

УДК 612.46+616-005.1-08+59.082

Л.В. Анисимова, А.А. Писарев, А.В. Кубышкин, Е.П. Голубинская, Ю.И. Шрамко
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОЧЕК И СОСТОЯНИЕ
СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ
РЕПЕРФУЗИОННОГО СИНДРОМА

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Медицинская академия имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение), г. Симферополь, Российская Федерация

L.V. Anisimova, A.A. Pisarev, A.V. Kubyshkin, E.P. Golubinskaya, Yu.I. Shramko
RATS' KIDNEYS MORPHOFUNCTIONAL CHANGES AND HEMOSTASIS
SYSTEM STATE IN REPERFUSION SYNDROME DEVELOPMENT

V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Simferopol, Russian Federation

Резюме. Цель — определение общих закономерностей морфофункциональных изменений почек и изменений в свертывающей системе крови при развитии экспериментального реперфузионного синдрома. **Материал и методы.** Исследования проведены на 60 белых крысах-самцах линии Wistar, массой 180-200 г. на модели реперфузионного синдрома (РС), который моделировали путём наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки. Материалом для исследования служила кровь крыс, которую получали путем выполнения кардиопункции, однократно. Проведено поэтапное морфологическое исследование, включающее стандартное гистологическое исследование с использованием окраски гематоксилином и эозином и последующее иммуногистохимическое (ИГХ) исследование. Полученные в процессе исследования данные обрабатывались методом математической статистики. **Результаты исследования:** морфологические изменения почек в течение первых суток развития РС еще не носят катастрофического характера и проявляются только формированием пусковых механизмов повреждения почечной ткани, включая активацию апоптоза и запуск провоспалительных путей повреждения. Эти изменения еще не сказываются в полной мере на функциональной активности почек. Выявленные нарушения в системе свертывания крови с потенциальной угрозой развития ДВС-синдрома в большей степени связаны с усилением потребления факторов свертывания и в меньшей мере с угнетением гемостатической функции почек. **Заключение:** В ходе экспериментальных исследований патогенетических механизмов синдрома системной реперфузии в течение 6, 12 и 24 часов было установлено, что при развитии РС в ткани почек происходят реакции перекрестных молекулярных и клеточных взаимодействий характерных для воспалительного процесса. Дефицит факторов коагуляции считается одним из ключевых патогенетических механизмов нарушений системы гемостаза. Он возникает вследствие чрезмерного потребления названных факторов в условиях длительной активации каскада коагуляции, а также из-за снижения синтетической функции почек при длитель-

Abstract. The purpose of this work is to determine the general patterns of morphofunctional changes in the kidneys and changes in the blood coagulation system in experimental reperfusion syndrome. **Material and methods.** Studies were carried out on 60 white male rats of the Wistar line, 180-200g of weight in the modelling of reperfusion syndrome (RS) by applying rubber tourniquets to both hind limbs at the level of the inguinal fold. The studying material was rat blood, obtained by single cardiopuncture. A staged morphological investigation was conducted, including a standard histological hematoxylin-eosin staining and a subsequent immunohistochemical (IHC) study. The obtained data were processed by mathematical statistics. **Results.** Morphological changes of the kidneys during the first day of RS development were not catastrophic yet and manifested only by the trigger mechanisms of renal tissue damage, including the activation of apoptosis and the launch of proinflammatory damage pathways. These changes did not yet fully affect the functional activity of the kidneys. The revealed disorders in the blood coagulation system with a potential threat of DIC syndrome development were mostly associated with increased consumption of coagulation factors and to a lesser extent with inhibition of renal hemostatic function. **Conclusion.** In the experimental studies of systemic reperfusion syndrome pathogenetic mechanisms during 6, 12- and 24-hours reactions of cross-molecular and cellular interactions characteristic of the inflammatory process in kidney tissue were found. Deficiency of coagulation factors is considered one of the key pathogenetic mechanisms of hemostatic disorders. It occurs due to excessive consumption of these factors in the conditions of long-term coagulation cascade activation, as well as due to a decrease in synthetic kidneys' function prolonged load, and in their hypoxic and reperfusion damage.

Keywords: kidneys, blood clotting system, reperfusion syndrome, apoptosis, inflammation

ной их нагрузке, а также при ее гипоксическом и реперфузионном повреждении.

Ключевые слова: почки, свертывающая система крови, реперфузионный синдром, апоптоз, воспаление

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Анисимова Людмила Васильевна
anisanisl@mail.ru

Дата поступления 10.12.2020 г.

Образец цитирования:

Анисимова Л.В., Писарев А.А., Кубышкин А.В., Голубинская Е.П., Шрамко Ю.И. Морфофункциональные изменения почек и состояние системы гемостаза крыс при развитии реперфузионного синдрома. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №1, с. 5–17, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-5-17

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Ludmila V. Anisimova

anisanisl@mail.ru

Received 10.12.2020

For citation:

Anisimova L.V., Pisarev A.A., Kubyshev A.V., Golubinskaya E.P., Shramko Yu.I. Rats' kidneys morphofunctional changes and hemostasis system state in reperfusion syndrome development. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 1, pp. 5–17. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-1-5-17 (In Russ)

Почки играют важную роль в регуляции системы гемостаза. В тканях почек вырабатываются и выделяются в кровь и мочу факторы свертывания VII, VIII, IX, X и тромбопластин; синтезируются противосвертывающие факторы: гепарин, урокиназа, тканевой активатор плазминогена, соединения, ингибирующие фибринолиз; поглощаются и катаболизируются фактор XII и часть фибриногена [1, 2]. В связи с этим патологические состояния, приводящие к повреждению почек, сопровождаются в большей или меньшей мере нарушениями в системе гемостаза [3]. Повреждение почек особое внимание привлекает в процессе формирования СПОН, которое является одним из ключевых компонентов повреждения органов-мишеней, влияющих на развитие и исходы критических состояний. При этом состояние свертывающей системы крови рассматривают как одно из ключевых условий для развития диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), приводящего к развитию синдрома полиорганной недостаточности с летальностью более 50% [4, 5, 6]. Причем следует отметить, что, хотя развитие ДВС-синдрома в классической форме рядом исследователей подвергается сомнению [7, 8], проблема коагулопатии потребления при критических состояниях не теряет своей актуальности [8, 9].

Цель исследования — определение общих закономерностей морфофункциональных изменений почек и изменений в свертывающей системе крови при развитии экспериментального реперфузионного синдрома.

Материалы и методы

Исследования проведены на 60 белых крысах-самцах линии Wistar, массой 180–200 г. Животных содержали в стандартных идентичных условиях («Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными»,

The kidneys play an important role in homeostasis regulation. In kidney tissues coagulation factors VII, VIII, IX, X and thromboplastin are produced and excreted into blood and urine; anticoagulant factors: heparin, urokinase, tissue activator of plasminogen and compounds inhibiting fibrinolysis are also synthesized; factor XII and part of fibrinogen are absorbed and catabolized [1, 2]. In this regard, pathological conditions leading to kidney damage are accompanied by disorders in the hemostatic system to a greater or lesser extent [3].

Kidney damage attracts particular attention in the formation of multiple organ failure (MOF), which is one of the key components of target organs damage that affects the development and outcomes of critical conditions. At the same time, the state of the blood coagulation system is considered one of the key conditions for the development of disseminated intravascular coagulation (DIC), leading to multiple organ failure syndrome with more than 50% mortality rate of [4, 5, 6]. Moreover, it should be noted that although the development of DIC syndrome in the classical form is questioned by a number of researchers [7, 8], the problem of consumptive coagulopathy in critical conditions still stays important [8, 9].

