

## ВЛИЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

© 2019 г. Н. В. Тюменцева<sup>1,2\*</sup>, Ю. С. Храмцова<sup>1,3</sup>, О. С. Арташян<sup>1,3</sup>, Р. К. Гафарова<sup>1</sup>

\*E-mail: tumen80@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» Екатеринбург, Россия;

<sup>3</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Поступила: 27.05.2019. Принята: 30.06.2019

Иммунная система играет важную роль в регуляции восстановительных процессов в разных тканях и органах, в том числе и печени. Изменение функционального состояния иммунной системы препаратом полиоксидоний при остром токсическом гепатите не снимает признаки токсического повреждения печени, при этом усиливается миграция лимфоцитов в этот орган. Препарат не оказал значимого положительного влияния на репаративную регенерацию печени, что, возможно, связано с недостаточно длительным или с отсроченным по времени с момента отравления введением препарата.

**Ключевые слова:** токсический гепатит, регенерация, четыреххлористый углерод, полиоксидоний

DOI: 10.31857/S102872210007275-7

**Адрес:** 620002 Екатеринбург, Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), Тюменцева Наталья Валерьевна.

Тел.: +7 922 606 74 49, (343) 374 00 70. E-mail: tumen80@mail.ru

**Авторы:**

**Тюменцева Н. В.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН; вед. науч. сотрудник центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия;

**Храмцова Ю. С.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Института иммунологии и физиологии» УрО РАН; доцент департамента биологии и фундаментальной медицины Уральского федерального университета, Екатеринбург, Россия;

**Арташян О. С.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Института иммунологии и физиологии» УрО РАН; доцент департамента биологии и фундаментальной медицины Уральского федерального университета, Екатеринбург, Россия;

**Гафарова Р. К.**, мл. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Института иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема регенерации тканей является одной из ключевых в биологии. Этот процесс обеспечивает тканевой гомеостаз в физиологических условиях и восстановление утраченных структур, нарушенных функций при повреждении. Чрезвычайно важна эта проблема и для медицины, поскольку большинство заболеваний в той или иной степени связаны с повреждением органов, а эффективность проводимой терапии определяется течением репаративных процессов.

В последние годы участились случаи токсического гепатита, связанные с употреблением спиртосодержащих жидкостей, в состав которых входят токсические вещества. Отравления протекают крайне тяжело с поражением печени, при этом отмечается высокая летальность. Недостаточная эффективность терапевтических мероприятий, используемых для лечения острого токсического гепатита, приводит к многочисленным осложнениям (циррозу, энцефа-

лопатии, панкреатиту, поражению почек) [1, 2]. Известно, что иммунная система принимает активное участие в процессах регенерации. Использование различных иммунокорректоров с целью влияния на процессы восстановления в терапии может стать принципиально новым методом лечения многих заболеваний, сопровождающихся повреждением структуры органов и тканей, в том числе и острого токсического гепатита [3].

**Цель исследования:** изучить влияние иммунной системы на регенераторные процессы печени при остром токсическом гепатите.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 19 беспородных крысах – самцах массой 200–300 г. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Для моделирования острого токсического гепатита использовали четыреххлористый углерод ( $CCl_4$ ). Затравку животных проводили однократно в дозе 50 мг/кг/сутки внутрибрюшинно. В дальнейшем выведение крыс из эксперимента осуществляли с помощью миорелаксанта ардуан (доза 0,08 мг/кг) и обезболивающего препарата кеторол (доза 8 мг/кг) на 1 и 3 сутки. Контролем служили интактные крысы, которые не подвергались воздействию гепатотропного яда.

Для изменения функционального состояния иммунной системы на фоне острого токсического гепатита в эксперименте был использован фармакологический препарат полиоксидоний, занесенный в Регистр лекарственных средств России и относящийся к группе иммуномодуляторов. Полиоксидоний вводили экспериментальным крысам однократно в дозе 0,1 мг/кг внутримышечно на вторые сутки после затравки четыреххлористым углеродом. Животных выводили из эксперимента через 1 сутки, при этом проводили забор крови и печени.

