведена к минимуму, обеспечивая лучший контроль опухоли с меньшим количеством побочных эффектов [65,66]. Важно понимать, что поверхностные лимфатические сосуды не являются единственной целью лучевой терапии. При обнаружении метастазов в подмышечных лимфатических узлах основной мишенью для лечения лимфатических узлов становится подключичный лимфатический ствол,

чтобы предотвратить попадание раковых клеток в кровоток в месте впадения грудного протока в венозный угол [67]. В то время как атлас Саппея показывает поверхностные лимфатические сосуды молочной железы, подключичный лимфатический ствол не включен [15]. Одно из немногих оригинальных изображений этого подключичного лимфатического ствола можно найти в атласе Маскани [13]. С одной стороны, более точная лучевая терапия может повысить эффективность лечения и предотвратить долгосрочные побочные эффекты, такие как болезни сердца или вторичный рак легких [68,69]. С другой стороны, если лимфатические пути от груди и руки могут быть разделены, а лимфатические пути, не связанные с грудью, могут быть сохранены, более точное лучевое лечение может также повлиять на частоту образования лимфатического отека руки.

Чтобы определить местонахождение лимфатической системы с помощью медицинской визуализации, сначала необходимо ввести контрастное вещество в лимфатическую систему. При обзоре литературы по лимфатическим инъекциям можно увидеть четкое разделение подходов к инъекциям. С одной стороны, существует антероградный инъекционный подход, который начинается с мельчайших лимфатических ветвей и следует направлению однонаправленных клапанов, находящихся внутри собирающих лимфатических сосудов. Этот метод пропагандировался в литературе, а также использовался Суами и др. [20,21,25]. Несмотря на то, что этот метод показал впечатляющие результаты на 2D-рентгенограммах, образцы оказались непригодными для медицинской визуализации, которая позволяет выполнять 3D-реконструкцию, например, КТ или МРТ. Эта деликатная техника требует индивидуальной катетеризации полупрозрачных поверхностных лимфатических сосудов в микроскопическом диапазоне, и для получения образца требуется много времени. [23].

Основываясь на недостатках подходов антероградной инъекции, другой способ лимфатической инъекции, а именно ретроградная инъекция, становится более привлекательной. Вместо того, чтобы находить все терминальные ветви лимфатических сосудов, можно было бы вместо этого канюлировать грудной проток и ввести инъекцию против тока лимфы, чтобы заполнить лимфатические сосуды от большого диаметра до малого, а не наоборот. Теоретически это может быть выполнено только с одной канюляцией, что значительно сокращает процедуру инъекции. Однако в литературе не рекомендуется использовать метод ретроградной инъекции, утверждается, что лимфатические клапаны препятствуют успешному ретроградному наполнению. Несмотря на то, что ретроградные инъекции не рекомендуются, ни один из авторов не упоминает, до какой степени ретроградная инъекция была изучена, прежде чем сделать это заявление [20, 57, 71]. Мало того, что ретроградный

инъекционный подход значительно сократит время эксперимента, он также позволит провести локальную диссекцию, чтобы канюлировать грудной проток в одной точке, тем самым сохранив пространственные отношения между подключичным лимфатическим стволом (целевой лимфатической терапией для лучевой терапии). и окружающая анатомия не повреждена. В случае успеха ретроградная инъекция не только заполнит подключичный лимфатический ствол, но и покажет, как эта структура соединяется с поверхностными лимфатическими сосудами, что даст дополнительную ценную информацию об анатомии лимфатических сосудов. Таким образом, исследователи рассматривали возможность изучения методологии ретроградной инъекции, чтобы проверить, возможно ли это. Чтобы предотвратить гниение и расширить экспериментальное окно, для этой цели были выбраны забальзамированные образцы.

3. Молекулярные исследования лимфатической системы молочной железы

Метастазы опухоли на отдаленных участках являются основной причиной смерти от рака, и около 30% пациентов с раком молочной железы имеют метастазы в лимфатические узлы, что является одним из наиболее важных прогностических факторов при этой патологии [89]. Совсем недавно выявление специфических лимфатических маркеров вызвало «ренессанс» в области изучения лимфатического метастазирования и в определении роли лимфангиогенеза в метастатическом процессе [52]. Действительно, лимфангиогенез, проанализированный с помощью селективных лимфатических маркеров, оказался более развитым при раке молочной железы по сравнению с нормальными тканями молочной железы. Более того, среди опухолей молочной железы те, которые метастазировали в лимфатические сосуды, показали более высокую экспрессию маркеров лимфангиогенеза по сравнению с теми, которые не были метастатическими [90].

При раке молочной железы хемокиновые рецепторы CXCR4 и CCR7 участвуют в процессе метастазирования лимфатических узлов, а экспрессия их лигандов CXCL12 и CCL21 лимфатическими эндотелиальными клетками привлекает опухолевые клетки в лимфатические сосуды [52,91]. Недавно была идентифицирована и подтверждена клеточную субпопуляцию клеток рака молочной железы с высоким уровнем экспрессии CXCL14 в положительных лимфатических узлах пациентов с раком молочной железы. Экспрессия CXCL14 была значительно выше у больных раком молочной железы с метастазами в лимфатические узлы, что позволяет предположить, что этот белок является новым прогностическим маркером лимфатических метастазов [92].

Лимфангиогенез в основном управляется VEGFR-3 с ключевой ролью эндогенных лигандов этих рецепторов, таких как VEGF-C и VEGF-D [93]. VEGF-C и VEGF-D экспрессируются в опухолевых

клетках и клетках микроокружения опухоли, тогда как VEGFR-3, тирозинкиназный рецептор, экспонируется на цитоплазматических мембранах лимфатических эндотелиальных клеток. Как VEGF-C, так и VEGF-D способствуют образованию внутриопухолевых лимфатических сосудов, связывающих VEGFR-3 [94]. Внутриопухолевый лимфангиогенез, индуцированный VEGF-C, был связан с частотой метастазирования в лимфатические узлы в доклинической модели метастазирования [49]. Интересно, что повышенные уровни VEGF-C наблюдаются в 30-40% случаев рака молочной железы и, прежде всего, они связаны с инвазией лимфатических сосудов, метастазированием в лимфатические узлы и более коротким периодом безрецидивного прогрессирования [50,51].

Лимфангиогенез также может быть подходящей терапевтической мишенью для блокирования лимфатических метастазов, но в настоящее время антилимфангиогенные соединения не одобрены для клинического применения. Недавно Garda-Caballero и соавторы предложили антиангиогенный препарат AD0157, полученный из морского гриба *Parasponiothyrium* sp., в качестве эффективного антилимфангиогенного соединения [95]. AD0157 сильно снижал связанный с опухолью лимфангиогенез и останавливал метастатическое распространение в лимфатические узлы, индуцируя апоптоз в лимфатических эндотелиальных клетках и уменьшая фосфорилирование VEGFR-3 [95].

VEGFR-3 является одним из наиболее часто используемых маркеров лимфатических эндотелиальных клеток в тканях рака молочной железы, но есть также другие белки, которые, как сообщается, специфичны для лимфатических сосудов, такие как подоплатин, эндотелиальный рецептор гиалуроновой кислоты-1 лимфатических сосудов (LYVE-1), и родственные белки гомеобокс-1 (PROX-1) [96,97]. В частности, подоплатин является маркером, обычно используемым для исследования инвазии лимфатических сосудов клетками рака молочной железы [98].

В 2019 г. был описан еще один фактор, способствующий лимфангиогенезу и метастазированию в лимфатические узлы при раке молочной железы [100]. Лизилоксидазоподобный белок 2 (LOXL2), полученный из опухолевых клеток, исследовали с помощью иммуногистохимии в тканях пациентов с раком молочной железы. Было обнаружено, что LOXL2 связан с плотностью лимфатических сосудов. Более того, в доклинических исследованиях на мышах сверхэкспрессия LOXL2 клетками рака молочной железы значительно усиливала лимфангиогенез и метастазирование в лимфатические узлы. Следует отметить, что LOXL2 также был способен провоцировать секрецию пролимфангиогенного фактора VEGF-C фибробластами [100].

Наконец, в ряде исследований пациентов изучались различия между первичными опухолями молочной железы и их метастазами в лимфатические узлы с точки зрения статуса метилирования. Действительно, метилирование человеческого аутосомно-доминантного 5-го гена на хромосоме 7p15 (DFNA5) увеличивает риск метастазирования в лимфатические узлы [101], тогда как гиперметилирование гена-супрессора опухоли CDH1, который кодирует трансмембранный гликопротеин E-кадгерин, увеличил метастазирование в подмышечные лимфатические узлы с худшей безрецидивной выживаемостью этих пациентов [102].

Стратегии по ограничению лимфатической дисперсии рака были в центре внимания исследований рака, в частности, после развития молекулярных исследований лимфангиогенеза. Однако не существует одобренных препаратов, подавляющих лимфангиогенез опухоли, несмотря на известные последствия метастазирования по лимфатической системе. Следовательно, срочно необходимо открытие новых антилимфангиогенных препаратов, чтобы ответить на конкретную терапевтическую потребность, которую нельзя откладывать [103]. Недавно различные группы предложили новые соединения, обладающие антилимфангиогенными и антиметастатическими свойствами. Анлотиниб, ингибитор рецепторной тирозинкиназы, ингибировал появление метастатических поражений в доклинических и клинических исследованиях за счет уменьшения лимфангиогенеза и лимфатического метастазирования, инактивируя фосфорилирование VEGFR-3 [104]. Более того, полученная из грибов молекула под названием фомакетид А продемонстрировала ингибирующее действие на лимфатические эндотелиальные клетки через VEGFR-3 [105], тогда как AD0157 показал выраженную антилимфангиогенную активность, индуцируя апоптоз в лимфатических эндотелиальных клетках и уменьшая VEGFR-3-/-2 фосфорилирование [95].

Выводы

1. Рак молочной железы является основной причиной смертности от рака среди женщин. Это одно из наиболее часто диагностируемых неопластических заболеваний во всем мире, а лимфатическая система является основным путем распространения раковых клеток. Действительно, лимфатические метастазы являются одной из основных причин распространения новообразований у больных раком молочной железы, поскольку злокачественные клетки колонизируют лимфатические узлы и отдаленные органы, что приводит к ухудшению прогноза [1]. Таким образом, знание как анатомических, так и молекулярных аспектов лимфатической сети имеет основополагающее значение для понимания механизмов прогрессирования заболевания.

2. Представлены важные переменные, с которыми столкнулись в ходе предыдущих

экспериментов, и ожидается, что путем нахождения идеального баланса между предложенными адаптациями текущая методология может быть оптимизирована для обеспечения полного ретроградного заполнения подключичного лимфатического ствола. Что касается будущих перспектив, путем детального изображения подключичного лимфатического ствола и его притоков по отношению ко всем окружающим анатомическим образованиям исторические анатомические атласы могут быть проверены и дополнены на основе объективных пространственных отношений, полученных из системы координат КТ (а не из рисунков), дающих обновленную клинически значимую информацию.

3. Наконец, путем картирования лимфатических потоков в большом количестве образцов можно было предсказать распространение опухоли на основе локализации первичной опухоли [106], а физиотерапевтические массажи/методы лечения лимфедемы можно было адаптировать в соответствии с лимфатическими паттернами, чтобы способствовать естественному течению лимфы.

4. В заключение, помимо открытия новых мощных антилимфангиогенных препаратов для будущих клинических условий, глубокое исследование лимфатической сети молочной железы и лимфатических молекулярных механизмов будет иметь важное значение для поддержки любых будущих разработок в области лечения рака молочной железы.

Литература

- Lukasiewicz, S.; Czezelewski, M.; Forma, A.; Baj, J.; Sitarz, R.; Stanislawek, A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers* 2021,13, 4287. [CrossRef] [PubMed]
- Coughlin, S.S. Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019,1152, 9-29. [PubMed]
- Solanki, M.; Visscher, D. Pathology of breast cancer in the last half century. *Hum. Pathol.* 2020, 95,137-148. [CrossRef] [PubMed]
- Ekmektzoglou, K.A.; Xanthos, T.; German, V.; Zografos, G.C. Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009,145, 3-8. [CrossRef]
- Budh, D.P.; Sapra, A. *Cancer Breast Screening*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021.
- Padera, T.P.; Meijer, E.F.; Munn, L.L. The Lymphatic System in Disease Processes and Cancer Progression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2016,18,125-158. [CrossRef]
- Aselli, G. *De Lactibus Sive Lacteis Venis, Quarto Vasorum Mesaraicorum Genere Novo Invento Dissertatio Qua Sententiae Anatomicae Multae, Vel Perperam Receptae Convelluntur, Vel Parum Perceptae Illustrantur*; Apud Jo. Baptistam Bidellium: Milan, Italy, 1627.