The aim of the study was to determine general regularities of morphofunctional changes in the kidneys and changes in the blood coagulation system in experimental reperfusion syndrome.

Materials and methods

Studies were performed on 60 white “Wistar” rats, 180–200 g of weight. The animals were kept in identical standard conditions (“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, Russian National Standard Z 53434-2009, article No. 5 of the Convention), what is required to create the structural groups; the approval of V. I. Vernadsky

ГОСТ 33215-2014, статья №5 Конвенции), что необходимо для создания структурной группы; на проведение работы было получено разрешение комитета по этике ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» (протокол №2 от 11 сентября 2015 г.). Исследования и эвтаназия выполнялись в строгом соответствии с государственными и международными нормами о гуманном отношении к животным и соблюдением основных положений нормативно-правовых актов [10, 11, 12].

Экспериментальные исследования по изучению патогенетических морфо-функциональных нарушений и изменений в свертывающей системе крови, проводили на модели реперфузионного синдрома (РС), который моделировали путём наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки [13, 14]. Ширина пережатия тканей составила 2-3 мм. Показателем правильности наложения жгута являлось отсутствие отёка конечностей и бледность их окраски. Реваскуляризацию производили одномоментно путём рассечения жгутов через 6 часов после их наложения [15]. Посредством простой рандомизации были сформированы следующие экспериментальные группы животных: группа контроля (n=15) — intactные животные; группа реперфузии 6 часов (n=12); группа реперфузии 12 часов (n=11); группа реперфузии 24 часа (n=10). Материалом для исследования служила кровь крыс, которую получали путем выполнения кардиопункции, однократно, объёмом 4 мл в одноразовые пробирки вакутейнеры с 0,05 М ЭДТА в течение 10-15 сек. Кровь центрифугировали в течение 15 минут при 1200 g. Эвтаназию животных осуществляли после предварительной наркотизации тиопенталом натрия (40 мг/кг) путем декапитации [16].

Биохимические исследования крови проводили на автоматическом анализаторе «Targa BT 3000», Biotechnica Instruments (Италия) с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов фирмы «DiaSys». Биохимическое исследование крови экспериментальных животных проводилось с целью оценки следующих показателей: холинэстераза (ХЭ), амилаза, креатинин, мочевины.

Для оценки состояния свертывающей системы определяли следующие показатели: международное нормализованное отношение (МНО), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), плазминоген (ПГ), антиплазмин (АПЛ). Показатели гемостаза измеряли на автоматическом коагулометре «CA 1500» фирмы Sysmex, Япония, с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов Simens, Германия. МНО и АЧТВ измеряли клоттинговыми методами. Активность АПЛ и концентрацию ПГ определяли с помощью хромогенных методов. Содержание РФМК оценивали ручным паракоагуляционным методом с использованием наборов реагентов «Технология-стандарт» (Россия).

Было проведено поэтапное морфологическое исследование

Crimea Federal University, Medical Academy named after S. I. Georgievsky ethics Committee (protocol No. 2, September 11, 2015) on the work was received. Research and euthanasia were carried out in strict accordance with state and international standards of humanity in attitude to animals and in compliance with the basic legal acts [10, 11, 12].

Experimental studies of pathogenetic changes in pathogenetic morphofunctional and blood coagulation system changes were performed on the model of reperfusion syndrome (RS), modeled by the applying of rubber bands to both hind limbs at the level of the inguinal fold [13, 14]. The width of the cross-clamping of the tissue was 2-3 mm. An indication of the correct tourniquet was the absence of extremities edema and paleness of their color. Revascularization was performed simultaneously by cutting the bundles 6 hours after their application. [15]. By simple randomization, the following experimental animal groups were formed: control group (n=15) — intact animals; 6-hour reperfusion group (n=12); 12-hour reperfusion group (n=11); 24-hour reperfusion group (n=10).

The material for the study was rat blood, which was obtained by single cardiopuncture, with a volume of 4 ml in disposable samples vacutainers with 0.05 M EDTA for 10-15 seconds

The blood was centrifuged for 15 minutes at 1200 g. Euthanasia of animals was performed under thiopental anesthesia (40 mg/kg) by decapitation [16].

Biochemical blood tests were performed on the automatic analyzer «Targa BT 3000», Biotechnica Instruments (Italy) with standard commercial kits of reagents «DiaSys». Biochemical blood study was carried out to assess the following parameters: cholinesterase (HE), amylase, creatinine, urea. The following parameters were determined to evaluate the state of the coagulation system: international normalized ratio (INR), activated partial thromboplastin time (aPTT), soluble fibrin monomer complex (SFMC), plasminogen (PG), antiplasmin (APL). Hemostatic parameters were measured on an automatic coagulometer «CA 1500», Sysmex, Japan, using standard commercial reagent kits Simens, Germany. INR and aPTT were measured by clotting methods. APL activity and PG concentration were determined by chromogenic methods. The content of the SFMC was assessed by paracoagulation manual method using «Technology-standard» (Russia) kits of reagents.

A phase morphological study, including a standard histological test with hematoxylin and eosin staining and a subsequent immunohistochemical (IHC) assay was performed. IHC assay was carried out on serial paraffin sections with a thickness of 4 microns (automatic rotary microtome Leica RM 2255, Germany), placed on adhesive glass (Leica Biosystems, UK). Concentrated antibodies to regulators of apoptosis bcl-2-protein (NCL-LBCL-2, Novocastra, UK) at a dilution of 1:100, a marker of Fas-receptor CD95 (BD Biosciences, UK) at a dilution of 1:100

дование, включающее стандартное гистологическое исследование с использованием окраски гематоксилином и эозином и последующее иммуногистохимическое (ИГХ) исследование. ИГХ исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 4 мкм (автоматический ротационный микротом Leica RM 2255, Германия), помещенных на адгезивные стекла (LeicaBiosystems, Великобритания). Использовали концентрированные антитела к регулятору апоптоза bcl-2-протеину (NCL-LBCL-2, Novocastra, Великобритания) в разведении 1:100, маркер Fas-рецепторов CD95 (BD Biosciences, Великобритания) в разведении 1:100 (использовали раствор для разведения первичных антител LeicaBiosystems, Великобритания), а также готовые к использованию моноклональные антитела к маркерам лейкоцитов CD45, CD8, CD68, CD56 (клон MM1, Leica, Великобритания). Применяли систему детекции Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Великобритания). Постановку реакции осуществляли с помощью автоматизированной системы ИГХ окрашивания Bond Max (Leica Biosystems Melburn Pty, Австралия), в каждой серии дополнительно ставили реакцию с тканями негативного и позитивного контроля к указанным антителам. Реакцию оценивали в световом поле при увеличении 400х в десяти полях зрения. Использовали сканер препаратов Aperio CS2 (LeicaBiosystems, Германия) с программным обеспечением AperioImageScope. Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли цифровой камерой OLYMPUS 5050Z, установленной на микроскопе «OlympusCX-41». Морфометрический анализ полученных данных проводили с помощью лицензионного программного обеспечения ImageJ.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывались методом математической статистики с использованием сертифицированного компьютерного пакета обработки данных MedStat для работы в среде Windows. Определялись основные статистические характеристики: среднее (M), ошибка среднего (m). Для сравнения групповых средних в двух группах использовался t-критерий Стьюдента. Результаты статистической обработки показателей системы гемостаза представлены в виде относительных различий с контрольной группой в процентах.