Для анализа периферической крови проводили забор крови из хвостовой вены крысы и исследовали её с помощью гематологического анализатора Celly 70 (Biocode Nucel, Франция). Для биохимического анализа крови использовали автоматизированный биохимический анализатор Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

Для гистологических исследований кусочки печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После стандартной проводки

делали срезы толщиной 3–5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили патоморфологическое и морфометрическое исследования препаратов печени с подсчетом следующих показателей: размер гепатоцитов, размер ядер гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество гепатоцитов на 1 мм<sup>2</sup>, митотический индекс, количество двуядерных клеток на 1000 гепатоцитов.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием непараметрических методов статистики («Statistica 6.0»). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Общеклиническое исследование крови после введения гепатотропного яда свидетельствует о наличии острого воспалительного процесса в организме экспериментальных животных. Этот процесс характеризуется повышением количества гранулоцитов и СОЭ. Со стороны «красной крови» никаких изменений не наблюдается. Вероятно,  $CCl_4$  на эритроциты не оказывает токсического действия. В тоже время отмечены изменения со стороны системы свертывания крови. Спустя 1 сутки после затравки  $CCl_4$  отмечается достоверное повышение среднего объема тромбоцитов. Этот показатель связан с функциональной активностью тромбоцитов, и, возможно, его повышение может свидетельствовать о кровоизлияниях в организме (Табл. 1).

Наличие острого токсического гепатита подтверждается также биохимическими исследованиями крови. Происходит увеличение уровня АСТ уже на первые сутки после воздействия гепатотропного яда. Белково-синтетическая функция не страдает, так как количество общего белка и альбумина (белок синтезируемый клетками печени) не изменяется по сравнению с интактными животными. Уровень щелочной фосфатазы, которая является ферментом паренхимы печени, также не меняется на все сроки наблюдения. Анализ биохимических показателей выявил, что происходит поражение не только печеночных структур, но и так же клеток поджелудочной железы, о чем свидетельствует увеличение уровня глюкозы на третьи сутки и амилазы на все сроки исследования. Отмечается резкий рост концентрации мочевины и креатинина на первые сутки после затравки, что свидетельствует о токсическом влиянии  $CCl_4$  на почки (Табл. 2).

**Таблица 1.** Показатели периферической крови крыс на разные сроки после затравки  $\text{CCL}_4$  (50 мг/кг) и после введения полиоксидония (0,1 мг/кг)

Показатели	Интактные животные (n=10)	Через 1 сутки (n=3)	Через 3 суток (n=3)	Через 3 суток + полиоксидоний (n=3)
Общее количество лейкоцитов, Г/л	9,91±1,35	11,67±3,93	12,53±1,67	11,37±2,79
Количество лимфоцитов, Г/л	8,22±1,23	8,80±3,42	10,1±1,16	9,57±2,03
Количество средних клеток, Г/л	1,33±0,2	1,73±0,57	1,3±0,2	1,2±0,42
Количество гранулоцитов, Г/л	0,36±0,09	1,13±0,18*	1,13±0,49	0,6±0,4
Количество эритроцитов, Т/л	8,71±0,34	8,11±0,65	8,42±0,27	8,49±0,44
Гемоглобин, г/дл	15,04±0,6	14,63±0,93	15±0,38	14,57±0,9
Гематокрит, %	44,93±1,55	44±3,12	43,5±1,5	42,93±2,3
Средний объем эритроцита, фл	51,69±0,56	54,37±1,20	51,6±0,6	50,6±0,12**
Общее кол-во тромбоцитов, Г/л	635,9±95,27	717,67±68,41	813,3±50,52	463±112,71**
Тромбокрит, %	0,39±0,06	0,49±0,05	0,54±0,06	0,30±0,08**
Средний объем тромбоцитов, фл	6,05±0,18	6,73±0,12*	6,57±0,32	6,43±0,3
СОЭ, мм/час	0,48±0,1	1±0,29*	2±0,58*	1,17±0,17*

**Примечание:** \* – данные достоверны по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни); \*\* – данные достоверны по сравнению с 3-ми сутками ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

**Таблица 2.** Биохимические показатели крови крыс на разные сроки после затравки  $\text{CCL}_4$  (50 мг/кг) и после введения полиоксидония (0,1 мг/кг)