- 8.Santambrogio, L. The Lymphatic Fluid. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2018, 337,111-133.
- 9.Natale, G.; Bocci, G.; Ribatti, D. Scholars and scientists in the history of the lymphatic system. *J. Anat.* 2017, 231, 417-429. [CrossRef] [PubMed]
- 10.Irschick, R.; Siemon, C.; Brenner, E. The history of anatomical research of lymphatics—From the ancient times to the end of the European Renaissance. *Ann. Anat.* 2019, 223, 49-69. [CrossRef]
- 11.Nuck, A. *Adenographia Curiosa et Uteri Foeminei Anatomie Nova*; Apud Jord. Luchtmans: Ludgduni, Batavorum, 1696.
- 12.Cruikshank, W.C. *The Anatomy of the Absorbing Vessels of the Human Body*; G. Nicol: London, UK, 1786.
- 13.Mascagni, P. *Vasorum Lymphaticorum Corporis Humani Historia et Ichnographia*; Pazzini Carli: Siena, Italy, 1787.
- 14.Mascagni, P. *Anatomiae Universae Icones*; Presso Nicola Capurro: Pisa, Italy, 1823-1831.
- 15.Sappey, P.C. *Anatomie, Physiologie, Pathologie des Vaisseaux Lymphatiques*; Adrien Delahaye: Paris, France, 1874.
- 16.Suami, H.; Pan, W.R.; Taylor, G.I. Historical review of breast lymphatic studies. *Clin. Anat.* 2009, 22, 531-536. [CrossRef]
- 17.Gerota, D. Zur Technik der Lymphgefassinjektion. Eine neue Injektionsmasse für Lymphgefäße. *Polychrome Injektion. Anat. Anzeiger.* 1896,12, 216-224.
- 18.Poirier, P.; Cuneo, B. Les lymphatiques. In *Traité D'Anatomie Humaine*; Poirier, P., Charpy, A., Eds.; Libraires De L'Academie De Medecine: Paris, France, 1902.
- 19.Bartels, P. Das lymphgefässsystem. In *Handbuch der Anatomie des Menschen*; Bardeleben, K., Ed.; G. Fisher: Jena, Germany, 1909; Volume 4.
- 20.Suami, H.; Taylor, G.I.; Pan, W.R. A new radiographic cadaver injection technique for investigating the lymphatic system. *Plast. Reconstr. Surg.* 2005,115, 2007-2013. [CrossRef]
- 21.Suami, H.; Taylor, G.I.; O'Neill, J.; Pan, W.R. Refinements of the radiographic cadaver injection technique for investigating minute lymphatic vessels. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007,120, 61-67. [CrossRef] [PubMed]
- 22.Suami, H.; Pan, W.R.; Mann, G.B.; Taylor, G.I. The lymphatic anatomy of the breast and its implications for sentinel lymph node biopsy: A human cadaver study. *Ann. Surg. Oncol.* 2008,15, 863-871. [CrossRef] [PubMed]
- 23.Suami, H.; O'Neill, J.K.; Pan, W.R.; Taylor, G.I. Superficial lymphatic system of the upper torso: Preliminary radiographic results in human cadavers. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008,121,1231-1239. [CrossRef]
- 24.Heydon-White, A.; Suami, H.; Boyages, J.; Koelmeyer, L.; Peebles, K.C. Assessing breast lymphoedema following breast cancer treatment using indocyanine green lymphography. *Breast Cancer Res. Treat.* 2020,181, 635-644. [CrossRef] [PubMed]
- 25.Shinaoka, A.; Koshimune, S.; Yamada, K.; Kumagishi, K.; Suami, H.; Kimata, Y.; Ohtsuka, A. A Fresh Cadaver Study on Indocyanine Green Fluorescence Lymphography: A New Whole-Body Imaging Technique for Investigating the Superficial Lymphatics. *Plast. Reconstr. Surg.* 2018,141,1161-1164. [CrossRef] [PubMed]
- 26.Wai, C.J. Axillary anatomy and history. *Curr. Probl. Cancer.* 2012, 36, 234-244. [CrossRef]
- 27.Natale, G.; Bocci, G. Cardiovascular and Central Nervous System Toxicity by Anticancer Drugs in Breast Cancer Patients. In *Brain and Heart Dynamics*; Govoni, S., Politi, P., Vanoli, E., Eds.; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2020; pp. 1-25.
- 28.Louveau, A.; Plog, B.A.; Antila, S.; Alitalo, K.; Nedergaard, M.; Kipnis, J. Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J. Clin. Investig.* 2017,127, 3210-3219. [CrossRef]
- 29.Natale, G.; Limanaqi, F.; Busceti, C.L.; Mastroiacovo, F.; Nicoletti, F.; Puglisi-Allegra, S.; Fornai, F. Glymphatic System as a Gateway to Connect Neurodegeneration from Periphery to CNS. *Front. Neurosci.* 2021,15, 639140. [CrossRef]
- 30.Suami, H.; Scaglioni, M.F. Anatomy of the Lymphatic System and the Lymphosome Concept with Reference to Lymphedema. *Semin. Plast. Surg.* 2018, 32,5-11.
- 31.Gashev, A.A.; Davis, M.J.; Zawieja, D.C. Inhibition of the active lymph pump by flow in rat mesenteric lymphatics and thoracic duct. *J. Physiol.* 2002, 540,1023-1037. [CrossRef]
- 32.Zawieja, D.C. Contractile physiology of lymphatics. *Lymphat. Res. Biol.* 2009, 7, 87-96. [CrossRef]
- 33.Kunert, C.; Baish, J.W.; Liao, S.; Padera, T.P.; Munn, L.L. Mechanobiological oscillators control lymph flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015,112,10938-10943. [CrossRef]
- 34.Scallan, J.P.; Zawieja, S.D.; Castorena-Gonzalez, J.A.; Davis, M.J. Lymphatic pumping: Mechanics, mechanisms and malfunction. *J. Physiol.* 2016, 594, 5749-5768. [CrossRef]
- 35.Zhou, H.; Lei, P.J.; Padera, T.P. Progression of Metastasis through Lymphatic System. *Cells* 2021,10, 627. [CrossRef]
- 36.Alimkhodzhaeva L.T.; Yusupova N.B.; Khodzhaev A.V.; Nigmanova N.A.; Makhmudova N.E.; Zakirova L.T.; Shamansurova N.S.; Kasymov D.A.; Khalimov Zh.Zh. Aspects of diagnosis, treatment and prognosis in metastatic breast cancer. Clinical and experimental oncology. Association of Oncologists of Uzbekistan. 2020,1,17-23. (In Russian)
- 37.Natale, G.; Bocci, G. Tumor Dormancy, Angiogenesis and Metronomic Chemotherapy. In *Tumor Dormancy and Recurrence*; Series: Cancer Drug Discovery and Development; Wang, Y., Crea, F., Eds.; Umana Press: New York, NY, USA, 2017; pp. 31-49.
- 38.Natale, G.; Bocci, G.; Lenzi, P. Looking for the Word "Angiogenesis" in the History of Health Sciences: From Ancient Times to the First Decades of the Twentieth Century. *World. J. Surg.* 2017, 41,1625-1634. [CrossRef] [PubMed]
- 39.Natale, G.; Bocci, G. Does metronomic chemotherapy induce tumor angiogenic dormancy? A

- review of available preclinical and clinical data. *Cancer Lett.* 2018, 432, 28-37. [CrossRef] [PubMed]
- 40.Ullah, I.; Karthik, G.M.; Alkods, A.; Kjallquist, U.; Stalhammar, G.; Lovrot, J.; Martinez, N.F.; Lagergren, J.; Hautaniemi, S.; Hartman, J.; et al. Evolutionary history of metastatic breast cancer reveals minimal seeding from axillary lymph nodes. *J. Clin. Investig.* 2018,128,1355-1370. [CrossRef]
- 41.Ismagilov A.Kh., Asnina N.G., Moshurov I.P., Azarov G.A. Prediction of metastatic lesions of regional lymph nodes in patients with breast cancer. Tumors of the female reproductive system. 2017.13(2), 13-19. (In Russian)
- 42.Lee, E.; Pandey, N.B.; Popel, A.S. Crosstalk between cancer cells and blood endothelial and lymphatic endothelial cells in tumour and organ microenvironment. *Expert Rev. Mol. Med.* 2015,17, e3. [CrossRef]
- 43.Gerull, W.D.; Puri, V.; Kozower, B.D. The epidemiology and biology of pulmonary metastases. *J. Thorac. Dis.* 2021,13, 2585-2589. [CrossRef]
- 44.Castle, J.; Shaker, H.; Morris, K.; Tugwood, J.D.; Kirwan, C.C. The significance of circulating tumour cells in breast cancer: A review. *Breast* 2014, 23, 552-560. [CrossRef] [PubMed]
- 45.Kalinkova, L.; Zmetakova, I.; Smolkova, B.; Minarik, G.; Sedlackova, T.; Horvathova Kajabova, V.; Cierna, Z.; Mego, M.; Fridrichova, I. Decreased methylation in the SNAI2 and ADAM23 genes associated with de-differentiation and haematogenous dissemination in breast cancers. *BMC Cancer* 2018,18, 875. [CrossRef]
- 46.Sharma, U.; Medina-Saenz, K.; Miller, P.C.; Troness, B.; Spartz, A.; Sandoval-Leon, A.; Parke, D.N.; Seagroves, T.N.; Lippman, M.E.; El-Ashry, D. Heterotypic clustering of circulating tumor cells and circulating cancer-associated fibroblasts facilitates breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2021,189, 63-80. [CrossRef] [PubMed]
- 47.Fujita, T.; Miura, H.; Seino, H.; Ono, S.; Nishi, T.; Nishimura, A.; Hakamada, K.; Aoki, M. Anatomical classification of breast sentinel lymph nodes using computed tomography-lymphography. *Anat. Sci. Int.* 2018, 93, 487-494. [CrossRef] [PubMed]
- 48.Zhang, S.; Yi, S.; Zhang, D.; Gong, M.; Cai, Y.; Zou, L. Intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density both correlate with lymph node metastasis in breast cancer. *Sci. Rep.* 2017, 7, 40364. [CrossRef] [PubMed]
- 49.Skobe, M.; Hawighorst, T.; Jackson, D.G.; Prevo, R.; Janes, L.; Velasco, P.; Riccardi, L.; Alitalo, K.; Claffey, K.; Detmar, M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 2001, 7,192-198. [CrossRef]
- 50.Mohammed, R.A.A.; Green, A.; El-Shikh, S.; Paish, E.C.; Ellis, I.O.; Martin, S.G. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br. J. Cancer.* 2007, 96,1092-1100. [CrossRef]
- 51.Gu, Y.; Qi, X.; Guo, S. Lymphangiogenesis induced by VEGF-C and VEGF-D promotes metastasis and a poor outcome in breast carcinoma: A retrospective study of 61 cases. *Clin. Exp. Metastasis* 2008, 25, 717-725. [CrossRef] [PubMed]
- 52.Alimkhodjaeva L. T., Narzieva D. F., Zakirova L. T., Khodjaev A. V., Nigmanova N. A., Norbekova M. Kh., Zakhirova N. N., Yusupova N. B., Mirzaeva N. T. Diagnostic Significance of Molecular Genetic Markers in the Prognosis of the Breast Cancer Clinical Course. *American Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2019, 9(9), 325-328. doi:10.5923/j.ajmms.20190909.03Uren, R.F.; Howman-Giles, R.; Renwick, S.B.; Gillett, D. Lymphatic mapping of the breast: Locating the sentinel lymph nodes. *World J. Surg.* 2001,25, 789-793. [CrossRef] [PubMed]
- 53.Guo, J.; Yang, H.; Wang, S.; Cao, Y.; Liu, M.; Xie, F.; Liu, P.; Zhou, B.; Tong, F.; Cheng, L.; et al. Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green, blue dye, and their combination in breast cancer patients: A prospective cohort study. *World J. Surg. Oncol.* 2017,15,196. [CrossRef] [PubMed]
- 54.Ballardini, B.; Santoro, L.; Sangalli, C.; Gentilini, O.; Renne, G.; Lissidini, G.; Pagani, G.M.; Toesca, A.; Blundo, C.; del Castillo, A.; et al. The indocyanine green method is equivalent to the (9)(9)mTc-labeled radiotracer method for identifying the sentinel node in breast cancer: A concordance and validation study. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2013, 39,1332-1336. [CrossRef] [PubMed]
- 55.Chang, D.W.; Masia, J.; Garza, R., 3rd; Skoracki, R.; Neligan, P.C. Lymphedema: Surgical and Medical Therapy. *Plast. Reconstr. Surg.* 2016,138, 209s-218s. [CrossRef]
- 56.Turner-Warwick, R.T. The lymphatics of the breast. *Br. J. Surg.* 1959, 46, 574-582. [CrossRef]
- 57.Cloquet, J. Manuel D'Anatomie Descriptive du Corps Humain, Representee en Planches Litographiees; Chez Bechet Jeune: Paris, France, 1825.
- 58.The Lymphatic System, Considered in Relation to Its Anatomy, Physiology, and Pathology. *Br. Foreign Med. Rev.* 1837, 4, 325-349.
- 59.Stouthandel, M.E.J.; Veldeman, L.; Van Hoof, T. Call for a Multidisciplinary Effort to Map the Lymphatic System with Advanced Medical Imaging Techniques: A Review of the Literature and Suggestions for Future Anatomical Research. *Anat. Rec.* 2019, 302, 1681-1695. [CrossRef]
- 60.Martinez-Monge, R.; Fernandes, P.S.; Gupta, N.; Gahbauer, R. Cross-sectional nodal atlas: A tool for the definition of clinical target volumes in three-dimensional radiation therapy planning. *Radiology* 1999, 211, 815-828. [CrossRef]
- 61.Madu, C.N.; Quint, D.J.; Normolle, D.P.; Marsh, R.B.; Wang, E.Y.; Pierce, L.J. Definition of the supraclavicular and infraclavicular nodes: Implications for three-dimensional CT-based conformal radiation therapy. *Radiology* 2001, 221, 333-339. [CrossRef]
- 62.Verhoeven, K.; Weltens, C.; Remouchamps, V.; Mahjoubi, K.; Veldeman, L.; Lengele, B.; Hortobagyi, E.; Kirkove, C. Vessel based delineation guidelines for the elective lymph node regions in breast