Результаты и обсуждение

В результате выполненных исследований установлено, что морфологические изменения в ткани почек при моделировании РС характеризуются нарушениями микроциркуляции и дистрофически-некротическими изменениями эпителия извитых канальцев разной степени выраженности. Так, в группе экспериментальных животных с моделью шестичасовой ишемии выявлены гемоперфузионные нарушения, проявляющиеся в виде полнокровия сосудов и капилляров, интерстициальным и периваскулярным отеком и гиалиново-капельной дистрофией нефроцитов почечных каналь-

(for dilution of primary antibodies; Leica Biosystems, UK) and standard monoclonal antibodies to markers of leukocytes CD45, CD8, CD68, CD56 (clone MM1, Leica, UK) were used. The system of detection Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, UK) was employed. The production reaction with an automated IHC assay staining system Bond-Max (Leica Biosystems Pty Melburn, Australia) was performed; in each series an additional reaction with the tissues negative and positive control for these antibodies was set. The reaction was evaluated in a light field at 400x magnification in ten fields of view. The scanner CS2 Aperio (Leica Biosystems, Germany) with software Aperio ImageScope was used. Browsing and digital photos of the slides were carried out with a digital camera OLYMPUS 5050Z installed on the microscope «OlympusCX-41». Morphometric analysis of the obtained data was performed on the ImageJ licensed software.

The data obtained during the study were processed by MedStat (Windows) certified computer program. The main statistical characteristics were determined: average (M), mean error (m) and standard deviation. Student's t-test was used to compare group averages in the two groups. The results of statistical processing of hemostasis system parameters are presented in the form of relative differences with the control group in percentage.

Results and discussion

As a result of the performed studies was stated that morphological changes in kidney tissue in the modelled RS are characterized by microcirculatory disorders and dystrophic-necrotic changes of different severity in the tubular epithelium. Thus, in a group of experimental animals with a model of six-hour ischemia, hemoperfusive disorders were revealed, that manifested by congestion, interstitial and perivascular edema and hyaline-drip dystrophy of nephrocytes of the renal tubules. Analysis of kidney tissue slides in groups with the modeling RS in terms of 6 and 12 hours showed the progression of hemoperfusive disorders. Congestion, glomeruli with foci of petechial hemorrhages, and stasis phenomena take place. Perivascular interstitial edema and hyaline droplet degeneration of kidney cells with the destruction of the brush border, epithelial swelling, condensation of nuclei were marked (Fig.1A).

In the group of experimental animals, when modeling ischemia-reperfusion syndrome in 24 hours, more expressed changes were determined, manifested not only by vascular hyperemia and stasis, but also by sludge with capillary fibrin blood clot and more extensive foci of hemorrhages. Perivascular moderate leukocyte infiltration was observed. The foci of nephrocyte necrosis were noticed in tubular epithelium which is a morphological manifestation of necrotic nephrosis and acute renal failure (Fig. 1B).

The analysis of IGH reactions with inflammatory and apoptotic markers in the studied terms of reperfusion development allowed to state some regularities. Thus, the study of apoptosis markers FAS (CD95) and bcl-2 in kidney tissue

цев. Анализ микропрепаратов ткани почек группы животных при моделировании РС в сроки 6 и 12 часов показал прогрессию гемоперфузионных расстройств. Гиперемия сосудов, капилляров, клубочков с очагами петехиальных кровоизлияний, имеют место явления стаза. Отмечается интерстициальный периваскулярный отек и гиалиново-капельная дистрофия нефроцитов с разрушением щеточной каймы, набуханием эпителия, конденсацией ядер (рис. 1А).

В группе экспериментальных животных при моделировании синдрома ишемии-реперфузии в течении 24 часов определяются более выраженные изменения, проявляющиеся не только полнокровием и стазом сосудов, но и наличием сладжа с формированием фибриновых тромбов в капиллярах, более обширными очагами кровоизлияний. Периваскулярно отмечается умеренная лейкоцитарная инфильтрация. Со стороны тубулярного эпителия появляются очаги некроза нефроцитов, что является морфологическим проявлением некротического нефроза и острой почечной недостаточности (рис. 1В).

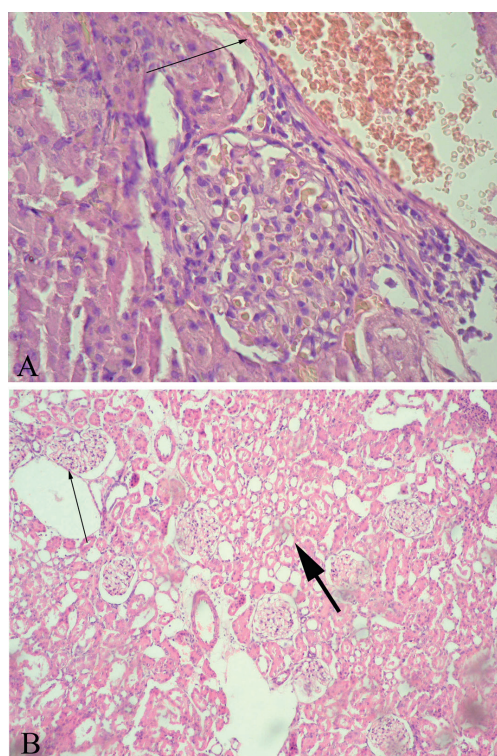


Рисунок 1. Ткань почек крыс экспериментальных групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. А — Ткань почек крыс в группе с моделью синдрома ишемии-реперфузии 12 ч. Гиперемия сосуда (стрелка). Дистрофические и очаговые некробиотические изменения нефроцитов проксимальных и дистальных почечных канальцев.

В — Ткань почек крыс в группе с реперфузией через 24 ч. Гиперемия капилляров клубочка и перитубулярной капиллярной сети (тонкая стрелка). Обширный некроз эпителия проксимальных канальцев (толстая стрелка).

Анализ ИГХ реакций с маркерами воспаления и апоптоза в исследуемых сроках развития реперфузии

revealed the presence of immunohistochemical inversion of Pro-apoptotic and anti-apoptotic markers in experimental groups in comparison with intact animals. Samples of intact animals' kidney tissue were characterized by spread intense nuclear expression of FAS-ligand in epithelial cells in all cases, mainly distal tubules with an average of 79.43 ± 15.27 cells, which indicated their increased sensitivity to the action of various pathological factors (table. 1).

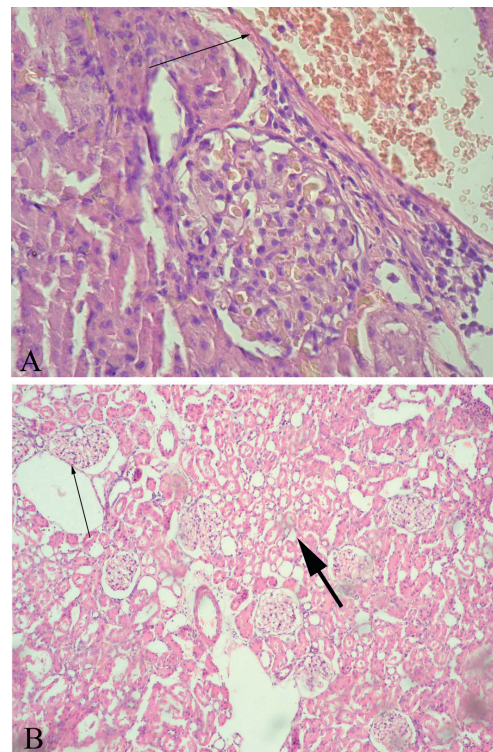


Fig. 1. Rat kidneys tissue in the experimental group. Stained with hematoxylin-eosin. Magnification $\times 200$.

(A) Rat kidneys tissue in the experimental group after 12 hours of reperfusion. Congestion (arrow). Dystrophic and focal necrobiotic changes in nephrocytes of the proximal and distal renal tubules.

(B) Rat kidneys tissue in experimental reperfusion after 24 hours. Hyperemia of the glomerular capillaries and peritubular capillary network (thin arrow). Extensive necrosis of the epithelium of the proximal tubules (bold arrow).

In longer reperfusion periods, a stable decrease in the number of FAS+ cells were recorded due to both the increase of necrobiotic changes' area in the tubules and the development of necrotic nephrosis. In this case, recorded rates were high enough due to the redistribution of the cellular mortal receptor in cells of lymphoid origin.

Tubular epithelial cells abundantly expressed CD95, reaching maximum data at 12-hour reperfusion. (Fig.2B). Fine cytoplasmic positive reaction of bcl-2 in control samples of kidney tissues was stated diffusely in the parenchyma, both in the cerebral and cortical layers (Fig. 2C.). IGH analysis in experimental groups with ischemia-reperfusion syndrome revealed a decline in the expression of the apoptosis blocker marker in tubular epithelial cells

позволил установить некоторые закономерности. Так, исследование маркеров апоптоза FAS (CD95) и bcl-2 в ткани почек выявило наличие иммуногистохимической инверсии проапоптотических и антиапоптотических маркеров в экспериментальных группах в сравнении с интактными животными. В образцах ткани почек интактных животных во всех случаях характеризовалась распространенной интенсивной ядерной экспрессией FAS-лиганда в эпителиоцитах, преимущественно дистальных канальцев со средним показателем $79,43 \pm 15,27$ клетки, что свидетельствует об их повышенной чувствительности к действию различных патологических факторов (табл. 1).

Таблица 1

Количественные показатели иммуногистохимических реакций во фрагментах ткани почек крыс с моделью реперфузионного синдрома

Группа	FAS (CD95)	Bcl-2	CD68	CD8	CD45	CD56
	M±m (Абс.)					
Контроль n=15	79,43±15,27*	16,01±3,78*	10,25±3,14*	4,16±0,92*	6,40±2,19*	6,81±0,74*
Ишемия 6 часов n=12	103,01±18,91*	10,71±2,43*	15,73±4,01*	7,29±1,01*	10,01±3,12*	8,12±1,01*
Реперфузия 6 часов n=12	147,86±19,03*	6,18±1,02*	21,38±5,16*	10,34±3,17*	15,78±5,71*	11,13±3,01*
Реперфузия 12 часов n=11	101,41±16,25*	4,03±0,92*	29,12±9,01*	15,01±5,01*	20,22±7,01*	14,07±3,28*
Реперфузия 24 часа n=10	88,04±14,95*	0,08±0,01*	35,51±10,12*	19,26±6,71*	30,04±9,13*	17,02±4,11*

Примечание: звёздочками отмечена достоверность различий показателей (p) по отношению к контрольной группе животных (*p≤0,05); n — количество животных.

При более продолжительных реперфузионных периодах фиксируется стабильное уменьшение числа FAS+ клеток в связи с увеличением площади некробиотических изменений канальцев и развития некротического нефроза. При этом достаточно высокие в целом показатели фиксируются за счет перераспределения рецептора смерти в клетки лимфоидного происхождения.

Эпителиоциты канальцев обильно экспрессируют CD95, достигая максимальных показателей при 12-ти часовой реперфузии. (рис. 2B). Слабая цитоплазматическая позитивная реакция bcl-2 в контрольных образцах тканей почек определялась диффузно в паренхиме, как в мозговом, так и корковом слоях (рис. 2C). ИГХ анализ в экспериментальных группах при моделировании синдрома ишемии-реперфузии позволил выявить прогрессивное снижение экспрессии маркера блокатора апоптоза в эпителиоцитах канальцев вплоть до тотального исчезновения при одновременной интенсификации FAS-лиганда (рис. 2D).

Увеличение пула макрофагов в ишемизированных тканях сопровождается нарастанием популяции CD8+ клеток вследствие их антигенной активации макрофа-

up to total disappearance with simultaneous intensification of the FAS ligand (Fig. 2D.).

The rise of macrophages pool in ischemic tissues was accompanied by an expansion in the CD8+ cell's population due to their macrophagic antigenic activation. The progression of the CD45 marker also characterized the prevalence of exudative processes over alternative ischemia.

Table 1

Numerical characteristics of immunohistochemical markers in rat kidney tissue with reperfusion syndrome model

Group	FAS (CD95)	Bcl-2	CD68	CD8	CD45	CD56
	M±m(abs)					
Control n=15	79,43±15,27*	16,01±3,78*	10,25±3,14*	4,16±0,92*	6,40±2,19*	6,81±0,74*
Ischemia 6 hours n=12	103,01±18,91*	10,71±2,43*	15,73±4,01*	7,29±1,01*	10,01±3,12*	8,12±1,01*
Reperfusion 6 hours n=12	147,86±19,03*	6,18±1,02*	21,38±5,16*	10,34±3,17*	15,78±5,71*	11,13±3,01*
Reperfusion 12 hours n=11	101,41±16,25*	4,03±0,92*	29,12±9,01*	15,01±5,01*	20,22±7,01*	14,07±3,28*
Reperfusion 24 hours n=10	88,04±14,95*	0,08±0,01*	35,51±10,12*	19,26±6,71*	30,04±9,13*	17,02±4,11*

Note: * indicate the reliability of differences in data (p) in comparison with the control group of animals (*p≤0.05); n — the number of animals

Thus, the analysis of IGH reactions in kidney tissues of experimental animals indicated hyperactivation of proapoptotic factor CD95 in distal tubules and simultaneous critical inhibition of apoptosis blockers. Probably, this contributes to the activation of phagocytosis, which is accompanied by antigenic presentation to lymphoid cells. This explains the increased expression of CD8+ - specific marker of T-killers, which indicates the potentiation of secondary cytotoxic alteration of hepatocytes.

To sum up the results of IGH reactions and pathomorphological changes in kidneys at the light-optical level, it can be assumed that in RS there were reactions of cross-molecular and cellular interactions typical to the inflammatory process in kidney tissue. There was a phase of alteration (development of dystrophy and necrosis with simultaneous inhibition of apoptosis) and phase of exudation began either (increase in the number of inflammatory cells in kidney stroma). The maximum degree of damage was observed in the group with reperfusion period duration of 24 hours.

Against the background of the described morphological changes in kidneys tissue, a change in blood biochemical parameters characterized the functional state of the kidneys was established.

гами. Прогрессия маркера CD45 также характеризует превалирование экссудативных процессов над альтеративной ишемизацией.

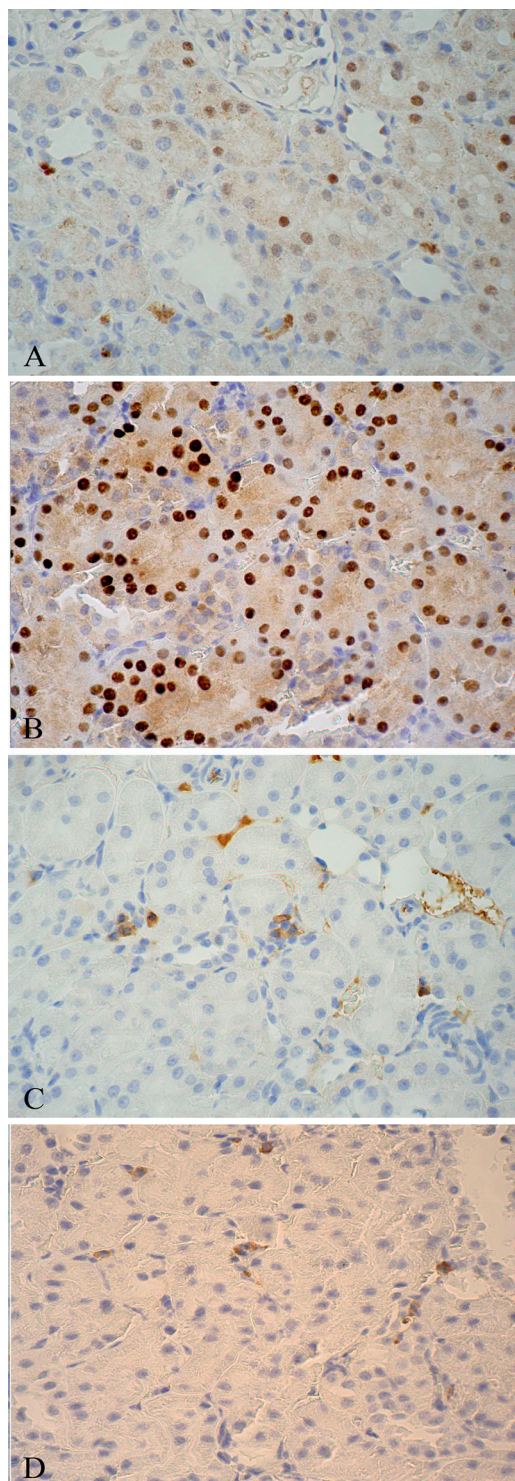


Рисунок 2. ИГХ реакции в ткани почек крыс контрольной и экспериментальной групп. Ув. $\times 200$.

A — Контрольная группа. Позитивная ядерная экспрессия маркера CD95 в эпителиоцитах канальцев.
B — Экспериментальная группа с моделью ишемии-реперфузии в течение 12 часов. Позитивная ядерная экспрессия маркера CD95 в эпителиоцитах канальцев.
C — Контрольная группа. Позитивная цитоплазматическая реакция маркера Bcl-2.
D — Экспериментальная группа с моделью ишемии-реперфузии в течение 6 часов. Позитивная цитоплазматическая реакция маркера Bcl-2.

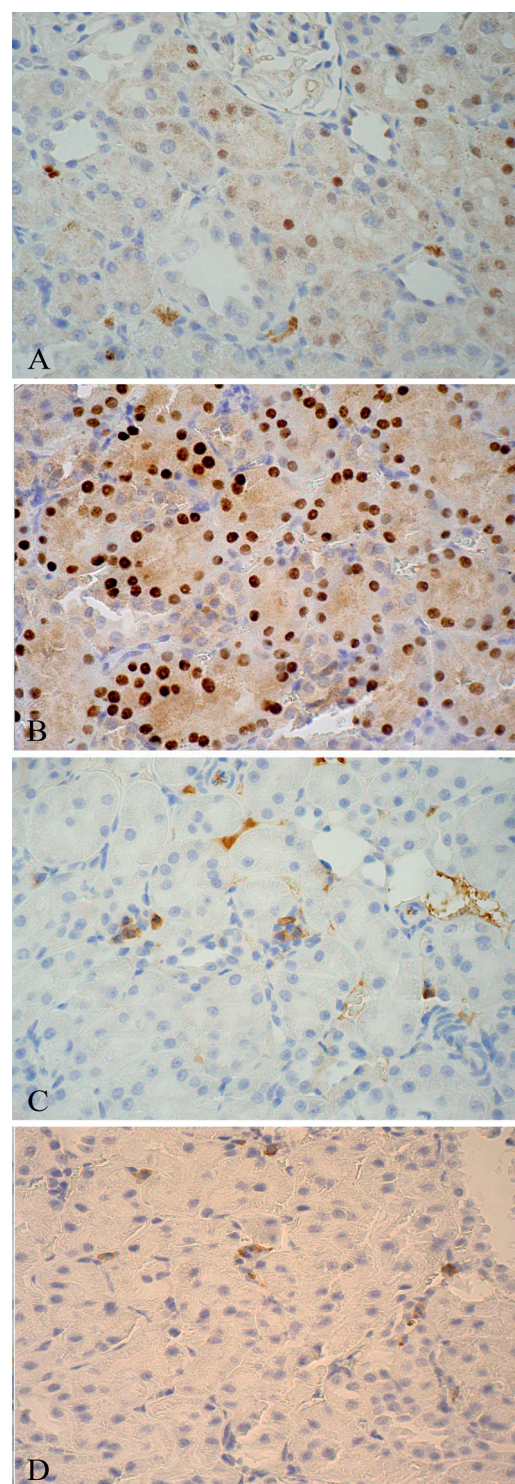


Fig. 2. IHC reaction in rat kidneys tissue in control and experimental groups. Magnification $\times 200$.

A. The control group. Positive nuclear expression of the marker CD95 in tubular epitheliocytes
B. The experimental group with reperfusion of 12 hours. Positive nuclear expression of the marker CD95 in tubular epitheliocytes
C. The control group. Positive cytoplasmic response with marker bcl-2.
D. The experimental group with reperfusion of 6 hours. Positive cytoplasmic response with marker bcl-2.
CD56 marker of natural killers showed reliable differences with control samples both 12 and 24 hours after the beginning of reperfusion despite the absolute increase in the number of positively colored cells, (Fig. 3A, B)

CD56 маркер натуральных киллеров, несмотря на абсолютное повышение количества позитивно окрашенных клеток, продемонстрировал достоверные отличия с контрольными образцами также спустя 12 и 24 часа после начала реперфузии (рис. 3А, В)

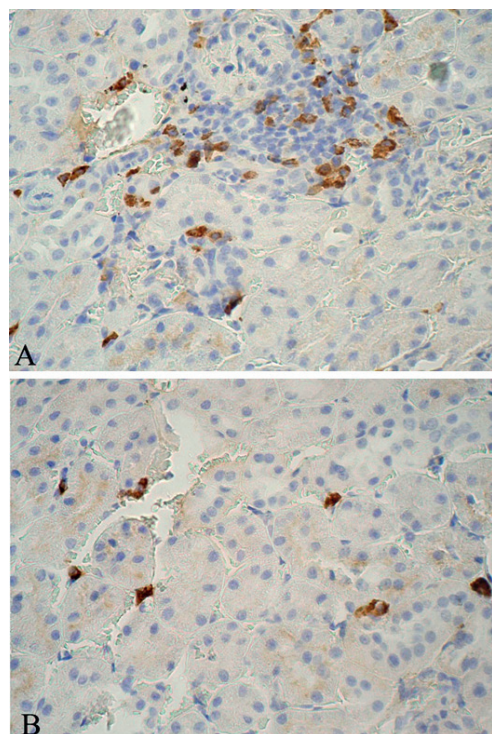


Рисунок 3. ИГХ реакция с маркером CD56 в ткани почек крыс экспериментальных животных. Ув.200.

А — Экспериментальная группа животных с моделью реперфузии в течение 24 часов. Позитивная мембранная реакция в лимфоидном агрегате.

В — Контрольная группа животных. Единичные клетки с позитивной мембранной реакцией.

Таким образом, анализ ИГХ реакций в тканях почек экспериментальных животных свидетельствует о гиперактивации проапоптотического фактора CD95 в дистальных канальцах и одновременном критическом угнетении блокаторов апоптоза. Вероятно, это способствует активации фагоцитоза, что сопровождается антигенной презентацией клеткам лимфоидного ряда. Этим объясняется повышение экспрессии CD8+ — специфического маркера Т-киллеров, что свидетельствует о потенцировании вторичной цитотоксической альтерации гепатоцитов.

Суммируя результаты ИГХ реакций и патоморфологические изменения почек на светооптическом уровне, можно предположить, что при развитии РС в ткани почек происходят реакции перекрестных молекулярных и клеточных взаимодействий, характерных для воспалительного процесса. Возникла фаза альтерации (развитие дистрофии и некроза при одновременном угнетении апоптоза) и начиналась фаза экссудации (увеличение количества клеток воспалительного ряда в стро-ме почек). Максимальная степень повреждения отмечалась в группе с продолжительностью реперфузион-

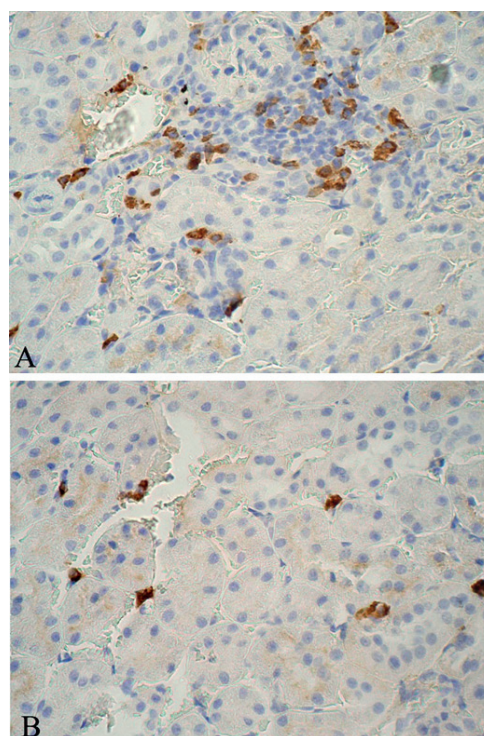


Fig. 3. IHC reaction with marker CD56 in rat kidneys tissue of experimental groups. Magnification $\times 200$.

A. The experimental group with reperfusion of 12 hours. Positive membrane reaction in the lymphoid aggregate

B. The control group. Single cells with a positive membrane reaction.

The regular dynamics of changes in hemostasis indices was proved as a result of the experiment. Against this background, more significant changes were revealed in the study of rats' hemostatic parameters in RS model (Fig. 4). It was found that at 6-hour ischemia there is a significant increase in INR, but valid changes in hemostasis were not reached. Attaching a 6-hour reperfusion injury, significant changes were detected in the parameters of both external and internal coagulation pathways. There was a steady rise in INR and extension of aPTT by 170% compared with the control group. There was also a marked reduction in the content of soluble fibrin-monomer complexes by 62 % compared with the control. In addition, there was a decrease in plasminogen levels on a background antiplasmin level drop. The shown extension of aPTT indicates excessive consumption of blood coagulation factors-hypercoagulation, connected with active prothrombinase's complex formation by the internal coagulative mechanism.

In the prolongation of reperfusion up to 12 hours, the increase in INR had been continuing, which was almost 2 times higher the control value, and the extension of the aPTT reached a 5-times higher of the control level. More intensive cleavage of peptide bonds in fibrin and fibrinogen by plasmin was accompanied by accumulation of fibrin degradation products (fibrinogen), which increased by 1.2 times. The increase in the duration of the reperfusion

ного периода 24 часа.

На фоне описанных морфологических изменений ткани почек установлено изменение биохимических показателей крови, характеризующих функциональное состояние почек.

В динамике развития РС в группе животных с продолжительностью реперфузионного периода 6 часов происходит повышение креатинина на 36%. Креатинин экскретируется преимущественно почками, таким образом, его уровень может повышаться при почечном повреждении, а также массивной травматизации скелетной мускулатуры, что, в свою очередь, может послужить причиной развития острого почечного повреждения при динамическом повышении данного показателя, а также снижении почасового темпа диуреза. При этом уровень мочевины практически не отличался от значений контрольной группы, что свидетельствует об относительно сохранной фильтрационной функции почек.

Таблица 2

Биохимический состав крови у крыс при экспериментальном реперфузионном синдроме

Группа	Показатели	
	Креатинин мкмоль/л	Мочевина Ммоль/л
Контроль n=15	43,66±2,2	3,94±0,2
Ишемия 6 часов n=12	45,4±2,3*	3,93±0,2*
Реперфузия 6 часов n=12	66,6±3,6*	3,32±0,1*
Реперфузия 12 часов n=11	41,13±*	3,72±1,9*
Реперфузия 24 часа n=10	46,4±2,3*	2,74±0,1*

Примечание: звёздочками отмечена достоверность различий показателей (p) по отношению к контрольной группе животных (*p≤0,05); n — количество животных

В результате проведенных экспериментальных исследований прослеживается закономерная динамика изменений показателей гемостаза. На этом фоне более существенные изменения выявлены при исследовании показателей гемостаза крыс с моделью РС (рис. 4). Нами установлено, что при 6-ти часовой ишемии отмечается достоверное повышение МНО, однако существенных изменений гемостаза не определяется. При присоединении 6-ти часового реперфузионного повреждения в показателях внешнего и внутреннего пути свертывания крови обнаруживаются существенные изменения. Отмечено достоверное повышение значения МНО и удлинение АЧТВ на 170% по сравнению с группой контроля. Также наблюдалось выраженное снижение содержания растворимых фибрин-мономерных комплексов — на 62% по сравнению с контролем. Кроме того, отмечено снижение уровня плазминогена на фоне уменьшения уровня антиплазмина крови крыс. Показанное удлинение АЧТВ свидетельствует об избыточном израсходовании факторов свертывания крови — гиперкоагуляции, что свя-

period up to 24 hours was characterized by a twice higher level of INR, a 5-times higher excess of aPTT and the preservation of an increased level of SFMC.

Table 2

Biochemical composition of blood in rats with experimental reperfusion syndrome

Group	Parameters	
	Creatinine mcml/l	Urea Mmol/l
Control n=15	43.66±2.2	3.94±0.2
Ischemia 6 hours n=12	45.4±2.3*	3.93±0.2*
Reperfusion 6 hours n=12	66.6±3.6*	3.32±0.1*
Reperfusion 12 hours n=11	41.13±*	3.72±1.9*
Reperfusion 24 hours n=10	46.4±2.3*	2.74±0.1*

Note: * — indicate the reliability of differences in data (p) in comparison with the control group of animals (*p≤0.05); n — the number of animals

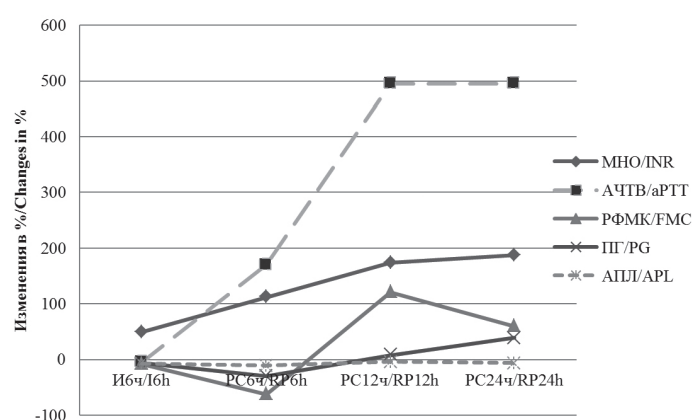


Fig. 4. Hemostatic parameters in modeling of reperfusion syndrome.

Note: I — ischemia, RS — reperfusion syndrome. INR- international normalized ratio, aPTT -activated partial thromboplastin time, APL — antiplasmin, PG — plasminogen, SFMC — soluble fibrin monomer complex

Analysis of the coagulation system dynamics indicates significant differences and assumptions for the phased hemostatic system reaction at different times of ischemia-reperfusion syndrome. Thus, in short-term, 6-hour, ischemia-reperfusion, there is an activation of blood clotting factors with a predominance of hypercoagulation, which can be explained by the systemic activation of plasma systems in response to acute stress damage. The prolongation of ischemia-reperfusion syndrome up to 12-24 hours leads to a change in hemostasis indicators towards hypocoagulation, which may be associated with the depletion of blood clotting factors and their circulation entry's reduction due to a decrease in kidney function in a case of damage.

Comparison of biochemical parameters of renal functions with disorders in the coagulation system indicates that in the blood coagulation system in a case of reperfusion syndrome, changes become profound. Apparently, the morphological changes of the kidneys during the first day of reperfusion syndrome are not yet catastrophic and are

зано с интенсивным образованием активного протромбиназного комплекса по внутреннему механизму гемостаза.

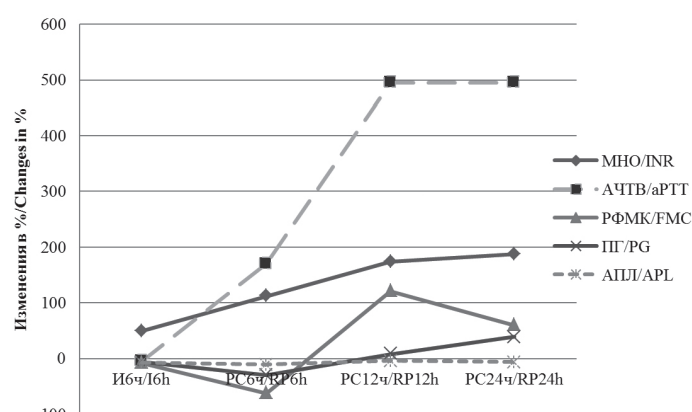


Рисунок 4. Показатели гемостаза при моделировании реперфузионного синдрома.

Примечание: И — ишемия, РС — реперфузионный синдром, АЧТВ активированное частичное тромбопластиновое время, РФМК растворимые фибриномономерные комплексы, ПГ плазминоген, МНО международное нормализованное отношение, АПЛ антиплазмин

При пролонгации реперфузионного периода до 12 часов продолжалось увеличение МНО, который почти в 2 раза превосходил контрольное значение, и удлинение АЧТВ достигало 5-кратного превышения контроля. Более интенсивное расщепление плазмином пептидных связей в фибрине и фибриногене сопровождалось накоплением продуктов деградации фибрина (фибриногена), которые увеличивались в 1,2 раза. Увеличение длительности реперфузионного периода до 24 часов характеризовалось в два раза более высоким уровнем МНО, пятикратным превышением АЧТВ и сохранением повышенного уровня РФМК.

Анализ динамики показателей свертывающей системы свидетельствует о значительных отличиях и стадийности в реакции системы гемостаза в разные сроки формирования синдрома ишемии-реперфузии. Так, при кратковременной, 6-часовой, ишемии-реперфузии наблюдается активация факторов свертывания крови с преобладанием гиперкоагуляции, что можно объяснить системной активацией плазменных систем в ответ на острое стрессовое повреждение. Увеличение длительности течения синдрома ишемии-реперфузии до 12-24 часов приводит к изменению показателей гемостаза в сторону гипокоагуляции, что, может быть связано с истощением факторов свертывания крови и уменьшением их поступления в системный кровоток из-за снижения функции почек в условиях повреждения.

Сопоставление биохимических показателей, характеризующих функцию почек, с нарушениями в системе гемостаза свидетельствует о том, что в свертывающей системе крови при развитии реперфузионного синдрома изменения носят более глубокий харак-

manifested only by the formation of trigger mechanisms of renal tissue damage, including the activation of apoptosis and the launch of proinflammatory damage pathways. These changes do not yet affect the functional activity of the kidneys completely. On the basis of this, it can be assumed that in reperfusion syndrome, disorders in the blood coagulation system with a potential threat of DIC syndrome are more associated with increased consumption of coagulation factors and to a lesser extent with inhibition of hemostatic renal function.

Conclusion

In the experimental studies of the pathogenetic mechanisms of systemic reperfusion syndrome during 6, 12 and 24 hours, it was found that the development of RS in renal tissue is characterized by cross-reactions of molecular and cellular interactions typically to inflammation. Deficiency of coagulation factors is considered one of the key pathogenetic mechanisms of hemostatic disorders. It occurs due to excessive consumption of these factors in the conditions of long-term coagulation cascade activation, as well as due to the inhibition of kidney synthetic function in prolonged load, and in its hypoxic and reperfusion damage.

тер. По всей видимости, морфологические изменения почек в течение первых суток развития реперфузионного синдрома еще не носят катастрофического характера и проявляются только формированием пусковых механизмов повреждения почечной ткани, включая активацию апоптоза и запуск провоспалительных путей повреждения. Эти изменения еще не сказываются в полной мере на функциональной активности почек. На основании этого можно полагать, что при реперфузионном синдроме нарушения в системе свертывания крови с потенциальной угрозой развития ДВС-синдрома в большей степени связаны с усилением потребления факторов свертывания и в меньшей мере с угнетением гемостатической функции почек.

Заключение

В ходе экспериментальных исследований патогенетических механизмов синдрома системной реперфузии в течение 6, 12 и 24 часов было установлено, что при развитии РС в ткани почек происходят реакции перекрестных молекулярных и клеточных взаимодействий, характерных для воспалительного процесса. Дефицит факторов коагуляции считается одним из ключевых патогенетических механизмов нарушений системы гемостаза. Он возникает вследствие чрезмерного потребления названных факторов в условиях длительной активации каскада коагуляции, а также из-за снижения синтетической функции почек при длительной их нагрузке, а также при ее гипоксическом и реперфузионном повреждении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мельник А. А. Система гемостаза и ее регуляция при нарушении функциональной способности почек. Почки. 2016; 3:57-75. DOI: 10.22141/2307-1257.3.17.2016.76541
2. Сократов Н.В. Патогенетические механизмы изменений системы гемостаза при заболеваниях почек (обзор литературы). Вестник Оренбургского государственного университета. 2005; 4: 97-103.
3. Pavord S., Myers B. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease // Blood Rev. 2011; 25: 271-278.
4. Gando, S., Levi, M., Toh, C. H. Disseminated intravascular coagulation. Nature Reviews Disease Primers. 2016;2:1603-1607.
5. Cohen, M. J., Call, M., Nelson, M., Calfee, C. S., Esmon, C. T., Brohi, K., et al. Critical role of activated protein C in early coagulopathy and later organ failure, infection and death in trauma patients. Annals of surgery. 2012; 255(2): 379–385.
6. Кубышкин, А. В., Пылаева, Н. Ю., Фомочкина, И. И., Писарев, А. А. Травма, гемостаз и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания: патогенетические механизмы нарушений гемокоагуляции. Клиническая патофизиология. 2016; 22(4): 104-117.
7. Thachil J. The Elusive Diagnosis of Disseminated

REFERENCES

1. Melnik A. A. Sistema gemostaza i ee reguljacija pri narushenii funkcional'noj sposobnosti pochk. Hemostatic system and its regulation in disorders of renal function. 2016; 3:57-75. DOI: 10.22141/2307-1257.3.17.2016.76541 (in Russ)
2. Sokratov N.V. Pathogenetic mechanisms of changes in the hemostatic system in kidney diseases (literature review). Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2005; 4: 97-103. (in Russ)
3. Pavord S., Myers B. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease // Blood Rev. 2011; 25: 271-278.
4. Gando, S., Levi, M., Toh, C. H. Disseminated intravascular coagulation. Nature Reviews Disease Primers. 2016;2:1603-1607.
5. Cohen, M. J., Call, M., Nelson, M., Calfee, C. S., Esmon, C. T., Brohi, K., et al. Critical role of activated protein C in early coagulopathy and later organ failure, infection and death in trauma patients. Annals of surgery. 2012; 255(2): 379–385.
6. Kubyshkin, A. V., Pylaeva, N. Ju., Fomochkina, I. I., Pisarev, A. A. Trauma, hemostasis and disseminated intravascular coagulation syndrome: pathogenic mechanisms of coagulation disorders. Klinicheskaja patofiziologija. 2016; 22(4): 104-117. (in Russ)

- Intravascular Coagulation: Does a Diagnosis of DIC Exist Anymore? *Semin. Thromb. Hemost.* 2019;45(1):100-107.
8. Yoshimura J, Yamakawa K, Kodate A, Kodate M, Fujimi S. Prognostic accuracy of different disseminated intravascular coagulation criteria in critically ill adult patients: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2018;8(12):e024878. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024878
9. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br. J. Haematol.* 2009;145(1):24-33.
10. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль, 2010: 344.
11. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание. Пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017: 336.
12. Конвенция Совета Европы о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, 1986: 37.
13. Кубышкин А.В., Харченко В.З., Семенец П.Ф., Алиев Л.Л., Фомочкина И.И., Анисимова Л.В. Методы определения активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и биологических жидкостях. К.: Изд-во КНМУ, 2010: 28.
14. Hanusz Z., Tarasinska J. Simulation Study on Improved Shapiro–Wilk Tests for Normality. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 2014; 43(9): 2093-2105. DOI: 10.1080/03610918.2013.844835.
15. Харченко В.З., Кубышкин А.В., Анисимова Л.В., Фомочкина И.И., Иванцова Н.Л., Жукова А.А. и др. Ингибиторы протеиназ и антиоксиданты в патогенетической терапии органопатологии при реперфузионном синдроме, осложненном кровопотерей. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2016; 7(2): 23-25.
16. Рекомендации по эвтаназии экспериментальных животных. Документ экспертной группы Европейской комиссии. Часть 1. Часть 2. 1996; 30: 293-316. 1997; 31: 1-32.
7. Thachil J. The Elusive Diagnosis of Disseminated Intravascular Coagulation: Does a Diagnosis of DIC Exist Anymore? *Semin. Thromb. Hemost.* 2019;45(1):100-107.
8. Yoshimura J, Yamakawa K, Kodate A, Kodate M, Fujimi S. Prognostic accuracy of different disseminated intravascular coagulation criteria in critically ill adult patients: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2018;8(12):e024878. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024878
9. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br. J. Haematol.* 2009;145(1):24-33.
10. Karkishchenko N.N., Gracheva S.V. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research. M.: Profil, 2010: 344. (in Russ.).
11. Guidelines for the maintenance and use of laboratory animals. Eighth Edition. Trans. from English under the editorship of I.V. Belozertseva, D.V. Blinova, M.S. Krasilshchikova. M.: IRBIS, 2017: 336. (in Russ.).
12. The Council of Europe Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments or for Other Scientific Purposes, 1986: 37. (in Russ.)
13. Kubyshekin A.V., Kharchenko V.Z., Semenets P.F., Aliev L.L., Fomochkina I.I., Anisimova L.V. Methods for determining the activity of nonspecific proteinases and their inhibitors in serum and biological fluids. K.: Izd-vo KNMU, 2010: 28. (in Russ.).
14. Hanusz Z., Tarasinska J. Simulation Study on Improved Shapiro–Wilk Tests for Normality. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 2014; 43(9): 2093-2105. DOI: 10.1080/03610918.2013.844835.
15. Kharchenko V.Z. Kubyshekin A.V., Anisimova L.V., Fomochkina I.I., Ivantsova N.L., Zhukova A.A. et al. Proteinase inhibitors and antioxidants in the pathogenic therapy of organopathology caused by reperfusion syndrome complicated with blood loss. *Krymskij zhurnal jeksperimental'noj i klinicheskoy mediciny – Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2016; 7(2): 23-25. (in Russ.).
16. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1, Part 2. *Laboratory Animals.* 1996; 30: 293-316. 1997; 31: 1-32 (in Russ.).

Авторы

Анисимова Людмила Васильевна

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей
и клинической патофизиологии
anisanislv@mail.ru

Писарев Анатолий Аркадьевич

Аспирант кафедры общей и клинической патофизио-
логии
anatolijpisarev2009@yandex.ru

Кубышкин Анатолий Владимирович

Доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой
общей и клинической патофизиологии
kubyshkin_av@mail.ru

Голубинская Елена Петровна

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры патоло-
гической анатомии с секционным курсом
missive@mail.ru

Шрамко Юлиана Ивановна

Кандидат биологических наук, доцент кафедры общей
и клинической патофизиологии
julianashramko@rambler.ru

Федеральное государственное автономное образо-
вательное учреждение высшего образования «Крым-
ский федеральный университет имени В.И. Вернад-
ского», Медицинская академия имени С.И. Георгиев-
ского (структурное подразделение)
295006, Российская Федерация, г. Симферополь, буль-
вар Ленина 5/7

Authors

Ludmila V. Anisimova

Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor Department of
General and Clinical Pathophysiology
anisanislv@mail.ru

Anatolii A. Pisarev

Graduate student Department of General and Clinical
Pathophysiology
anatolijpisarev2009@yandex.ru

Anatoliy V. Kubyshkin

Dr. Sci. (Med.), Professor head of Department of General
and Clinical Pathophysiology
kubyshkin_av@mail.ru

Elena P. Golubinskaya

Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor Department of
Pathological
missive@mail.ru

Yuliana. I. Shramko

Cand. Sci. (Biol.), Assistant Professor Department of
General and Clinical Pathophysiology
julianashramko@rambler.ru

V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Medical
Academy named after S.I. Georgievsky
5/7 Lenina bulvar Simferopol Republic of Crimea Russian
Federation 295006