Показатели	Интактные животные (n=10)	Через 1 сутки (n=3)	Через 3 суток (n=3)	Через 3 суток + полиоксидоний (n=3)
Общий белок, г/л	64,13±7,04	63,2±3,09	71,17±0,5	74,07±2,56
Глюкоза, ммоль/л	6,67±0,38	7,16±0,37	9,08±1,08*	7,36±0,22 **
Креатинин, ммоль/л	0,07±0,01	0,2±0,08*	0,06±0,01	0,03±0,003**
Мочевина, ммоль/л	3,77±0,74	11,73±0,98*	4,2±1,48	3,76±0,08
АСТ, МЕ/л	77,96±27,3	144,1±17,5*	132,6±9,28*	138,83±3,56*
АЛТ, МЕ/л	79,34±15,17	80,1±3,81	97,07±6,63	105,77±22,21
Билир. общий, мкмоль/л	2,77±0,5	3,5±0,49	1,47±0,2	2,03±0,38
Амилаза, МЕ/л	413,39±132,61	3054,1±452,6*	2026±95,27*	2984,9±133,91 *,**
Альбумин, г/л	38,12±0,95	35,20±1,93	38,17±0,82	43,54±0,86 *,**
Щел. фосфатаза, МЕ/л	849,92±89,34	872,97±213,2	741,37±38,58	279,03±28,57 *,**

**Примечание:** \* – данные достоверны по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни); \*\* – данные достоверны по сравнению с 3-ми сутками ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

Острый токсический гепатит развивается уже на 1 сутки после введения  $\text{CCL}_4$ . Морфологическое исследование препаратов печени указывает на диффузную зернисто-вакуольную дистрофию гепатоцитов. Отмечаются очаговые некро-

зы паренхимы и миграция в эту зону полиморфноядерных лейкоцитов. Некрозы локализованы преимущественно под капсулой по периферии органа. В ответ на повреждение обнаруживается реакция со стороны сосудов микроциркулятор-

**Таблица 3.** Гистологические показатели печени крыс на разные сроки после затравки CCL<sub>4</sub> (50 мг/кг) и после введения полиоксидония (0,1 мг/кг)

Показатели	Интактные животные (n=10)	Через 1 сутки (n=3)	Через 3 суток (n=3)	Через 3 суток + полиоксидоний (n=3)
Количество гепатоцитов на 1 мм <sup>2</sup>	2318±71	3787,8±326,43*	1964±88,8 *	1898,1±44,13
Размер гепатоцитов, мкм	22,85±0,39	15,96±0,66*	17,82±0,92*	19,12±0,86*,**
Размер ядра гепатоцитов, мкм	6,28±0,12	6,11±0,26	6,84±0,28	6,81±0,15
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,27±0,006	0,38±0,02*	0,38±0,009*	0,356±0,008*,**
Митотический индекс, %	0,52±0,33	24,82±5,07*	3±0,57 *	3,33±1,45
Количество двуядерных клеток, %	15,4±1,43	124,4±19,9*	52±1,15*	33±10,15 *,**

**Примечание:** \* – данные достоверны по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни); \*\* – данные достоверны по сравнению с 3-ми сутками ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

ного русла в виде полнокровия синусоидальных капилляров, также выражен капилляростаз вен портальных трактов и части центральных вен долек, наблюдается интерстициальный отек. К 3-м суткам патоморфологическая картина печени не меняется.

При морфометрическом исследовании срезов печени уже на первые сутки после затравки животных наблюдается увеличение количества гепатоцитов на единицу площади (1 мм<sup>2</sup>) за счет уменьшения их размеров, хотя на 3 сутки число гепатоцитов снижается. Ядерно-цитоплазматический индекс на 1 и 3 сутки достоверно повышен, при этом размер ядра гепатоцитов остается на том же уровне, что и у интактных животных. При оценке регенераторных процессов печени крыс установлено, что CCL<sub>4</sub> влияет как на внутриклеточную, так и на клеточную регенерацию, о чём свидетельствует достоверное повышение числа митозов и количества двуядерных клеток на все сроки наблюдения (Табл. 3).

После активации иммунной системы у животных с признаками острого токсического гепатита наблюдаются изменения со стороны клеток красной крови и системы свертывания крови. Происходит уменьшение среднего объема эритроцитов, что свидетельствует о гипертоническом характере нарушений водно-электролитного баланса в организме, достоверное снижение количества тромбоцитов и тромбокрита до уровня интактных животных. В то же время показатель СОЭ остается высоким, что указывает на наличие воспалительного процесса в организме (Табл. 1).