- cancer radiation therapy—PROcab guidelines. *Radiother. Oncol.* 2015,114,11-16. [CrossRef]
63. Offersen, B.V.; Boersma, L.J.; Kirkove, C.; Hol, S.; Aznar, M.C.; Biete Sola, A.; Kirova, Y.M.; Pignol, J.P.; Remouchamps, V.; Verhoeven, K.; et al. ESTRO consensus guideline on target volume delineation for elective radiation therapy of early-stage breast cancer. *Radiother. Oncol.* 2015,114, 3-10. [CrossRef] [PubMed]
64. Budach, W.; Kammers, K.; Boelke, E.; Matuschek, C. Adjuvant radiotherapy of regional lymph nodes in breast cancer—A meta-analysis of randomized trials. *Radiat. Oncol.* 2013, 8, 267. [CrossRef]
65. Poortmans, P.M.; Weltens, C.; Fortpied, C.; Kirkove, C.; Peignaux-Casasnovas, K.; Budach, V.; van der Leij, F.; Vonk, E.; Weidner, N.; Rivera, S.; et al. Internal mammary and medial supraclavicular lymph node chain irradiation in stage I-III breast cancer (EORTC 22922/10925): 15-year results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020, 21,1602-1610. [CrossRef]
66. Ozcan, L.C.; Giuliano, A.E. Is Axillary Lymph Node Dissection Necessary After a Positive Sentinel Lymph Node Biopsy? *Adv. Surg.* 2017, 51,165-178. [CrossRef]
67. Darby, S.C.; Ewertz, M.; McGale, P.; Bennet, A.M.; Blom-Goldman, U.; Brannum, D.; Correa, C.; Cutter, D.; Gagliardi, G.; Gigante, B.; et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368, 987-998. [CrossRef] [PubMed]
68. Grantzau, T.; Thomsen, M.S.; V*th, M.; Overgaard, J. Risk of second primary lung cancer in women after radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* 2014,111, 366-373. [CrossRef] [PubMed]
69. Pan, W.R. A novel approach to slow down putrefaction of unembalmed cadaveric tissue during lymphatic dissection: A preliminary study. *Lymphat. Res. Biol.* 2009, 7,17-20. [CrossRef]
70. Dobson, J.; Tompsett, D.H. Museum specimens of the main superficial and deep lymphatics of the leg in man. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 1968, 43,111-117. [PubMed]
71. Stouthandel, M.E.J.; Veldeman, L.; Achten, E.; Van Hoof, T. The use of Thiel embalmed human cadavers for retrograde injection and visualization of the lymphatic system. *Anat. Rec.* 2020, 303, 2392-2401. [CrossRef]
72. Augur, A.M.R.; Dalley, A.F.; Grant, J.C.B. *Grant's Atlas of Anatomy*, 11th ed.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2005.
73. Netter, F.H. *Netter's Atlas of Human Anatomy*, 5th ed.; Saunders Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2011.
74. Putz, R.; Pabst, R. *Sobotta Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb, Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb*, 14th ed.; Elsevier GmbH: Munich, Germany, 2009.
75. Standring, S. Cardiovascular topography of lymph nodes and vessels. In *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*; Ellis, H., Ed.; Churchill Livingstone: Edinburgh, UK, 2004.
76. Stouthandel, M.E.J.; Debbaut, C.; Deviche, J.; Truyens, B.; Veldeman, L.; Van Hoof, T. Using the venous angle as a pressure reservoir to retrogradely fill the subclavian lymphatic trunk with contrast agent for lymphatic mapping. *Ann. Anat.* 2020, 232, 151562. [CrossRef] [PubMed]
77. Peeters, G.; Debbaut, C.; Laleman, W.; Monbaliu, D.; Vander Elst, I.; Detrez, J.R.; Vandecasteele, T.; De Schryver, T.; Van Hoorebeke, L.; Favere, K.; et al. A multilevel framework to reconstruct anatomical 3D models of the hepatic vasculature in rat livers. *J. Anat.* 2017, 230, 471-483. [CrossRef] [PubMed]
78. Cornillie, P.; Casteleyn, C.; von Horst, C.; Henry, R. Corrosion casting in anatomy: Visualizing the architecture of hollow structures and surface details. *Anat. Histol. Embryol.* 2019, 48, 591-604. [CrossRef]
79. Thiel, W. The preservation of the whole corpse with natural color. *Ann. Anat.* 1992,174,185-195. [CrossRef]
80. Ruiz-Tovar, J.; Prieto-Nieto, I.; Garda-Olmo, D.; Clasca, F.; Enriquez, P.; Villalonga, R.; Zubiaga, L. Training Courses in Laparoscopic Bariatric Surgery on Cadaver Thiel: Results of a Satisfaction Survey on Students and Professors. *Obes. Surg.* 2019,29,3465-3470. [CrossRef]
81. Charbonney, E.; Delisle, S.; Savary, D.; Bronchti, G.; Rigollot, M.; Drouet, A.; Badat, B.; Ouellet, P.; Gosselin, P.; Mercat, A.; et al. A new physiological model for studying the effect of chest compression and ventilation during cardiopulmonary resuscitation: The Thiel cadaver. *Resuscitation* 2018,125,135-142. [CrossRef] [PubMed]
82. De Crop, A.; Bacher, K.; Van Hoof, T.; Smeets, P.V.; Smet, B.S.; Vergauwen, M.; Kiendys, U.; Duyck, P.; Verstraete, K.; D'Herde, K.; et al. Correlation of contrast-detail analysis and clinical image quality assessment in chest radiography with a human cadaver study. *Radiology* 2012, 262, 298-304. [CrossRef]
83. Beger, O.; Karagul, M.I.; Kog, T.; Kayan, G.; Cengiz, A.; Yilmaz, S.N.; Olgunus, Z.K. Effects of different cadaver preservation methods on muscles and tendons: A morphometric, biomechanical and histological study. *Anat. Sci. Int.* 2020, 95, 174-189. [CrossRef]
84. Stouthandel, M.E.J.; Vanhove, C.; Devriendt, W.; De Bock, S.; Debbaut, C.; Vangestel, C.; Van Hoof, T. Biomechanical comparison of Thiel embalmed and fresh frozen nerve tissue. *Anat. Sci. Int.* 2020, 95, 399-407. [CrossRef]
85. Anderson, S.D. Practical light embalming technique for use in the surgical fresh tissue dissection laboratory. *Clin. Anat.* 2006, 19, 8-11. [CrossRef]
86. Kingston, M.J.; Perriman, D.M.; Neeman, T.; Smith, P.N.; Webb, A.L. Contrast agent comparison for three-dimensional micro-CT angiography: A cadaveric study. *Contrast Media Mol. Imaging* 2016,11, 319-324. [CrossRef]
87. Stouthandel, M.E.J.; Pullens, P.; Bogaert, S.; Schoepen, M.; Vangestel, C.; Achten, E.; Veldeman, L.; Van Hoof, T. The application of frozen Thiel-embalmed specimens for radiotherapy delineation

guideline development: A method to create accurate MRI-enhanced CT datasets. *Strahlenther. Onkol.* 2021. submitted.

88. Alimkhodzhaeva L.T., Zikiryakhodzhaev A.D. Features of cellular, humoral and activation markers of the immune system, as well as biophysical parameters of the surface membranes of peripheral blood lymphocytes in patients with breast cancer. Tumors of the female reproductive system. Limited Liability Company "Publishing House "ABV-press". 2010, 1, 17-23. (In Russian).

89. Cunnick, G.H.; Jiang, W.G.; Douglas-Jones, T.; Watkins, G.; Gomez, K.F.; Morgan, M.J.; Subramanian, A.; Mokbel, K.; Mansel, R.E. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. *Mol. Cancer.* 2008, 7, 23. [CrossRef]

90. Shields, J.D.; Fleury, M.E.; Yong, C.; Tomei, A.A.; Randolph, G.J.; Swartz, M.A. Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell.* 2007, 11, 526-538. [CrossRef]

91. Xu, K.; Zhang, W.; Wang, C.; Hu, L.; Wang, R.; Wang, C.; Tang, L.; Zhou, G.; Zou, B.; Xie, H.; et al. Integrative analyses of scRNA-seq and scATAC-seq reveal CXCL14 as a key regulator of lymph node metastasis in breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2021, 30, 370-380. [CrossRef] [PubMed]

92. Secker, G.A.; Harvey, N.L. Regulation of VEGFR Signalling in Lymphatic Vascular Development and Disease: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7760. [CrossRef]

93. Zhang, Y.; Ulvmar, M.H.; Stanczuk, L.; Martinez-Corral, I.; Frye, M.; Alitalo, K.; Makinen, T. Heterogeneity in VEGFR3 levels drives lymphatic vessel hyperplasia through cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Nat. Commun.* 2018, 9, 1296. [CrossRef] [PubMed]

94. Garda-Caballero, M.; Paupert, J.; Blacher, S.; Van de Velde, M.; Quesada, A.R.; Medina, M.A.; Noel, A. Targeting VEGFR-3/-2 signaling pathways with AD0157: A potential strategy against tumor-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastases. *J. Hematol. Oncol.* 2017, 10, 122. [CrossRef] [PubMed]

95. Kong, L.L.; Yang, N.Z.; Shi, L.H.; Zhao, G.H.; Zhou, W.; Ding, Q.; Wang, M.H.; Zhang, Y.S. The optimum marker for the detection of lymphatic vessels. *Mol. Clin. Oncol.* 2017, 7, 515-520. [CrossRef]

96. Lokmic, Z. Utilizing lymphatic cell markers to visualize human lymphatic abnormalities. *J. Biophotonics* 2018, 11, e201700117. [CrossRef]

97. Kahn, H.J.; Marks, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab. Investig.* 2002, 82, 1255-1257. [CrossRef] [PubMed]

98. Hou, Q.; Chen, S.; An, Q.; Li, B.; Fu, Y.; Luo, Y. Extracellular Hsp90a Promotes Tumor Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7747. [CrossRef] [PubMed]

99. Wang, C.; Xu, S.; Tian, Y.; Ju, A.; Hou, Q.; Liu, J.; Fu, Y.; Luo, Y. Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Promotes Tumor Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Breast Cancer. *Neoplasia* 2019, 21, 413-427. [CrossRef]

100. Kim, M.S.; Lebron, C.; Nagpal, J.K.; Chae, Y.K.; Chang, X.; Huang, Y.; Chuang, T.; Yamashita, K.; Trink, B.; Ratovitski, E.A.; et al. Methylation of the DFNA5 increases risk of lymph node metastasis in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 370, 38-43. [CrossRef]

101. Jung, S.P.; Kim, S.; Nam, S.J.; Kim, I.; Bae, J.W. The role of the CDH1 promoter hypermethylation in the axillary lymph node metastasis and prognosis. *J. Breast Cancer* 2013, 16, 16-22. [CrossRef] [PubMed]

102. Jones, D. Parallels of Resistance between Angiogenesis and Lymphangiogenesis Inhibition in Cancer Therapy. *Cells* 2020, 9, 762. [CrossRef]

103. Qin, T.; Liu, Z.; Wang, J.; Xia, J.; Liu, S.; Jia, Y.; Liu, H.; Li, K. Anlotinib suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in lung adenocarcinoma through a process potentially involving VEGFR-3 signaling. *Cancer Biol. Med.* 2020, 17, 753-767. [CrossRef]

104. Tai, H.C.; Lee, T.H.; Tang, C.H.; Chen, L.P.; Chen, W.C.; Lee, M.S.; Chen, P.C.; Lin, C.Y.; Chi, C.W.; Chen, Y.J.; et al. Phomaketide A Inhibits Lymphangiogenesis in Human Lymphatic Endothelial Cells. *Mar. Drugs* 2019, 17, 215. [CrossRef]

105. Blumgart, E.I.; Uren, R.F.; Nielsen, P.M.; Nash, M.P.; Reynolds, H.M. Predicting lymphatic drainage patterns and primary tumour location in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011, 130, 699-705. [CrossRef]

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 576.32.36:544.277+611.0188

ОЦЕНКА ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛУТАМАТА И NO-ГЕНЕРИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ЗЕРНИСТЫЕ КЛЕТКИ МОЗЖЕЧКА КРЫС

© 2023 г. Реутов¹В.П., Сорокина²Е.Г., Пинелис²В.Г.

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, 117485, г. Москва, ул. Бутлерова, 5а

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2

EVALUATION OF DEATH OF NEURONS UNDER EXPOSURE TO GLUTAMATE AND NO-GENERATING COMPOUNDS ON GRANULAR CELLS OF RAT CEREBELLUM

© 2023 V.P. Reutov¹, E.G. Sorokina², V.G. Pinelis²

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Russia, 117485, Moscow, st. Butlerova, 5a

²National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Lomonosovsky Prospekt 2

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2023.4.107.1834

РЕЗЮМЕ

В работе проведена оценка гибели нейронов при воздействии глутамата и NO-генерирующих соединений на зернистые клетки мозжечка. Эта работа направлена на изучение механизмов перехода от физиологического состояния к состоянию патологическому при воздействии глутамата (Glu) и оксида азота (NO) на нейроны мозжечка крыс линии Wistar. Были использованы методы оптической микроскопии и биохимические методы, позволяющие оценивать выживаемость и гибель нейронов при воздействии различных концентраций NO-генерирующих соединений – нитрита натрия (NaNO₂), нитропруссид натрия (SNP), S-нитрозоцистеина (SNOC) и др. При относительно низких концентрациях нитритов в пределах физиологических значений (10⁻⁵ М) эти вещества обладают защитным действием, если их добавлять к культуре клеток мозжечка до Glu-воздействия. При этом нельзя не вспомнить о том, что нитриты и NO-генерирующие соединения могут участвовать в механизмах защитного действия гипоксического preconditionирования. Кроме того, эти данные хорошо согласуются с обобщением Теофраста Парацельса (1493–1541): «все есть яд, ничто не лишено ядовитости, и все есть лекарство. Лишь доза делает вещество ядом или лекарством».

SUMMARY

In this work, we assessed the death of neurons under the influence of glutamate and NO-generating compounds on granular cells of the cerebellum. This work is aimed at studying the mechanisms of transition from a physiological state to a pathological state under the influence of glutamate (Glu) and nitric oxide (NO) on cerebellar neurons of *Wistar* rats. Optical microscopy and biochemical methods were used to assess the survival and death of neurons when exposed to various concentrations of NO-generating compounds – NaNO₂, sodium nitroprusside (SNP), etc. At relatively low concentrations of nitrites within physiological values (10⁻⁵ M), these substances have a protective effect if they are added to the culture of cerebellar cells before Glu exposure. At the same time, one cannot fail to recall that nitrites and NO-generating compounds can participate in the mechanisms of the protective action of hypoxic preconditioning. In addition, these data are in good agreement with the generalization of Theophrastus Paracelsus (1493–1541): «everything is poison, nothing is without poison, and everything is medicine. Only the dose makes a substance a poison or a medicine».

Ключевые слова: выживаемость и гибель нейронов, глутамат, NO-генерирующие соединения.

Key words: survival and death of neurons, glutamate, NO-generating compounds.

Развитие механизмов высвобождения нейротрансмиттеров является важным звеном в формировании функциональных синаптических связей [1, 2]. Высвобождение синаптических нейротрансмиттеров модулируется оксидом азота (NO), соединением, которое выполняет множество физиологических функций в нервной системе [2]. Многочисленные эксперименты указывают на возможную роль NO в независимом от кальция (Ca²⁺) высвобождении медиатора в популяциях синапсов на всех стадиях созревания

синаптических пузырьков [2]. Нарушение обмена Glu с последующим увеличением его содержания в синаптических щелях является пусковым механизмом развития повреждений нейронов при самых различных неврологических заболеваниях, включая инсульты, эпилепсию, болезни Паркинсона и Альцгеймера, а также травматические повреждения мозга [3–6]. Все неврологические заболевания, как правило, сопровождаются гипоксией / ишемией нервной

ткани, воспалительными процессами, активацией иммунных и аутоиммунных заболеваний [7–11].

Вместе с тем, токсическое воздействие Glu на нервные клетки в настоящее время связывают, прежде всего, с увеличением концентрации ионизированного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в клетках. Ca^{2+} активирует нейрональную NO-синтазу и запускает ряд других Ca^{2+} -зависимых и NO-зависимых процессов [3–9]. Дальнейшее развитие механизмов повреждения нейронов связано с цитоплазматическими, мембранными и митохондриальными биохимическими нарушениями, приводящими в конечном итоге к образованию замкнутых патологических связей – новой стимуляции высвобождения Glu из пресинаптических пузырьков [1], длительной гиперстимуляции Glu-рецепторов, повреждению нейронов и их гибели [2–4, 10, 11]. Задачей настоящей работы является оценка гибели нейронов при воздействии Glu и NO-генерирующих соединений на зернистые клетки мозжечка. Эта работа направлена на изучение некоторых свободно радикальных механизмов физиологического и токсического воздействия Glu и NO-генерирующих соединений на нейроны мозжечка крыс линии Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приготовление первичной культуры гранулярных клеток мозжечка

Приготовление культуры нейронов мозжечка осуществляли согласно руководству [12]. У 6-8 дневных крыс линии *Wistar* извлекали мозжечки и помещали их в раствор Хэнкса (HBSS, Gibco), не содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} . Извлечение мозжечков проводили в соответствии с этическими требованиями по работе с животными (анестезия холодным способом). Для приготовления суспензии клеток использовали раствор 0,5% trypsin и 0,2% EDTA (Gibco), после чего клетки ресуспендировали в культуральной среде DMEM (Gibco), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (FCS, Boehringer), 0,2 ед/мл инсулина (инсулрап, SSP 40 ед/мл, Югославия), 2 мМ L-глутамин, 0,6% глюкозу, 2 г/л $NaHCO_3$, 10 мМ HEPES (Flow Lab). Клетки в количестве $6-8 \times 10^5$ наносили на покровные стекла 22×22 мм или ячейки 24-луночного плейта, предварительно покрытые Poly-L-Lysine, (M.W. 63500, Sigma). Клетки культивировали при высоком содержании KCl (25 мМ), который добавляли на 2-3 день после посева. Для подавления роста глиальных клеток использовали 5×10^{-6} М cytosine- β -D-arabinofuranoside (Sigma), добавление которого осуществляли вместе с KCl. Основную часть экспериментов проводили на 7-8 дневных клетках в культуре. Часть исследований по изучению восстановления АТФ проводили на 14–15 дневных нейронах. В экспериментах, длящихся 24 часа, после отмывки от раствора Glu клетки в культуре помещали в специальную среду (NBM), обогащенную трофическими факторами.

Определение выживаемости и гибели клеток в культуре мозжечка

Количество погибших нейронов в культуре определяли 2-мя методами: прямым подсчетом нейронов, окрашенных трипановой синью (Trypan blue) и спектрофотометрическим методом с тетразолиевым красителем МТТ (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) [12].

Микроскопический метод. Перед подсчетом клеток к 1.0 мл культуральной среды добавляли 30 мкл 0,4% Trypan blue и помещали чашки с культуральными зернистыми клетками мозжечка на 5 мин в инкубатор при 37° С. Подсчет окрашенных (погибших) и неокрашенных (живых) нейронов осуществляли, используя инвертированный микроскоп (Labovert, Germany) (объектив 40 ×). Подсчет живых и мертвых клеток осуществляли не менее чем в 6–10 полях зрения. В ходе подсчета следили за тем, чтобы продолжительность подсчета не превышала 15 мин от общего времени измерений.

Условия проведения экспериментов и реактивы, используемые для изучения действия токсических доз глутамата и NO-генерирующих соединений в культуре клеток мозжечка

Клеточные культуры отмывали от среды, содержащей сыворотку, 2 раза 1мл контрольным солевым раствором следующего состава (мМ): 145 NaCl, 5.6 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2$, 5.0 глюкоза, 10 HEPES, pH=7,4. Воздействие 100 мкМ Glu осуществляли в растворе, содержащем 10 мкМ глицина, в отсутствие ионов Mg^{2+} . Для изучения воздействия Glu-индуцированного эндогенного NO использовали ингибитор NO-синтазы 100 мкМ L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester), а для воздействия экзогенного NO-генерирующего соединения (10 – 1000 мкМ) использовали концентрации различных NO-генерирующих веществ – нитрита натрия ($NaNO_2$), нитропрусида натрия (SNP), динитрозильных комплексов железа (DNIC), нитрозоглутатиона (NG), нитрозоцистеина (SNOC). SNOC был синтезирован нами из $NaNO_2$ и цистеина при подкислении pH, согласно методу, описанному в работе [13, 14]. Блокаду IV участка дыхательной цепи проводили с помощью 3 мМ NaCN. Все использованные реактивы были получены от фирм Sigma, Serva, Merck, Molecular Probes, LabSystems, Boehringer, Calbiochem.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ PRIZMA и Microsoft Excel.

Результаты экспериментов

Оценка гибели нейронов при воздействии Glu и NO-генерирующих соединений. Для того чтобы оценить роль активных форм азота в гибели нейронов в присутствии и в отсутствие Glu были проведены эксперименты по инкубации

культивируемых нейронов со 100 мкМ раствором Glu и 100 мкМ NO-генерирующих веществ. Сразу после 15 мин воздействия Glu на нейроны не было выявлено погибших нейронов в культуре. Однако уже через 4 часа после Glu-воздействия отмечали достоверную гибель зернистых клеток мозжечка. Использование метода оценки выживаемости нейронов по проникновению Тгуран blue в клетки свидетельствовало о некротических изменениях в нейронах после воздействия Glu, когда

повреждается мембрана клеток и происходит их окрашивание в результате локальных повреждений мембраны. Аналогичные данные об участии Glu в развитии раннего некроза были получены в работе [15]. Введение ингибитора NO-синтазы L-NAME в Glu-содержащий раствор достоверно уменьшало гибель нейронов через 4 часа после токсического воздействия с $24.6 \pm 1.0\%$ до $10.8 \pm 1.0\%$ ($p < 0,001$ по сравнению с Glu) (рис. 1).

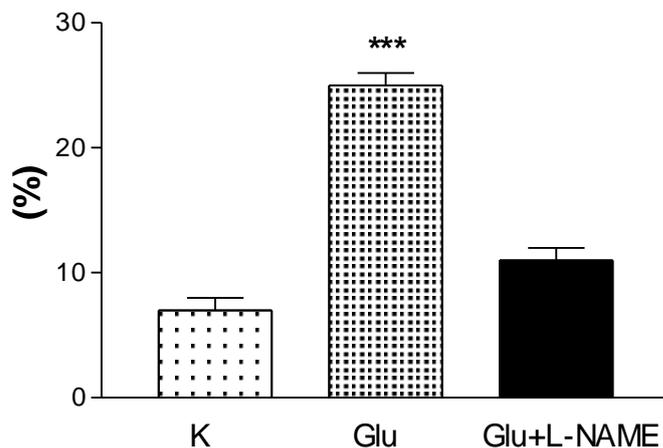


Рис. 1. Влияние Glu-индуцированного синтеза NO на гибель нейронов в культуре зернистых клеток мозжечка

По оси ординат: % мертвых нейронов. Подсчет мертвых нейронов по проникновению Тгуран blue через 4 часа после 15 мин действия 100 мкМ Glu и 100 мкМ L-NAME (каждый столбец представлен в $M \pm m$ от 4-х опытов, 8–12 сестринских культур, 48–72 полей зрения); ***- $p < 0,001$ с контролем (K).

Таким образом, нами было показано, что во время гиперстимуляции Glu-рецепторов токсическими дозами Glu (100 мкМ), кроме нарушения гомеостаза ионов Ca^{2+} и Na^+ , доминирующую роль в повреждении нейронов в мозжечке играют NO и продукты его превращения.

Говоря о токсическом воздействии NO и продуктов его превращения, мы, прежде всего, имеем в виду такие токсичные продукты его метаболизма, как двуокись азота ($*NO_2$) и короткоживущий гидроксильный радикал ($*OH$ -радикал).

Сравнение воздействия Glu с действием различных экзогенных NO-генерирующих веществ выявило следующие закономерности. Установлено, что $NaNO_2$ и SNP вызывают зависимую от концентраций NO-генерирующих веществ раннюю некротическую гибель нейронов (рис.2; 3).

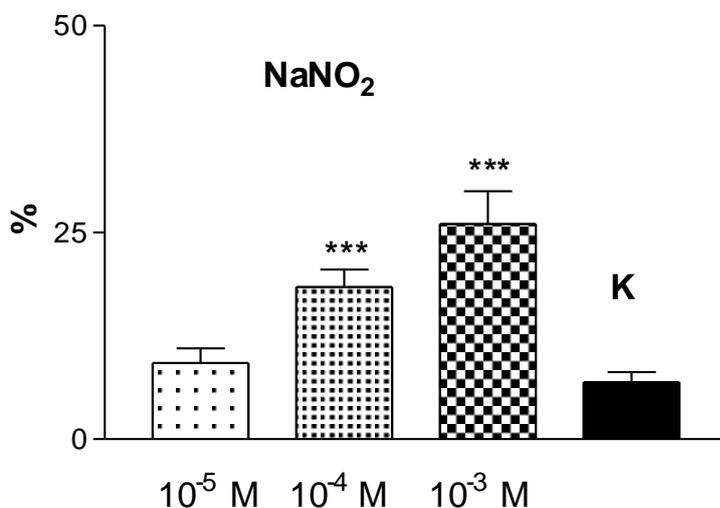


Рис. 2. Действие различных концентраций NO-генерирующего вещества $NaNO_2$ на гибель нейронов

Подсчет мертвых нейронов по проникновению Тгуран blue через 4 часа после 30 мин действия 10, 100, 1000 мкМ NaNO₂ (рис.2) и SNP (рис.3). По оси ординат: % мертвых нейронов; *** - $p < 0.001$ с контролем (К). Каждый столбец представляет

средние значения в $M \pm m$, полученные в 3-х отдельных экспериментах при подсчете клеток в 2-3 сестринских культурах ($n=6-9$ полей зрения). Общее число полей зрения от 36 до 54.

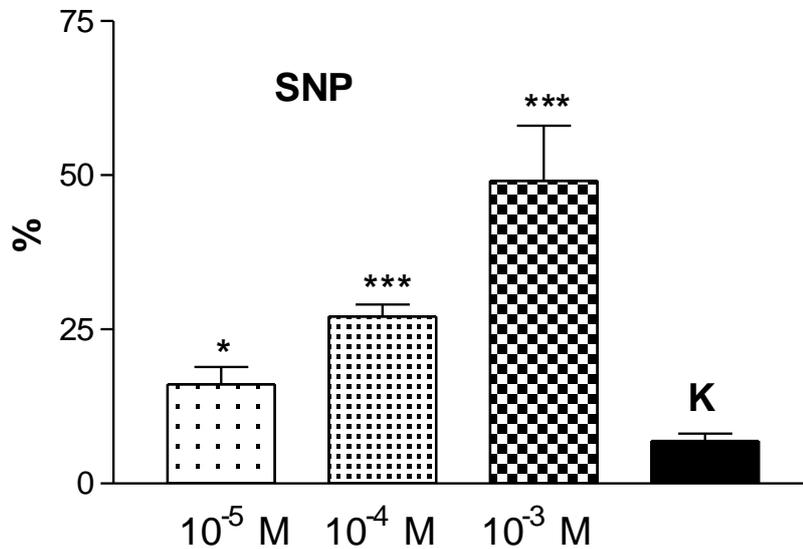


Рис. 3. Действие различных концентраций NO-генерирующего вещества нитропрусида Na (SNP) на гибель нейронов

Подсчет мертвых нейронов по проникновению Тгуран blue через 4 часа после 30 мин воздействия 10, 100, 1000 мкМ SNP (рис.3). По оси ординат: % мертвых нейронов; *** - $p < 0.001$ с контролем (К). Каждый столбец представляет средние значения в $M \pm m$, полученные в 3-х отдельных экспериментах при подсчете клеток в 2-3 сестринских культурах ($n=6-9$ полей зрения). Общее число полей зрения от 36 до 54. Количество погибших через 4 часа нейронов после 15 мин действия 100 мкМ Glu было

сопоставимо с гибелью, вызываемой 30 мин воздействием 100 мкМ NaNO₂ или SNP. Использование других синтетических веществ, образующих NO (нитрозоглутатиона – NG; динитрозильных комплексов железа – DNIC; нитрозоцистеина – SNOС) выявило, что действие большинства из них в течение 30 мин, в концентрации 100 мкМ через 4 часа вызывают аналогичную NaNO₂ и SNP некротическую гибель нейронов (рис.4).

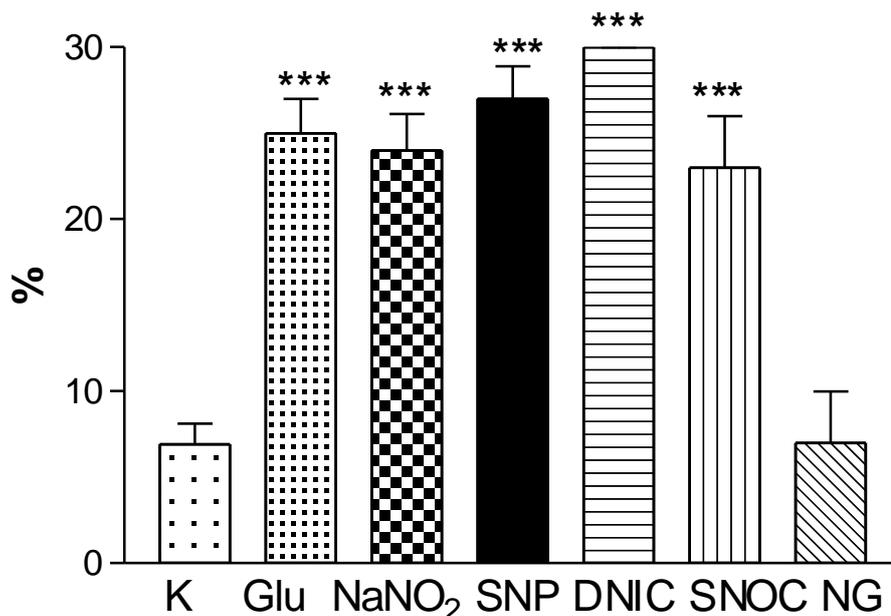


Рис. 4. Сравнительная оценка влияния Glu и NO-генерирующих соединений на раннюю некротическую гибель нейронов в культуре зернистых клеток мозжечка

Подсчет мертвых нейронов по проникновению Трупан blue через 4 часа после 15 мин воздействия 100 мкМ Glu и 30 мин воздействия 100 мкМ NO-генерирующих соединений. По оси ординат: % мертвых нейронов; *** – $p < 0.001$ с контролем (К). Каждый столбец представляет средние значения в $M \pm m$, полученные в 2-х отдельных экспериментах при подсчете клеток в 3-х сестринских культурах в 6–10 полях зрения. Через 4 часа после 30 мин воздействия 100 мкМ NaNO₂, 100 мкМ SNP, 100 мкМ DNIC и 100 мкМ SNOС количество погибших нейронов в культуре было приблизительно одинаковым (20–25%) и соответствовало гибели, вызываемой 15 мин воздействием 100 мкМ Glu. Несколько больший процент погибших нейронов обнаруживали после воздействия 100 мкМ DNIC ($34 \pm 5\%$). Нитрозоглутатион не вызывал отличной от контрольных величин гибели в культуре клеток, что скорее всего было связано с защитным действием глутатиона, ранее обнаруженным в работах [16]. Увеличение концентрации SNOС до 1000 мкМ приводило к значительно более выраженной гибели нейронов ($60 \pm 10\%$) по сравнению с воздействием таких же концентраций NaNO₂ ($27 \pm 4\%$) и SNP ($49 \pm 8\%$). Способность нитрозоцистеина в дозе 1000 мкМ быстро высвобождать большое количество NO дает возможность использовать данный донор NO в тех токсических моделях, где необходимо оценить влияние воздействия NO₂ во время гипоксии. В дальнейших наших исследованиях было показано, что NaNO₂ – медленно превращающийся в NO, в концентрации 100 мкМ вызывал такую же гибель нейронов в культуре, как 100 мкМ Glu. Таким

образом, эти цитохимические эксперименты вместе с другими морфологическими исследованиями показали, что NaNO₂ можно рассматривать как наиболее физиологичный донор NO. Именно NaNO₂, восстанавливающийся в ходе нитритредуктазных реакций в NO, является наиболее подходящим соединением, с помощью которого можно изучать как токсическое действие NO, так и участие NO в защитных механизмах во время воздействия токсических концентраций Glu (100 мкМ).

Следует отметить, что воздействие NO, образуемого из наиболее физиологического донора NaNO₂, не однозначно. Оно зависит от концентрации NO-генерирующего соединения и конкретных условий проведения эксперимента. Так, введение в инкубационный раствор NaNO₂ в малой концентрации ($10^{-5}M$) за 15 мин **до добавления Glu**, оказывало существенную защиту нейронов от развития некротических повреждений в последующие 4 часа (**рис. 5 (4)**). Однако добавление NO-генерирующего соединения **после воздействия Glu** практически не влияло на гибель нейронов (**рис. 5 (5)**). Ионы NO₂⁻ являются акцепторами электронов, которые в условиях функциональной гипоксии, вызванной воздействием Glu, способны обеспечивать транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий, как это происходит в митохондриях растений и микроорганизмов, и, тем самым, снижать негативные последствия гипоксии. О роли нитритов в механизмах защитного действия гипоксического прекондиционирования ранее писали в работах [17].

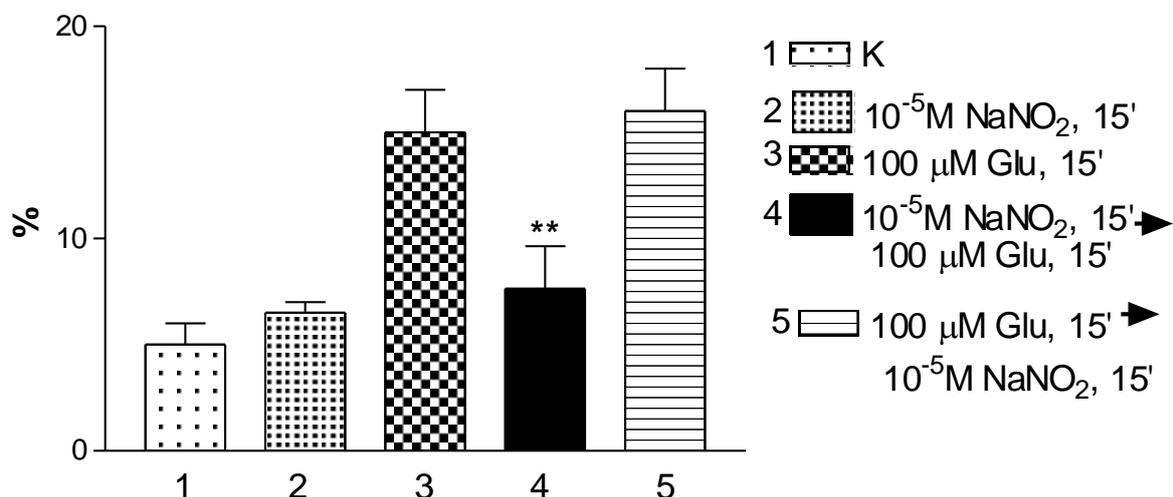


Рис. 5. Влияние малых концентраций NaNO₂ ($10^{-5} M$) до и после воздействия токсических концентраций Glu

Подсчет мертвых нейронов по проникновению Трупан blue через 4 часа после 15 мин воздействия 10 мкМ NaNO₂ и 100 мкМ Glu. По оси ординат: % мертвых нейронов. Каждый столбец представляет

средние значения в $M \pm m$, полученные в 2-х отдельных экспериментах при подсчете клеток в 3-х сестринских культурах в 6–10 полях зрения. ** – $p < 0.01$ между столбцами 3 и 4.

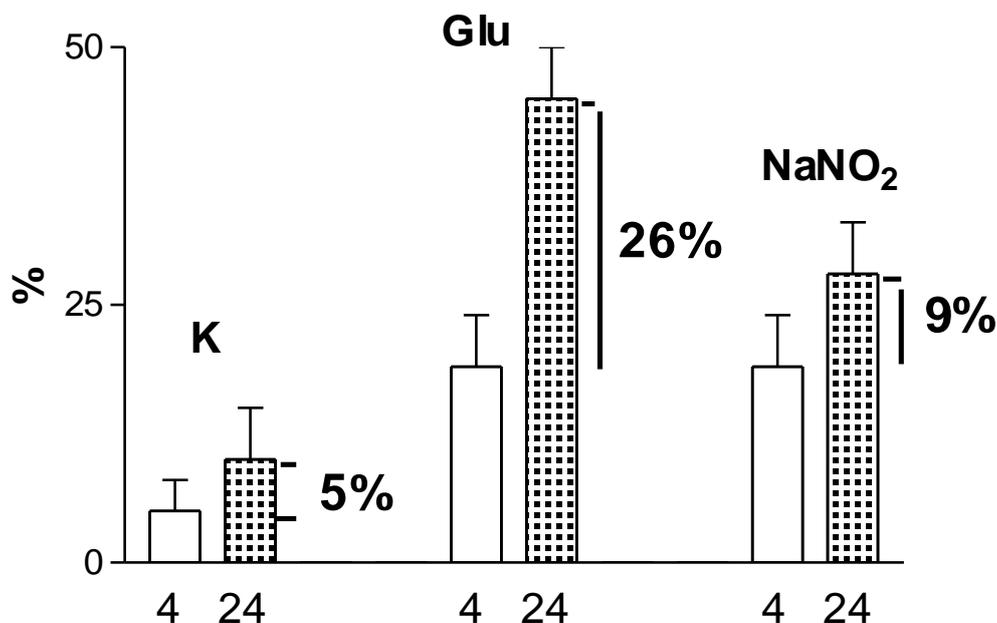


Рис. 6. Динамика гибели нейронов от некроза после действия Glu и NaNO₂

Подсчет мертвых нейронов по проникновению Трупан blue через 4 и 24 часа после действия 100 мкМ Glu и NaNO₂. По оси ординат: % мертвых нейронов; по оси абсцисс: время после действия в часах. Каждый столбец представляет средние значения в $M \pm m$, полученные в 2-х отдельных экспериментах при подсчете клеток в 4-х сестринских культурах в 6-10 полях зрения.

В других исследованиях было показано, что воздействие эндогенного синтеза NO, которое можно частично заингибировать воздействием ингибитора NO-синтазы L-NAME, вполне компенсируется действием экзогенного NO, образующегося при восстановлении ионов NO₂⁻ (рис. 7).

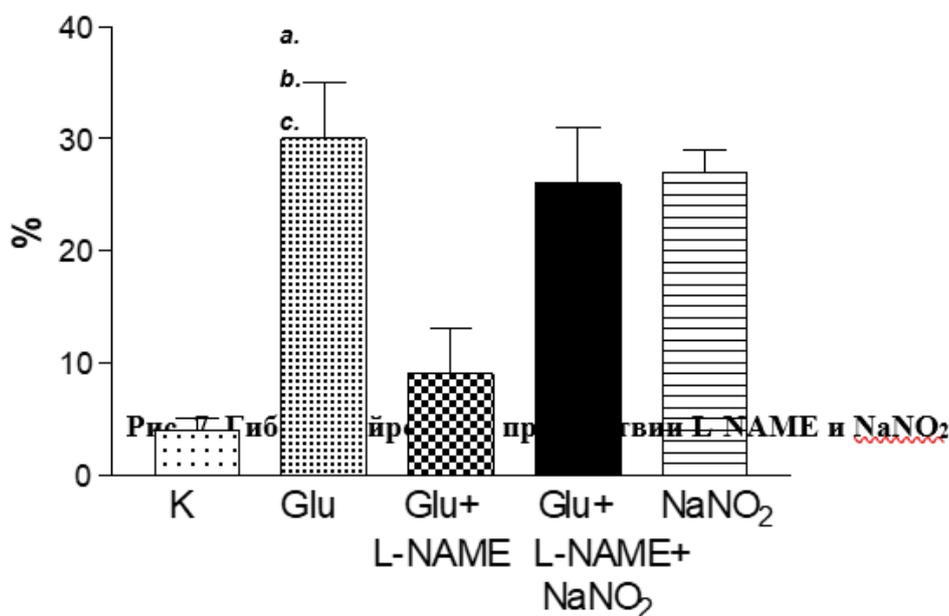


Рис. 7. Гибель нейронов в присутствии L-NAME и NaNO₂

Исследование гибели нейронов через 4 часа после 30 мин воздействия 100 мкМ Glu, 100 мкМ L-NAME и 100 мкМ NaNO₂. (Метод Трупан blue). Результаты в $M \pm m$ от 2-х опытов, количество культур в каждом опыте – 2 – 4. *** – $p < 0,001$ с контролем (K).

Результаты проведенных исследований по возможной защитной роли ионов NO₂⁻ были подтверждены в других исследованиях, в которых было показано, что 30 мин инкубация клеток с NaNO₂ на фоне блокирования электронно-транспортной цепи NaCN повышала выживаемость нейронов в культуре. Так, если 30 мин воздействие

NaNO₂ приводило к гибели 30 ± 6 % нейронов, а 30 мин действие NaCN – к гибели 39 ± 4% нейронов, то на фоне совместного/сочетанного воздействия NaNO₂ и NaCN погибало лишь 18±4% нейронов.

Этот защитный эффект был достоверным как по отношению к действию NaNO₂, так и NaCN (p<0,05 с NaNO₂ и p<0,01 с NaCN) (рис. 8, 9). Эти исследования хорошо согласуются с антидотным действием нитритов при цианидной интоксикации.

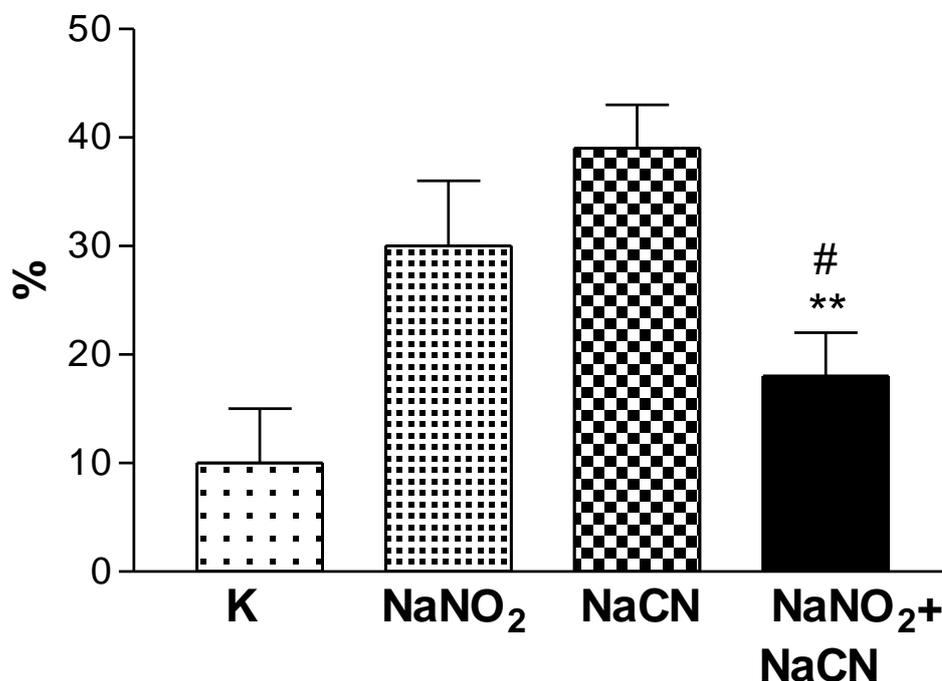


Рис. 8. Гибель нейронов после действия NaNO₂ и NaCN

Подсчет мертвых нейронов по проникновению Trypan blue через 24 часа после 30 мин воздействия 100 мкМ NaNO₂ и 3 мМ NaCN. По оси ординат: % мертвых нейронов; **–p<0.01 с NaCN, #–p<0.05 с NaNO₂. Каждый столбец представляет средние

значения в M±m, полученные в 3-х отдельных экспериментах при подсчете клеток в 4-х сестринских культурах в 6-10 полях зрения.

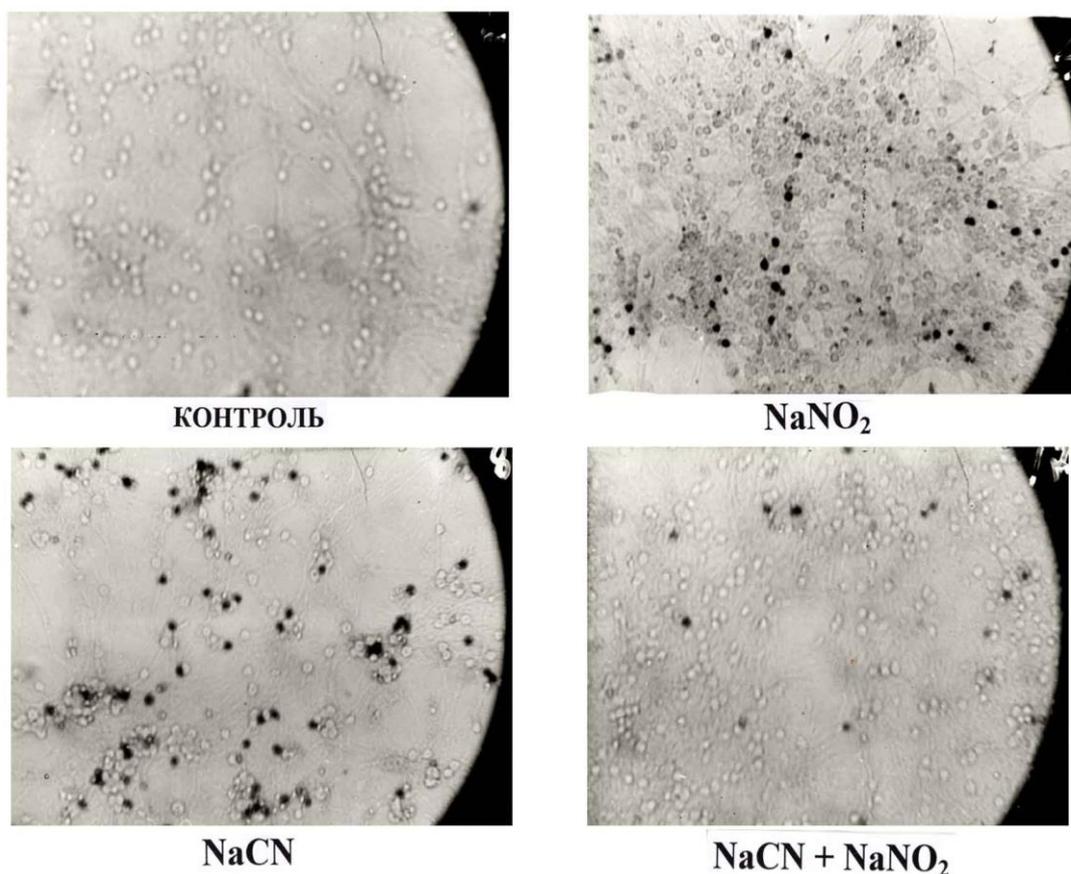


Рис. 9. Гибель нейронов (окраска Трюпан blue) после действия NaNO_2 и NaCN :
 Окраску нейронов Трюпан blue осуществляли через 24 часа после 30 мин воздействия
 100 мкМ NaNO_2 и 3 мМ NaCN .

Обсуждение

Анализируя токсическое воздействие Glu и NO-генерирующих соединений, можно отметить, что эти вещества в зависимости от концентрации и длительности воздействия на клетки способны вызывать их гибель в пределах от 5–10% до 30–40% нейронов от общего их количества в культуре (рис. 1–8). Обращает внимание на себя факт отсутствия линейной зависимости гибели нейронов от концентрации NO-генерирующих соединений (рис. 2, 3). Это свидетельствует об устойчивости регуляторных механизмов, обеспечивающих выживание значительной части клеток (60 и более %). В этом отношении нельзя не вспомнить вывод Р. Вирхова (1821–1902) о том, что «не жизнь в ненормальных условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата».

Интересно при этом отметить, что при относительно низких концентрациях нитритов в пределах физиологических значений (10^{-5} М) эти вещества обладают защитным действием, если их добавлять к культуре клеток до Glu-воздействия (рис. 5). При этом нельзя не вспомнить о том, что нитриты могут участвовать в механизмах защитного действия гипоксического preconditionирования [17]. Кроме того, эти данные хорошо согласуются с обобщением Теофраста Парацельса (1493–1541), одного из основоположников медицинской химии, который в

свое время отметил «все есть яд, ничто не лишено ядовитости, и все есть лекарство. Лишь доза делает вещество ядом или лекарством».

Известно, что все используемые модели не могут полностью отразить характеристики оригинала. Они только отражают часть его свойств. Это обусловлено тем обстоятельством, что в противном случае модель была бы чрезмерно сложной и громоздкой для исследования. Культура зернистых клеток мозжечка не является исключением. С ее помощью можно моделировать события, происходящие при инсультах. Однако ее можно также использовать для того, чтобы оценить воздействие азотных удобрений на население страны. Данные, полученные на культуре зернистых клеток мозжечка, также хорошо согласуются с теми наблюдениями, которые были зафиксированы в СССР в период 1962–1980 гг. после действия программы химизации сельского хозяйства, запущенной Н.С. Хрущевым. В те годы было отмечено 18-летнее снижение средней продолжительности жизни населения СССР [18]. Вместе с тем, сокращение количества азотных удобрений, добавляемых в почву, привело к росту, как средней продолжительности жизни, так и населения, которое за период 1980–1990 гг., увеличилось на 24.1 млн. чел [18]. Если у кого-то отмечено 18-летнее снижение продолжительности жизни (1962 – 1980) и повышение продолжительности жизни в период

1980–1990 гг вызывает сомнение, необходимо вспомнить свойства радикалов $\cdot\text{NO}/\cdot\text{NO}_2$ и $\cdot\text{O}_2^-$. Именно эти радикалы принимают участие в процессах горения и взрывах.

Для того чтобы увеличить скорость автомобиля во время гонок Формулы-1, конструкторы помещают в конструкцию автомобиля баллончик с диоксидом азота ($\cdot\text{NO}_2$). Это необходимо, чтобы пилоты Формулы-1 могли использовать этот газ в качестве катализатора сжигания топлива. Этот газ действительно увеличивает скорость сжигания топлива вместе повреждением компонентов двигателя автомобиля. Азотные удобрения, поступающие в почву в избыточном количестве, затем поступают в организм человека и животных. В процессе превращения азотсодержащие вещества повышают эндогенный синтез $\cdot\text{NO}/\cdot\text{NO}_2$, которые оказывают разрушающее воздействие не только на компоненты двигателя, но и практически на все компоненты клеток, субклеточных структур, тканей. $\cdot\text{NO}_2$ не только был основным катализатором сжигания топлива в гоночных автомобилях, главным компонентом ракетного топлива в XX в. До сих пор он остается основным компонентом взрывчатых веществ. Как же такие реакционно-способные вещества, как $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$ -радикалы, принимающие участие во взрывах и в горении топлива, сосуществуют с живым организмом и в живом организме?

Анализ данных литературы о химических реакциях взаимодействия $\cdot\text{NO}$ с O_2 и $\cdot\text{O}_2^-$ позволил нам сделать следующие выводы. 1. Скорость реакции убывания NO при взаимодействии с O_2 относительно невелика и соответствует скорости реакции первого порядка ($k = 0.124 \text{ лжмоль}^{-1}\text{с}^{-1}$) [19]. 2. С гемсодержащими белками $\cdot\text{NO}$ может взаимодействовать, образуя нитрозильный комплекс с Fe^{2+} в активном центре. Константа скорости взаимодействия, как правило, варьирует в пределах $10^3\text{--}10^7 \text{ лжмоль}^{-1}\text{с}^{-1}$ в зависимости от состояния железа (Fe^{2+} или Fe^{3+}) и окружения гема [19]. 3. Одновременное повышение содержания активных форм азота ($\cdot\text{NO}$ и продуктов его превращения - $\cdot\text{NO}_2$) и кислорода ($\cdot\text{O}_2^-$) приводит к тому, что они начинают взаимодействовать друг с другом в общих местах их образования со скоростью в 100000 раз выше, чем с известными природными антиоксидантами, входящими в состав живых организмов. Скорость реакции NO с $\cdot\text{O}_2^-$ настолько высокая, что она ограничена только скоростью диффузии молекул друг к другу [19].

Константы скоростей реакций взаимодействия NO и $\cdot\text{O}_2^-$ (6.7 ± 0.9) $10^9 \text{ лжмоль}^{-1}\text{с}^{-1}$, что в 10^5 (или в 100000) раз выше, чем с известными природными фенольными антиоксидантами. Согласно последним данным константы скорости взаимодействия 19 фенольных природных антиоксидантов в реакциях с супероксидным анион-радикалом оказались сопоставимыми. Они находятся в интервале $(6.8\text{--}11.0)10^4 \text{ лжмоль}^{-1}\text{с}^{-1}$,

что можно связать с небольшим влиянием структурных особенностей, в частности, с числом и положением гидроксильных групп, а также стерическими эффектами заместителей [19]. Поэтому при одновременном появлении достаточного количества для непосредственного взаимодействия NO и $\cdot\text{O}_2^-$ практически все антиоксидантные системы живых организмов оказываются выключенными, а NO и $\cdot\text{O}_2^-$ начинают активно продуцировать $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$ -радикалы и анионы пероксинитритов, которые после протонирования вновь превращаются в $\cdot\text{NO}_2$ и $\cdot\text{OH}$ -радикалы. Эти соединения могут участвовать в цепных свободно радикальных процессах и способны повреждать практически все компоненты клеток. Именно поэтому все патологические процессы, развивающиеся при гипоксии/ишемии, воспалительных процессах и развитии иммунных и аутоиммунных заболеваний, связанные с образованием NO , $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{NO}_2$ и $\cdot\text{OH}$ -радикалов, оказались зависимыми от циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. Эта способность указанных циклов, содержащих систему гемсодержащих белков и антиоксидантных систем (ферментативных и неферментативных), обусловлена связыванием или переводом NO , $\cdot\text{O}_2^-$ в менее активное состояние [20].

Литература

1. Sporns O, Jenkinson S. Potassium ion- and nitric oxide-induced exocytosis from populations of hippocampal synapses during synaptic maturation in vitro. *Neuroscience*. 1997 Oct;80(4):1057-73. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00152-8. PMID: 9284060.
2. Meffert MK, Premack BA, Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release. *Neuron*. 1994 Jun;12(6):1235-44. doi: 10.1016/0896-6273(94)90440-5. PMID: 7912090.
3. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Ходоров Б.И., Пинелис В.Г. Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутаматиндуцированной дисрегуляции кальциевого гомеостаза // *Биохимия*. 2014. Т.79. №2. С.196-208.
4. Сурин А.М. Молекулярно-клеточные механизмы и клинические аспекты повреждения нейронов при нарушении мозгового кровообращения (экспериментальные и клинические исследования // В кн.: «Нейробиологические основы возникновения и восстановительного лечения перинатального поражения центральной нервной системы у детей». М.: ПедиатрЪ. 2016. С. 9–76.
5. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+} -дисрегуляции и последующей гибелью нейронов // *Патогенез*. 2014. Т.12. №4. С.40–46.
6. Ходоров Б.И., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Сорокина Е.Г., Юравичус А.И., Юородин А.В., Винская Н.П., Хаспекоев Л.Г., Пинелис В.Г. Митохондриальная деполяризация играет

доминирующую роль в механизме нарушения кальциевого гомеостаза, вызванного глутаматом // Биологические мембраны. 2001. Т.18. С.421.

7. Самосудова Н.В., Реутов В.П. Пластические перестройки ультраструктуры мозжечка при токсическом воздействии глутамата и NO-генерирующего соединения // Морфология. 2015. Т.148. №5. С. 32-37.

8. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Крушинский А.Л. Влияние двигательной активности на ультраструктуру нейронов мозжечка, неврологические нарушения и выживаемость крыс линии Крушинского—Молодкиной при развитии у них геморрагического инсульта // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2012. Т. 153. № 6. С. 806–811.

9. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Оксид азота как модулятор контрастности основных элементов цитоскелета // Цитология. 2000. Т. 42. № 1. С. 72–78.

10. Башкатова В.Г., Раевский К.С. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата. Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 1020-1028.

11. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. // TINS. 1991. V. 14. No. 2. P. 60-67.

12. Викторов И.В., Хаспеков Л.Г., Шашкова Н.А. Культивирование тканей и клеток центральной нервной системы // В кн.: «Руководство по культивированию нервной ткани: методы, техника, проблемы» (под ред. Вепринцева Б.Н., Викторова И.В., Вильнера Б.Я.). М. Наука. 1988. С.141–166.

13. Brorson J.R., Sulit R.A., Zhang H. Nitric oxide disrupts Ca^{2+} homeostasis in hippocampal neurons. J. Neurochem. 1997. V. 68. P. 95–105.

14. Brorson J.R., Zhang H. Disrupted $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis contributes to the toxicity of nitric oxide in cultured hippocampal neurones. J. Neurochem. 1997. V. 69. P. 1882–1889.

15. Almeida A., Bolanos J.P. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. J. of Neurochem. 2001. V. 77. P. 676–690.

16. Dringen R., Kussmaul L., Hamprecht B. Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay.// Brain Res. Protocols. 1998. V. 2. P. 223–228.

17. Totzeck M, Hendgen-Cotta U, Rassaf T. Concepts of hypoxic NO signaling in remote ischemic preconditioning. World J Cardiol. 2015 Oct 26;7(10):645-51. doi: 10.4330/wjc.v7.i10.645. PMID: 26516418; PMCID: PMC4620075.

18. Reutov, V.P.; Samosudova, N.V.; Sorokina, E.G. A model of glutamate neurotoxicity and mechanisms of the development of the typical pathological process. *Biophysics*, 2019. 64 (2). 233-250.

19. Реутов В.П., Давыдова Л.А., Сорокина Е.Г. Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и в других областях, отраслях и разделах медицины // Биофизика. 2022. Т.67. №5. С.1009–1029.

20. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих. Успехи биологической химии. 1995. Т.35. С.189–228.

ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ

УДК 636.4+636.082.262.

ЗООГИГИЕНИЧЕСКИЕ НОРМЫ ПИТАНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ ТЕЛЯТ

Веревкина Марина Николаевна,

к.биол.н., доцент

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

ZOOHYGIENIC NORMS OF NUTRITION AND MAINTENANCE OF CALVES

Verevkina Marina Nikolaevna

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2023.4.107.1835

АННОТАЦИЯ

Статья посвящена исследованию норм питания с первых дней жизни до перевода в общее стадо телят, различным способам их содержания. Авторами рассматриваются вопросы особенностей пищеварения новорожденных телят, переходу с молозива на молоко и комбикорм.

ABSTRACT

The article is devoted to the study of nutrition standards from the first days of life to the transfer to the general herd of calves, various ways of their maintenance. The authors consider the issues of the peculiarities of the digestion of newborn calves, the transition from colostrum to milk and compound feed.

Ключевые слова: телята, молозиво, индивидуальные домики, профилактика, зооигиенические нормы.

Keywords: calves, colostrum, individual houses, prevention, zoohygienic norms.

Особенности питания телят начинаются с того, что они рождаются с недостаточно развитыми органами пищеварения, поэтому в первые 6 часов они питаются молозивом, далее молоком до перевода в индивидуальные домики где дают сочные корма(силос), богатые бактериями. В период питания молозивом и молоком хорошо работает только истинный желудок – сычуг [1]. Для развития преджелудков делают сначала подкормку грубого корма(душистого сена) с 7-10 дневного возраста. В этом возрасте жизненно важно, чтобы телёнок получал достаточное количество молока от матери или заменителя молока, так как это обеспечивает правильное развитие его организма. Жвачка формируется к 2-3 месячному возрасту, и в этот период можно начинать постепенно вводить грубый корм.

При раннем приучении к грубому корму следует учитывать особенности пищеварительной системы теленка и давать ему легкоусвояемые продукты, например, дробленое сено, крупы и зерно. Важно также контролировать количество корма, чтобы избежать переедания, что может привести к заболеваниям. Кроме того, хорошо организованное раннее приучение к грубому корму может снизить затраты на кормление животных и повысить их производительность, что является особенно важным для сельскохозяйственных предприятий. С 6-ти месячного возраста телята переходят на индивидуальный план питания в зависимости от направления продуктивности (рис.1).

04.22		03.10.2022 Дата создания		7 Версия	Мархель Н.А. Автор		EKONIVA ЭКОНИВА	
ЭНА Север				ВСЕ				
Предназначен								
Схема выпойки и кормления телят								
Исполнитель:		Оператор МКРС						
Цель:		Единая схема выпойки и кормления телят, обеспечивающая правильное развитие животного				Контролирующий: Зоотехник МКРС		
Когда выполняется:		Ежедневно						
Возраст телят	Выпойка				Кормление			Приготовление молока с бустермилк
	молозиво	Молоко	Молоко+ЗЦМ	Кратность выпойки	Инвентарь	стартер	Рацион	
0 - 60 мин	4 литра молозиво 1 удоя			1	дренчер			
6 часов	2 л - молозиво второго удоя			1	дренчер			
0-7 дн.		2 л.		2 раза/день	ведро	явлю	T0	явлю
8-56 дн.		3 л.		2 раза/день	ведро	явлю	T0	явлю
57-63 дн.		3 л.		1 раза/день	ведро	явлю	T0	явлю
64-70 дн.	Содержание в домиках (индивидуально)				ведро	явлю	T0	явлю
71-84 дн.	Содержание в группах по 10 голов					явлю	T0	явлю
85-150 дн.	Содержание в группах по 10 голов						T1	явлю
151-240 дн.	Содержание в группах по 8 голов						T2	явлю

Приготовление молока с бустермилк

На одну выпойку на голову идет 30 гр бустермилк. В такси наливаем 100 литров молока 40-42 °C и добавляем нужное количество бустермилк. Тщательно перемешать.

Чтобы посчитать норму на одну выпойку нужно: 0,030кг * количество поголовья

1. Температура выпойки молозива 38 – 40 °C.
2. Температура выпойки пастеризованного молока 38 – 40 °C. В зимний период времени 40-42 °C.

Рис.1. Протокол схемы выпойки и кормления телят

Молозиво помогает правильно развиваться в первые дни жизни иммунной системе и компенсировать недостаточную резистентность. Оно имеет богатый белковый состав, который необходим для быстрорастущего организма телёнка [2]. Содержание казеина в нём около половины, а сывороточных белков больше половины. В свою очередь в молоке казеина 3/4-6/7, сывороточного белка 1/6-1/4. Казеин служит источником для роста быстроразвивающихся тканей. Сывороточные белки хорошо усваиваются телятами: а-лактоглобулин играют роль ферментов в биосинтезе молочного сахара и синтезе жирных к-т. b-лактоглобулин транспортирует жиры, каротин и витамины.

Молозиво и молоко богато липидами, жиры выполняют функцию запасных и защитных в-в, а также являются структурными элементами мембран клеток, яв-ся компонентами медиаторов и жирорастворимых витаминов. В молозиве больше полиненасыщенных жирных кислот (арахионовой): в молозиве 1/2, а в молоке 1/10. Они контролируют нормальное функционирование сосудистой и нервной систем. Так же в молозиве и молоке содержится молочный сахар, он играет энергетическую функцию. Молозиво выпаивают обязательно парным. В случае если остыло, подогревают на водяной бане до 36-37 градусов. Телёнку позволяют сосать корову в течении второй половины суток первого дня после рождения, а иногда и дольше, затем переводят на сосковые поилки, имитирующие вымя (при более длительном нахождении корова привыкнет к телёнку, поэтому такой вариант не желателен). Молозиво и молоко часто дают от разных коров, это необходимо для развития хорошего иммунитета. Первое молозиво сдаивают, т.к. оно грязное, последующее уже дают телятам. Коровы на производстве часто производят больше молозива, чем может выпить телёнок, избыток можно заморозить или разбив водой в соотношении 2:1

выпить вместо молока телятам старшего возраста. Свежесцеженное молозиво хранится на холоде в течении 2-3 дней.

При достижении трёх недельного возраста, телят поят из ведра. При этом телёнок зажимают между коленями, подносят ведро с молоком и дают сосательные пальцы, когда телёнок начал сосать, пальцы тут же убирают, чтобы он привык пить сам. Процедуру повторяют несколько раз, пока телёнок не научится пить самостоятельно (примерно на 3-4 день). Первые два-три дня поят 4-5 раз, через равные промежутки, потом столько раз, сколько доят корову, это необходимо для стабильного режима кормления [3].

Кроме потребности в молоке организм телёнка нуждается в воде для выполнения основных физиологических функций. Хотя молозиво и молоко на 75-85% состоит из воды, но эта вода находится в связанном с белком и др. веществами состоянии, поэтому, чтобы не наступило смертельно опасное водное голодание телёнок должен пить воду уже с 4-5 дня жизни. Используют прокипячённую остуженную воду для лучшего утоления жажды. Дают два раза, в перерывах между выпаиванием молока по четыреста мл. за один прием из поилок. С 10-ти дневного возраста переводят на обычную воду (не ниже 12 градусов). Посуда должна быть чистой, моют тёплой водой, затем 2%-ным раствором кальцинированной соды, ополаскивают горячей водой и сушат. После отёла телёнок переводится в сушильный шкаф. Для нормального постэмбрионального развития пользуются холодным способом содержания с индивидуальными домиками на открытом воздухе. Туда телят переводят после того, как он и обсохнут в течении 1-3 дней после отёла. Преимущества этого способа состоят в следующем:

1. Получение естественного солнечного света.
2. Изоляция телят от потенциальных источников инфекции.

- 3.Отсутствие кормовой конкуренции.
- 4.Нет вредного для телят аммиака.
- 5.Индивидуальность ухода и наблюдения за животным.
- 6.Соблюдение разного кормления телят с разным развитием.

Домики могут быть разной конструкции. Деревянные экологически чистые, прочные, не поддаются солнечной радиации, но в зимний период, при отрицательных температурах домик примерзает и его невозможно двигать. Кроме того, дерево из-за своей фактуры сложно дезинфицировать. При содержании в индивидуальных клетках на глубоких подстилках с

перегородками из сена в помещении телята содержатся в тепле, однако часто подвергаются загазованности и лишены солнечного света, а также невозможна качественная дезинфекция клеток, что несомненно является существенными минусами. Большую популярность сыскали индивидуальные пластиковые домики. В этих домиках применяется подстилка из соломы, дна нету. Пластик домиков не пропускает ультрафиолетовые лучи и спасает тем самым жаркую погоду. Но данные домики имеют и недостаток: в период дождей и снега происходит намокание корма и подстилки, что ведёт к порче корма и простудным заболеваниям (рис.2).



Рис. 2. Домики для телят

Так же создавались предложения по использованию групповых домиков, такое решение более экономически выгодное, но оно не сыскало популярность, т.к. допускают инфицирование друг другом телят, особенно лейкозом, поэтому при таком содержании нужно больше следить за здоровьем телят. Для профилактики ряда заболеваний, негативно сказывающихся на росте и развитии телят, применяют следующие вакцинации (на примере ЭкоНивы северной Воронежской области):

1.Ящур (2 раз в год, май и ноябрь; начиная с 4 мес. возраста, вакцина бивалентная (A22, O1) из вируса ящура, культивированного на эпителии языка крупного рогатого скота, ФГУП "Щелковский биокомбинат").

2.Сибирская язва (1 раз в год с 3 мес. возраста, сентябрь; вакцина живая из штамма 55 ВНИИВВ и М против сибирской язвы животных; ФГУП "Орловская Биофабрика").

3.Лептоспироз (1 раз в год; вакцина поливалентная "Бови Шилд Голд" против лептоспироза животных).

4.Микоплазмоз (ассоциированная инактивированная тканевая вакцина с включениями местных штаммов-изолятов).

5.ОКЗ: пастереллез, сальмонеллез, стафилококкоз, псевдомоноз, стрептококкоз, эшерихиоз, протеоз крупного рогатого скота (вакцинируют глубокостельных коров за 1-1,5 месяца до отела, ревакцинация через 10-14 дней, и телят в возрасте 10 дней, ревакцинация через 10-14 дней; ассоциированная инактивированная вакцина против пастереллеза, сальмонеллеза, стафилококкоза, псевдомоноза, стрептококкоза, эшерихиоза, протеоза крупного рогатого скота.

Нормальный рост и развитие телят зависит от правильного питания и содержания. Важно подбирать корма, соответствующие возрасту и физиологическим особенностям телят, а также обеспечивать условия для их полноценного развития. Вакцинация является важной профилактической мерой для сохранения здоровья телят.

Список источников:

1.Пахомов, И. Я. Выращивание здоровых телят в молочный период: аналитический обзор / И. Я. Пахомов, Н. П. Разумовский. - Минск: Белорусский научный институт внедрения новых форм хозяйствования в АПК, 2003. - 52 с.

2.Петрушко, Ю. В. Эффективность выращивания телят в разных условиях: сб. научных

трудов / Ю. В. Петрушко, М. В. Рубина // Межд. молодежная научно-практич. конф. «Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов - регионам» 21 апреля 2016 г, Вологда-Молочное: Вологодская ГМХА, 2016. - С. 210-214.

3.Ткачук, С. А. Влияние условий содержания телят на их продуктивность / С. А. Ткачук ; рук. работы М. В. Рубина // Студенты - науке и практике АПК : материалы 98-ой Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 21-22 мая 3013г.). - Витебск : ВГАВМ, 2013. - С. 96.

Евразийский Союз Ученых.
Серия: медицинские, биологические и химические науки

Ежемесячный научный журнал

№ 6 (107)/2023 Том 1

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Макаровский Денис Анатольевич

AuthorID: 559173

Заведующий кафедрой организационного управления Института прикладного анализа поведения и психолого-социальных технологий, практикующий психолог, специалист в сфере управления образованием.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

• **Карпенко Юрий Дмитриевич**

AuthorID: 338912

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА, Лаборатория эколого-гигиенической оценки отходов (Москва), доктор биологических наук.

• **Малаховский Владимир Владимирович**

AuthorID: 666188

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Факультеты, Факультет послевузовского профессионального образования врачей, кафедра нелекарственных методов терапии и клинической физиологии (Москва), доктор медицинских наук.

• **Ильясов Олег Рашитович**

AuthorID: 331592

Уральский государственный университет путей сообщения, кафедра техносферной безопасности (Екатеринбург), доктор биологических наук

• **Косс Виктор Викторович**

AuthorID: 563195

Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, НИИ спортивной медицины (Москва), кандидат медицинских наук.

• **Калинина Марина Анатольевна**

AuthorID: 666558

Научный центр психического здоровья, Отдел по изучению психической патологии раннего детского возраста (Москва), кандидат медицинских наук.

• **Сырочкина Мария Александровна**

AuthorID: 772151

Пфайзер, вакцины медицинский отдел (Екатеринбург), кандидат медицинских наук

Статьи, поступающие в редакцию, рецензируются. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несут авторы. Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов. При перепечатке ссылка на журнал обязательна. Материалы публикуются в авторской редакции.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Художник: Валегин Арсений Петрович
Верстка: Курпатова Ирина Александровна

Адрес редакции:
198320, Санкт-Петербург, Город Красное Село, ул. Геологическая, д. 44, к. 1, литера А
E-mail: info@euroasia-science.ru ;
www.euroasia-science.ru

Учредитель и издатель ООО «Логика+»
Тираж 1000 экз.