Биохимические исследования крови после иммунокоррекции у животных на фоне острого

токсического гепатита выявили, что при неизменном количестве общего белка происходит незначительное увеличение альбумина. О наличии пораженных гепатоцитов можно судить по уровню щелочной фосфатазы. После введения полиоксидония ее уровень достоверно уменьшается, что свидетельствует о деструктивных процессах, продолжающихся в печени. Остаются на достаточном высоком уровне АСТ и АЛТ. Наблюдается значительное повышение амилазы, которое свидетельствует о дальнейшем возможном поражении клеток поджелудочной железы. Хотя, при этом уровень глюкозы снижается до значений интактных животных. Происходит достоверное снижение уровня креатинина, что свидетельствует о проблемах в белковом обмене всего организма (Табл. 2).

Патоморфологическое описание препаратов печени, полученных после изменения функциональной активности иммунной системы при остром токсическом гепатите, свидетельствует, что балочное строение печени сохраняется. Интерстициальный отек остается умеренно выраженным. Под капсулой определяются вакуолизированные гепатоциты с признаками зернистой дистрофии, но в центре долек гепатоциты неизменены. В части портальных трактов перипортально наблюдаются в небольшом количестве лимфоциты. Вены портальных трактов остаются полнокровными.

Морфометрическое исследование срезов печени животных после стимуляции иммунной системы полиоксидонием при токсическом гепатите выявило тенденцию к снижению количества гепатоцитов на единицу площади (1 мм<sup>2</sup>), при этом размер клеток печени достоверно уве-

личивается, а ядерно-цитоплазматический индекс снижается, по сравнению с 3-ми сутками эксперимента, хотя эти показатели не достигают уровня интактных животных. На высоком уровне, по сравнению с контролем, остаются показатели, касающиеся оценки регенераторного процесса, количество митозов и число двуядерных клеток, но наблюдается достоверное снижение количества двуядерных клеток (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Четыреххлористый углерод относится к группе хлорированных углеводов, широко применяющихся в качестве растворителей во многих отраслях производства. Органом, наиболее подверженным воздействию четыреххлористого углерода при его вдыхании или потреблении внутрь в повышенных концентрациях является печень. При этом наблюдаются такие явления, как интенсивное накопление жиров и увеличение печени, а в более тяжелых случаях — повреждение или разрушение гепатоцитов, что может привести к нарушению ее функционирования [4]. Это подтверждается и нашими экспериментальными исследованиями, в которых введение  $CCl_4$  вызывает картину острого токсического гепатита уже на 1 сутки и характеризуется очаговыми некрозами паренхимы печени, локализованными преимущественно под капсулой по периферии органа. Такая локализация повреждений возможна из-за внутрибрюшинного введения гепатотропного яда. Также в ответ на повреждение развивается реакция со стороны микроциркуляторного русла.

В условиях острого токсического гепатита наряду с деструктивными процессами в печени, наблюдаются и репаративные. Печень относится к тканям, для которых характерен как клеточный, так и внутриклеточный типы регенерации. При оценке регенераторных процессов печени экспериментальных крыс установлено достоверное повышение числа митозов, количества клеток на единицу площади препарата, числа двуядерных клеток. При этом преобладают внутриклеточные восстановительные процессы. Полного восстановления структуры ткани печени к 3 суткам не происходит.

Используемый гепатотропный яд оказывает выраженное токсическое действие не только на печень, но и на весь организм в целом. Доказательством этого служит возрастание активности амилазы и уровня глюкозы в крови, а также рост концентрации мочевины и креатинина, что ве-

роятно связано с токсическим действием  $CCl_4$  на поджелудочную железу и почки. Показатель СОЭ указывает на наличие воспалительного процесса в организме на все сроки наблюдения.

Известно, что иммунная система играет важную роль в регуляции восстановительных процессов в разных тканях и органах. Изменяя ее функциональное состояние, например, с помощью иммунокорректоров, возможно целенаправленное влияние на процессы регенерации. В данных экспериментальных исследованиях использовали иммуномодулятор полиоксидоний, который оказывает влияние на все клетки иммунной системы, обладает выраженным детоксицирующим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим действием. Кроме того, полиоксидоний влияет на процессы восстановления поврежденной печени, активизируя внутриклеточную форму регенерации и усиливая лимфоцитарную инфильтрацию в органе [5].

При стимуляции иммунной системы полиоксидонием признаки острого токсического гепатита сохраняются, при этом усиливается миграция лимфоцитов в печень. Продолжается активное протекание репаративных процессов за счет клеточной и внутриклеточной регенерации. Биохимический анализ крови свидетельствует о незначительном положительном влиянии препарата на работу поджелудочной железы, но в отношении печени и почек такой тенденции не наблюдается.

Таким образом, стимуляция всех звеньев иммунной системы с помощью препарата полиоксидоний не оказала значимого положительного влияния на репаративную регенерацию печени, что, возможно, связано с недостаточно длительным или с отсроченным по времени с момента отравления введением препарата.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сенцов В. Г., Данилова И. Г., Медведева С. Ю., Гетте И. Ф., Крохина Н. Б. Влияние макрофагального звена иммунной системы на морфо-функциональное состояние печени на ранних этапах формирования токсического гепатита у крыс. Вестник Уральской медицинской академической науки 2009, 2(25), 300–302. [Sentsov V. G., Danilova I. G., Medvedeva S. Yu., Goethe I. F., Krokhina N. B. Influence of the macrophages of the immune system on the morpho-functional state of the liver in the early stages of the

- formation of toxic the hepatitis in rats. Journal of Ural Medical Academic Science 2009, 2(25), 300–302.]
2. *Медведева С. Ю., Гетте И. Ф., Данилова И. Г., Сенцов В. Г.* Оценка токсического действия полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. Токсикологический вестник 2012, 2(113), 52–55. [*Medvedeva S. Yu., Goethe I. F., Danilova I. G., Sentsov V. G.* Evaluation of the toxic effect of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride. Toxicological Review 2012, 2(113), 52–55.]
  3. Хаитов Р. М., Пинегин Б. П. Современные иммуномодуляторы: Основные принципы их применения. Иммунология 2000, 5, 4–7. [*Khaitov R. M., Pinegin B. P.* Modern immunomodulators: Basic principles of their application. Immunology 2000, 5, 4–7.]
  4. *Проскурякова И. С.* Морфофункциональные аспекты регенерации печени при экспериментальной коррекции токсического гепатита. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1995, 6, 656–659. [*Proskuryakova I. S.* Morphofunctional aspects of liver regeneration in experimental correction of toxic hepatitis. Bulletin of experimental biology and medicine 1995, 6, 656–659.]
  5. *Черешнев В. А., Юшков Б. Г., Данилова И. Г., Черешнева М. В., Храмова Ю. С., Чиши М. А., Арташян О. С.* Влияние полиоксидония и тамерита на регенераторные процессы в тканях с различной восстановительной способностью. Иммунология 2005, 4, 198–200. [*Chereshnev V. A., Yushkov B. G., Danilova I. G., Chereshneva M. V., Khramtsova Yu. S., Chishi M. A., Artashjan O. S.* Polyoxidonium and Tamerit influence on the regenerator processes in tissues with different recovery. Immunology 2005, 4, 198–200.]

## THE EFFECT OF THE IMMUNE SYSTEM ON REGENERATIVE PROCESSES OF THE LIVER IN ACUTE TOXIC HEPATITIS

© 2019 N. V. Tyumentseva<sup>1,2\*</sup>, Y. S. Khramtsova<sup>1,3</sup>, O. S. Artashyan<sup>1,3</sup>,  
R. K. Gafarova<sup>1</sup>

\*E-mail: tumen80@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology, UB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>Institute of medical cell technology, Ekaterinburg, Russia;

<sup>3</sup>Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

Received: 27.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The immune system plays an important role in the regulation of recovery processes in different tissues and organs, including the liver. Changing the functional state of the immune system with Azoximeri bromidum in acute toxic hepatitis does not remove the signs of toxic damage to the liver, while increasing the migration of lymphocytes to this organ. The drug did not have a significant positive effect on the reparative regeneration of the liver, which may be due to the insufficiently long or delayed in time from the moment of poisoning the drug administration.

*Key words:* toxic hepatitis, regeneration, carbon tetrachloride, Azoximeri bromidum

### Authors:

**Tyumentseva N. V.**, ☒ PhD, senior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

620002 Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences.

Phone: +79226067449, (343)374 00 70. E-mail: tumen80@mail.ru

**Khramtsova Y. S.**, PhD, senior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

**Artashyan O. S.**, PhD, senior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

**Gafarova R. K.**, junior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia.