

На правах рукописи

Старателева Юлия Андреевна

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ
ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТА ПЧЕЛИНОГО МАТОЧНОГО МОЛОЧКА И
ПРОПОЛИСА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОТЕКА ЛЕГКИХ

03.03.01. – физиология

Автореферат
диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2010

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Крылов Василий Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Бирюкова Ольга Вениаминовна

доктор биологических наук
Копытова Татьяна Викторовна

Ведущая организация:

ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

Защита состоится «_____» _____ 2010 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15. при Нижегородском государственном университете им. Н.И.Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр.Гагарина, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н., доцент

Копылова С.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последнее время нарушения функции легких стали серьезной медико-социальной проблемой из-за вызываемого ими высокого уровня заболеваемости, инвалидности и смертности. Респираторными заболеваниями страдают люди самого разного возраста - дети, люди среднего и пожилого возраста. Процент людей, имеющих ту или иную патологию легких, интенсивно растет. Соответственно, существует проблема эффективного лечения респираторных заболеваний, поскольку применяемые сегодня синтетические средства и антибиотики, наряду с недостаточной эффективностью, вызывают множество отрицательных побочных явлений. В связи с этим актуальными становятся исследования физиологически активных природных соединений, в том числе продуктов пчеловодства. Установлено, что такие продукты, как прополис, маточное молочко пчел оказывают широкий спектр действия на организм, обладая противомикробным, противовоспалительным, биостимулирующим, анестезирующим действием (Вахонина, 1992; Хисматуллина, 2005; Крылов и др., 2007). На основании накопленного опыта по применению продуктов пчеловодства в терапии бронхо-легочных заболеваний, установлено, что наиболее целесообразным в подобных случаях является комплексное использование прополиса с маточным молочком. В соответствии с этим, на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, был разработан препарат (патент «Средство для ингаляции, обладающее бронхорасширяющим действием» с приоритетом от 15.09.2000; №2174002), представляющий водно-спиртовую суспензию пчелиного маточного молочка и прополиса. Авторы полагают, что наиболее приемлемой лекарственной формой такого препарата может быть ингаляционная форма. Неоспоримое преимущество ингаляций заключается, прежде всего, в том, что лекарственное средство для лечения и профилактики бронхо-легочных заболеваний поступает и концентрируется именно там, где оно должно оказать максимальное воздействие – в слизистых оболочках дыхательных путей и альвеолах. При этом всасывание препарата через слизистые оболочки дыхательных путей происходит во много раз быстрее, чем через желудочно-кишечный тракт при приеме таблетированных форм (Эйдельштейн, 1967; Княжеская, 2006; Крылов и др., 2007). Кроме того, при ингаляционной терапии не происходит снижения активности препарата в печени и лекарственные вещества остаются в неизменном виде, что повышает их эффективность (Крылов, Сокольский, 2000; Крылов и др., 2007).

Вышеизложенное открывает перспективу успешного применения ингаляционных апипрепаратов не только в терапии бронхо-легочных заболеваний, но и при лечении некоторых других видов патологии. Однако для физиологического обоснования этого применения необходимо изучить

механизмы корректирующего действия, как прополиса, так и маточного молочка, а так же препаратов на их основе в виде ингаляционной формы.

Известно, что лекарственное средство в виде аэрозоля при вдыхании оказывает не только местное действие, равномерно распределяясь по всей поверхности дыхательных путей, но и общее – легко всасываясь и попадая в кровоток, воздействуя тем самым на весь организм в целом. При этом наиболее важным посредником между мишенями организма и всосавшимися веществами является система крови. Учитывая, что кровь является одним из важнейших интегрирующих систем регуляции функций организма, ее изменения при ингаляции фармакологических препаратов могут выявить ряд механизмов их эффективности при альтерации функций дыхательной системы организма.

Вышеизложенное послужило основанием для выбора цели диссертации.

Часть работы выполнена в рамках реализации программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК П604).

Цель работы: исследование системы крови крыс при ингаляционном введении препарата пчелиного маточного молочка и прополиса («Апингалин») в условиях моделирования отека легких.

Для достижения указанной цели решались **следующие задачи:**

1. изучить гистологическую картину тканей легких крыс в норме, при моделировании адреналового отека и при ингаляции препарата «Апингалин»;
2. исследовать действие ингаляций препарата на морфо-функциональное состояние крови крыс при отеке легких:
 - на морфологические показатели крови;
 - на реологические свойства крови;
 - на фосфолипидный спектр эритроцитарных мембран.
3. исследовать влияние курсовой ингаляции препарата «Апингалин» на функциональные характеристики тромбоцитов и систему свертывания крови крыс на фоне отека легких.

Научная новизна

В работе впервые проведено комплексное исследование динамики изменений морфо-функциональных и структурных свойств эритроцитов, функциональных характеристик тромбоцитов и активности свертывающей системы крови при ингаляции препарата «Апингалин» в условиях адреналового отека легких. Показано, что препарат уменьшает повреждающее действие альтерирующего фактора: нормализует морфологические показатели крови, восстанавливает функциональную активность эритроцитов, улучшает реологию крови, восстанавливает фосфолипидный спектр эритроцитарных мембран, способствует нормализации адгезивных и агрегационных свойств тромбоцитов, обеспечивает улучшение процесса свертывания крови и фибринолиза.

Научно-практическая значимость

Полученные результаты по влиянию препарата «Апингалин» на морфо-функциональное состояние и структурные свойства эритроцитов, функциональные характеристики тромбоцитов, процессы свертывания и фибринолитическую активность крови крыс в условиях адrenaлового отека легких вскрывают ряд механизмов корригирующего действия прополиса и маточного молочка, входящих в состав препарата, при альтерации функций органов дыхания. Это может расширить представления о закономерностях взаимодействия природных физиологически активных соединений как факторов окружающей среды с высшими организмами, а также служить обоснованием для внедрения препарата в практическую медицину для терапии и профилактики бронхо-легочных заболеваний.

Апробация работы

Основные положения доложены на XV, XVI Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2008, 2009» (Москва, 2008, 2009); 13-й Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2008); Международной научно-практической конференции «Инновации в пчеловодстве» (Адлер, 2008); 9-й научно-практической конференции «Интермед», (Москва, 2009); III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия» (Нижний Новгород, 2010); XXI съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010).

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на __ страницах машинописного текста, иллюстрированы __ таблицами и __ рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего ___ источников, из которых ___ на русском и ___ на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены на 315 белых крысах, самцах, массой 150-180 г.

На каждом этапе исследований животные были разделены на 3 группы. К первой – интактной - группе относились животные без какого-либо вмешательства. Крысам второй – контрольной - группы воспроизводили адrenaловый отек легких, который был выбран в качестве альтерирующего фактора (Попов, Тополянский, 1975). Для этого животным внутрибрюшинно вводили адrenaлин в дозе 0,5 мг/кг. Через 10-15 минут визуально наблюдали признаки отека - изменения поведения и вегетативного статуса, значительное учащение дыхания. Животным третьей – опытной - группы моделировали отек легких, а затем в течение

10 дней по 10 минут ингалировали препаратом «Апингалин». Ингаляции осуществлялись при помощи ультразвукового ингалятора ИУП – 01М. Кровь для анализа брали из подъязычной вены у наркотизированных крыс.

Распределение материала по этапам исследований представлено в таблице 1.

Таблица 1

Этапы исследований	Исследуемые показатели	Количество животных
1. Исследование гистологической картины тканей легких крыс в норме, при моделировании адреналового отека и при ингаляции препарата «Апингалин»	гистология тканей легких	30
2. Исследование действия ингаляций препарата на морфо-функциональное и структурное состояние крови	количество эритроцитов, содержание гемоглобина, количество ретикулоцитов, ЭФПЭ, агрегация эритроцитов, СОЭ, деформируемость эритроцитов, вязкость крови, сорбционная способность эритроцитов, фосфолипиды эритроцитов	225
3. Исследование влияния препарата «Апингалин» на функциональные характеристики тромбоцитов и систему свертывания крови	количество тромбоцитов, адгезивность тромбоцитов, агрегация тромбоцитов; начало, конец, продолжительность свертывания крови, начало ретракции и фибринолиза, время существования плотного сгустка	60

В работе использовались стандартные лабораторные методы анализа: метод гистологического исследования легких (Артишевский, 1999); фотометрический метод определения количества эритроцитов и содержания гемоглобина в крови; подсчет количества ретикулоцитов в мазке крови при окраске бриллиантовым крезильным синим (Меньшиков, 1987); определение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) методом микроэлектрофореза (Харамоненко, Ракитянская, 1974);

определение агрегации эритроцитов методом подсчета одиночных эритроцитов в камере Горяева (Ашкинази, 1977); методы определения скорости оседания эритроцитов (СОЭ) (Меньшиков, 1987); индекса деформируемости (ИД) эритроцитов; сорбционной способности эритроцитов (ССЭ) (Пустовалова, 1999); определение вязкости крови с помощью гемовискозиметра ВК – 4; выделение и фракционирование фосфолипидов (ФЛ) мембран по методу Folch et al. (1957); метод подсчета тромбоцитов в мазках крови (Смирнова, 1995); определение адгезивности тромбоцитов (Перлик, 1989); экспресс-метод визуальной оценки агрегации тромбоцитов на предметном стекле (Берковский, 2002); исследование коагулограммы (Смирнова, 1995).

Результаты исследований обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента (с поправкой Бонферрони). Обработку данных осуществляли на персональном компьютере с помощью программы BIOSTAT.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

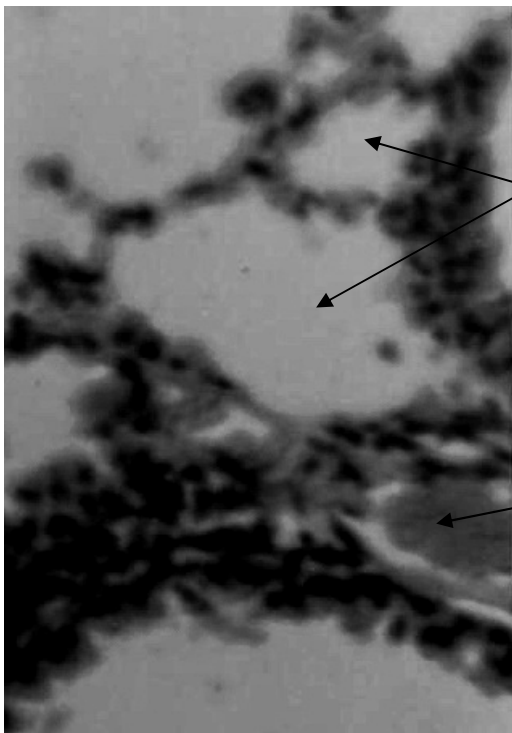
Действие курсовой ингаляции препарата «Апингалин» на гистологическую картину тканей легких при адrenaловом отеке у крыс

На первом этапе исследований на гистологических срезах тканей легких (на уровне бронхов) крыс интактной группы патологических изменений легочной ткани не обнаружено: в альвеолах и сосудах повреждений не наблюдалось; эритроциты в ткани и альвеолах, а так же отечная жидкость в патологических количествах отсутствовали (рис.1).

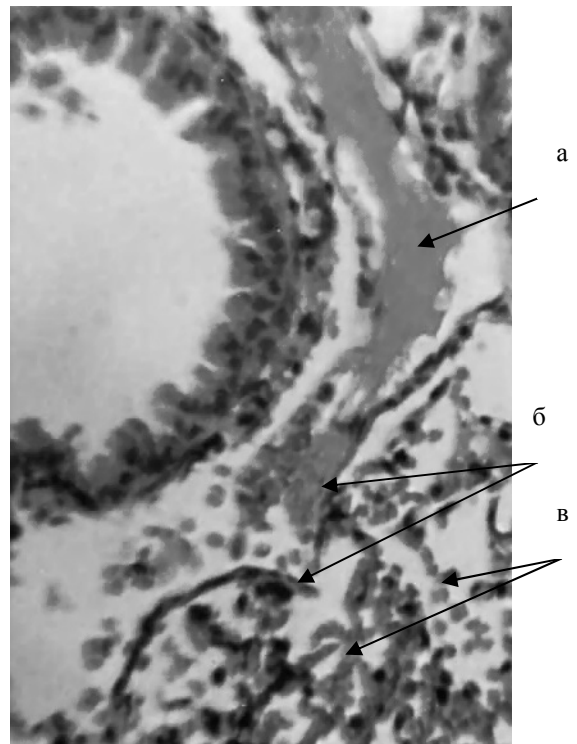
После исследования гистологических срезов тканей легких крыс контрольной группы были выявлены типичные критерии отека. Межалвеолярные перегородки были резко утолщены за счет интерстициального отека. Наблюдалось появление отечной жидкости в альвеолах, что свидетельствует о наличии альвеолярного отека (Гриппи, 2005). В просветах сосудов появились агрегаты эритроцитов в виде «монетных столбиков», что является патологическим явлением, повышающим вязкость крови. Кроме того, были обнаружены эритроциты, вышедшие в просвет альвеол вследствие нарушения целостности капилляров и ткани легкого (рис. 1). Все это свидетельствует о том, что наряду с легочной тканью в патологический процесс вовлечена и система крови.

Таким образом, исследование гистологических срезов легких позволило выявить наличие острого альвеолярного отека легких у крыс контрольной группы, и показало, что развитие патологического процесса сопровождается изменениями картины кровотока.

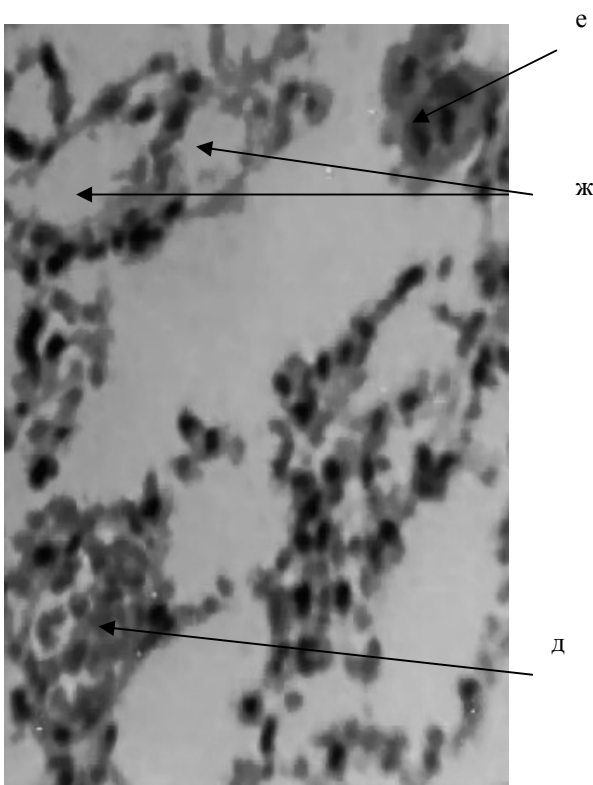
После десятидневной ингаляции крыс препаратом «Апингалин» произошло заметное улучшение гистологической картины легочной ткани. Наблюдалось значительное снижение содержания жидкости в альвеолах и окружающей их ткани. Практически отсутствовали в ткани вышедшие из капилляров эритроциты. На срезах сосудов почти не обнаруживались эритроцитарные агрегаты (рис. 1).



I



II



III

Рис 1. Гистологические срезы тканей легких крыс (x128, окрашивание гематоксилин-эозином): I – интактная группа, II – контрольная группа, III – опытная группа; а – жидкость в альвеолах, б – разрушенные стенки капилляра и альвеолы; в – агрегаты эритроцитов; г – чистые альвеолы; д – капилляр со свободными эритроцитами, е – макрофаги, ж – восстановленные альвеолы.

В просветах альвеол наблюдались макрофаги, что является отражением завершения воспалительного процесса. Характерной особенностью макрофагов было наличие темноокрашенных включений – фагосом с поглощенным материалом (вышедших в ткань и альвеолы белков, остатков разрушенной ткани и т.д.).

Кроме того, немаловажную роль играет величина частиц аэрозоля - до 5 мкм, благодаря чему они в неизменном виде проникают в альвеолы и оказывают непосредственное фармакологическое действие на слизистую оболочку бронхов и альвеол.

Таким образом, курсовая ингаляция препарата «Апингалин», приготовленного на основе природных продуктов – маточного молочка и прополиса, приводит к значительному восстановлению тканей легкого и сосудов и уменьшает патологические изменения в системе кровотока.

Влияние «Апингалина» на морфо-функциональное состояние эритроцитов и фосфолипидный спектр их мембран

На втором этапе исследования были изучены изменения морфо-функциональных свойств и фосфолипидного спектра эритроцитов крыс в условиях адреналового отека легких и после курсовой ингаляции «Апингалином». В ходе эксперимента было установлено, что через 10 дней после моделирования отека легких общее количество эритроцитов в крови крыс контрольной группы снизилось на 18%, содержание гемоглобина - на 16% (табл.2) по сравнению с группой «интактные животные» ($p < 0,05$). При этом количество ретикулоцитов уменьшилось на 53,2% (табл.2).

Ингаляционная терапия животных препаратом «Апингалин» привела к нормализации изученных параметров. Общее количество эритроцитов в крови крыс увеличилось на 43%, содержание гемоглобина повысилось на 40% (рис.2) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Вместе с тем наблюдалось достоверное повышение количества ретикулоцитов в крови крыс - на 66% по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Подобный эффект может быть связан со способностью маточного молочка и прополиса стимулировать эритропоэз и влиять на синтез белков, в том числе гемоглобина.

Таким образом, курсовая ингаляция препарата маточного молочка и прополиса способствовала улучшению морфологических характеристик крови крыс.

Влияние препарата «Апингалин» на морфологические свойства крови крыс при отеке легких

Показатели	Группы животных		
	Интактная группа (n=10)	Контрольная группа (n=10)	Опытная группа (n=10)
Количество эритроцитов, 10^6 /мкл	6,90 ± 0,21	5,65 ± 0,15*	8,63 ± 0,13*"
Содержание гемоглобина, г%	13,40±0,10	11,26 ± 0,12*	16,62±0,35*"
Количество ретикулоцитов, ‰	6,40 ± 0,13	3,00 ± 0,09*	7,2 ± 0,21*"

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); " - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Наряду с морфологическими свойствами важно исследовать функциональное состояние крови, одной из главных характеристик которого является ЭФП эритроцитов. Она позволяет оценить не только электрокинетический потенциал и, следовательно, физико-химические характеристики поверхностной мембраны клеток, но и состояние гомеостаза организма в целом (Крылов и др., 2009). В связи с этим было проведено исследование ЭФП эритроцитов, которое показало, что развитие у крыс отека легких сопровождалось снижением ЭФП на 15% (рис.2) относительно интактных животных ($p < 0,05$). Курсовая ингаляция крыс препаратом «Апингалин» способствовала увеличению ЭФП эритроцитов на 25% (рис.2) по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об улучшении функциональной активности клеток.

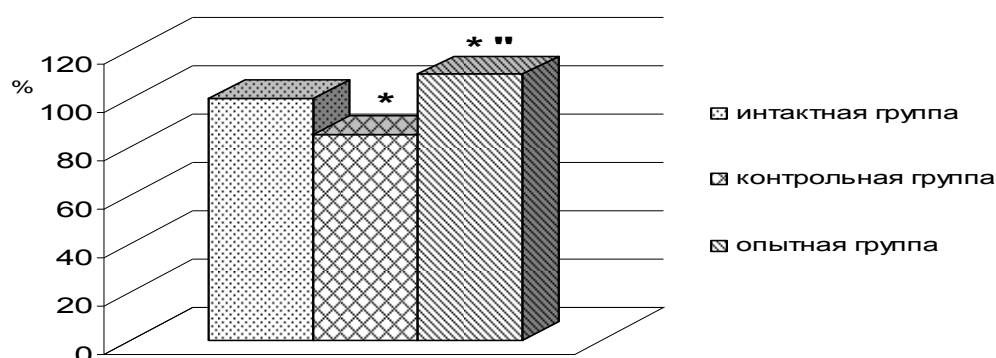


Рис.2 Влияние препарата маточного молочка и прополиса на ЭФП эритроцитов крыс на фоне адреналового отека легких

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); " - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Известно, что ЭФП тесно взаимосвязана с реологическими показателями крови. Это было подтверждено и в наших опытах. Так, у крыс контрольной группы наблюдалось достоверное повышение агрегационной способности эритроцитов на 16,5%, увеличение СОЭ на 65,8% и уменьшение ИД на 12,1% по сравнению с интактной группой. Указанные изменения реологических параметров, очевидно, явились причиной повышения вязкости крови на 21% относительно здоровых животных (табл.3).

После ингаляционной терапии крыс препаратом маточного молочка и прополиса агрегационная активность эритроцитов уменьшилась на 21,5% относительно контрольной группы ($p < 0,05$), при этом СОЭ снизилась на 65% по сравнению с отеком ($p < 0,05$) и достигла уровня нормальных значений ($p > 0,05$). В то же время было выявлено достоверное повышение ИД на 26% по сравнению контрольной группой животных. При этом вязкость крови снизилась на 15,6% относительно отека ($p < 0,05$) и приблизилась к уровню интактных животных. По всей видимости, нормализация реологических свойств обусловила улучшение вязкости крови и восстановление ее до уровня, близкого к исходному.

Таблица 3

Действие ингаляций «Апингалина» на реологические свойства крови крыс при отеке легких

Показатели	Группы животных		
	Интактная группа (n=10)	Контрольная группа (n=10)	Опытная группа (n=10)
Агрегация эритроцитов, %	35,30 ± 0,83	41,12 ± 2,20*	33,53 ± 0,58 "
СОЭ, мм/час	2,31 ± 0,25	3,83 ± 0,21*	2,33 ± 0,18"
ИД эритроцитов, у.е.	0,11 ± 0,001	0,09 ± 0,002*	0,12 ± 0,001"
Вязкость крови, у.е.	3,70 ± 0,10	4,50 ± 0,10*	3,90 ± 0,11**

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); " - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Еще одной характеристикой функционального состояния клеток крови является сорбционная способность эритроцитов (ССЭ). Было отмечено, ее увеличение на 58% относительно интактной группы животных ($p < 0,05$) (рис. 3). Из литературы известно, что развитие отека легких сопровождалось эндогенной интоксикацией организма. Вероятно, повышение ССЭ является необходимым условием для перераспределения уровня эндотоксинов, накапливающихся в организме, между плазмой и форменными элементами и составляет одну из стадий патологического процесса (Копытова, 2006).

Курсовая ингаляция препаратом «Апингалин» способствовала уменьшению ССЭ на 48% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

(рис. 3). Снижение ССЭ могло быть обусловлено уменьшением содержания эндотоксинов и, как следствие, снижением уровня интоксикации организма, что, очевидно, связано с биологическим действием прополиса и маточного молочка, входящих в состав «Апингалина».

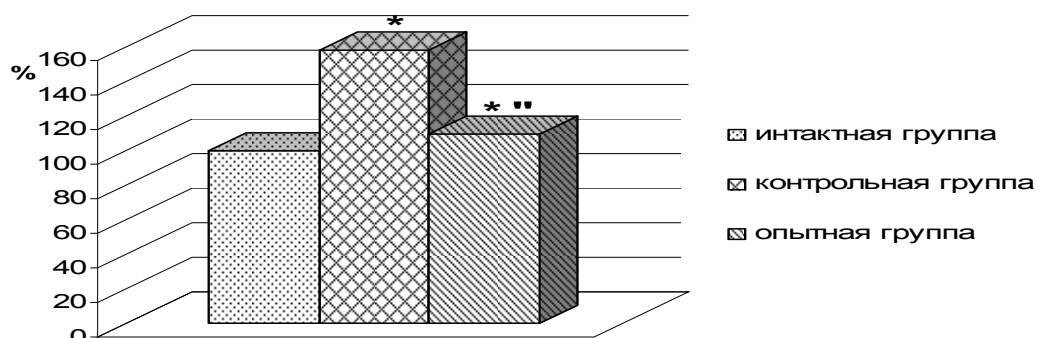


Рис.3. Влияние курсовой ингаляции препарата «Апингалин» на ССЭ крыс в условиях аденалового отека легких

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); ** - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Изменение функциональных свойств эритроцитов могло быть следствием модификации липидного бислоя эритроцитарной мембраны. В связи с этим был проведен анализ липидного спектра эритроцитов, который показал наличие существенных изменений фосфолипидного компонента мембран.

Было обнаружено значительное увеличение количества лизоформ ФЛ – в 4 раза по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$) (рис.4). При этом были выявлены однонаправленные изменения фракций ФХ, СМ и ФЭА сторону их уменьшения на 6,6%, 17,6% и 9,6% (рис. 4) соответственно, относительно группы «интактные животные» ($p < 0,05$).

После десятидневной ингаляции животных препаратом маточного молочка и прополиса было обнаружено заметное снижение количества лизоформ ФЛ – в 2,6 относительно контрольной группы ($p < 0,05$). Произошло достоверное повышение уровня СМ - почти на 12%, а так же увеличение количества ФХ - на 6% и ФЭА на 8,5% по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$) (рис. 4). Результаты сопоставимы с таковыми интактной группы.

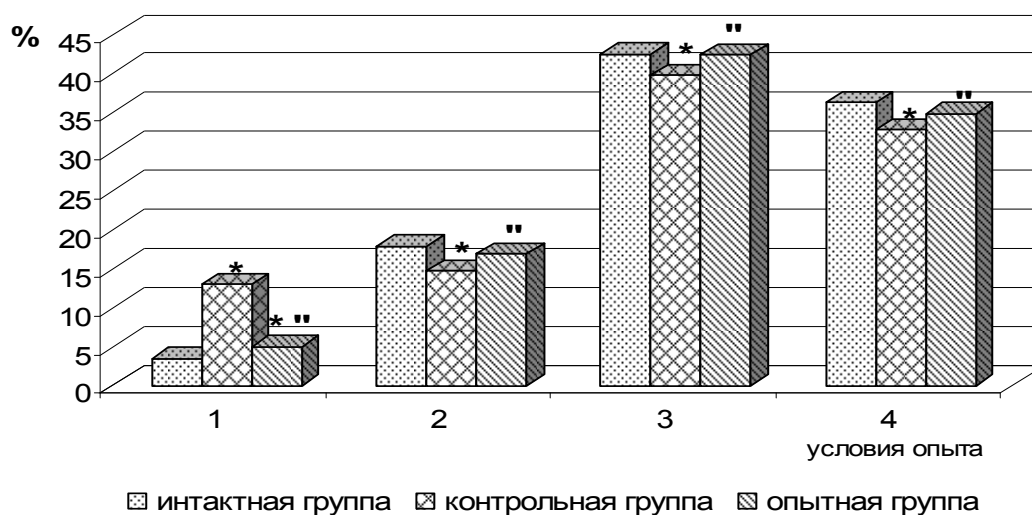


Рис.4. Изменение фосфолипидного спектра эритроцитов крыс после ингаляции препаратом «Апингалин» при отеке легких

1 – ЛФ; 2 – СМ; 3 – ФХ; 4 – ФЭА

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); ** - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Вероятно, нарушение функциональной активности эритроцитов, в частности ЭФП, при отеке легких произошло в результате снижения электрокинетического заряда клетки. Мы считаем, что один из возможных механизмов изменения электрокинетических свойств эритроцитов связан со структурными изменениями клеток, а именно – с модификацией фосфолипидного спектра мембран, о чем свидетельствуют полученные результаты: значительное нарушение соотношений между мембранодеструктивными и мембраностабилизирующими фракциями в сторону снижения концентрации последних и значительного увеличения уровня лизофосфолипидов – наиболее цитотоксичной группы ФЛ. Возможно, это является следствием избыточной активности фосфолипазных реакций, характерных для воспалительного процесса, и приводящих к накоплению лизоформ ФЛ, характеризующихся высокими детергентными свойствами (Евдокимова, 2005).

Наличие мембранодеструктивных процессов подтверждает и уменьшение фракции ФХ, являющегося стабилизатором фосфолипидного бислоя эритроцитарных мембран, а так же снижение количества СМ и ФЭА. Как известно, СМ и ФХ находятся преимущественно в поверхностном слое плазматической мембраны, а ФЭА – во внутреннем, следовательно, можно говорить о структурных нарушениях на протяжении всего липидного бислоя эритроцитарных мембран. Поскольку ФЭА играет важную роль в регуляции активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, уменьшение его содержания в мембране может приводить к нарушению внутриэритроцитарного ионного гомеостаза. Известно, что ФЭА принадлежит к легкоокисляемым фракциям и является основным субстратом ПОЛ, в связи с этим, можно предположить, что

снижение количества данной фракции обусловлено интенсификацией ПОЛ при отеке легких. В свою очередь, повышенная активность ПОЛ, влечет за собой повышение проницаемости мембран, утечку из клеток ионов калия и, как следствие, снижение ЭФПЭ.

Результаты исследования ФЛ эритроцитов позволили вычислить интегральный показатель проницаемости $\text{ФХ}^2/\text{СМ} \cdot \text{ЛФХ}$. Было выявлено его снижение в контрольной группе в 3,5 раза относительно интактных животных, что указывает на повышение проницаемости мембран, и подтверждает данные об усилении активности фосфолипаз и накоплении лизопродуктов ФЛ (Преснухина, 2005; Клеменова, 2008; Крылов и др., 2009). Еще один возможный механизм изменения структуры липидного бислоя, а, следовательно, и функциональной активности эритроцитов при отеке легких, связан с активацией выделения эндогенных катехоламинов и их модифицирующим влиянием на мембрану. Как известно, на поверхности эритроцита находятся α - и β – адренорецепторы. Можно предположить, что при моделировании отека легких уровень циркулирующих катехоламинов в крови, повысился, и при этом чувствительность к ним адренорецепторов так же возросла. По всей видимости, это привело к торможению Na-K-ATФазы , соответственно, накоплению кальция в цитозоле с повышением его реактивности, и, как следствие, изменению физико-химических характеристик эритроцитарной мембраны, что не могло не отразиться на эффективности электрического заряда эритроцита (Гильмутдинов, 1994; Крылов и др., 1998; Муравьев, 2004).

Анализ фосфолипидного спектра мембран эритроцитов после курсовой ингаляции «Апингалином» выявил тенденцию к восстановлению нормального соотношения между фракциями ФЛ. Мы полагаем, что одним из механизмов нормализации структуры липидного бислоя мембран после курсовой ингаляции «Апингалином» может быть торможение повышенного ПОЛ, которым сопровождалось развитие отека легких. Так, в опытной группе животных было отмечено значительное снижение содержания ЛФ, обладающих мембранотоксическим и мембранолитическим действием. Мы считаем, что это связано с ингибированием эндогенных фосфолипаз антиоксидантами прополиса. В результате, по всей видимости, происходит торможение гидролитического окисления жирных кислот, приводящего к образованию деструктивных фракций ЛФ и субстратов ПОЛ – ненасыщенных жирных кислот (Евдокимова, 2005; Преснухина, 2005; Бутусова, 2007).

Повышение такой функционально активной фракции ФЛ как ФЭА, а так же количества СМ и ФХ, вероятно, является отражением стабилизирующего действия на мембраны клеток биологически активных компонентов прополиса и маточного молочка. Кроме того, известно, что СМ входит в состав липопротеиновых комплексов Na-K-ATФазы , следовательно, повышение его количества отразится на активности АТФазы, и, как следствие, - на электрокинетических свойствах эритроцитарных мембран (Крылов и др., 2009). В частности, после курсовой ингаляции крыс

препаратом, на основе маточного молочка и прополиса, прослеживается тенденция к восстановлению нормальной проницаемости эритроцитов, о чем свидетельствует увеличение в 2,5 раза коэффициента $\Phi X^2/CM \cdot ЛФХ$ по сравнению с контрольной группой. Очевидно, это привело к стабилизации эритроцитарных мембран и улучшению структурно-функциональных характеристик эритроцитов.

На основании результатов приведенного этапа исследований, можно заключить, что развитие у крыс отека легких привело к дестабилизации фосфолипидного компонента эритроцитарной мембраны, что повлекло за собой снижение суммарного заряда клеток и, как следствие, нарушение функциональной активности эритроцитов.

Курсовая ингаляция крыс препаратом «Апингалин» на фоне отека легких способствовала модификации структуры эритроцитарных мембран в сторону более оптимального состава фосфолипидного спектра, что является необходимым условием нормального функционирования клетки. По-видимому, это обусловило повышение электрокинетического потенциала, нормализацию физико-химических свойств эритроцитов и, следовательно, привело к восстановлению функциональной полноценности клеток, что в свою очередь обусловило улучшение реологических характеристик крови.

Ингаляционное действие препарата «Апингалин» на функциональную активность тромбоцитов и систему свертывания крови при отеке легких

Большое значение для оценки изменений в системе крови имеет изучение функциональных характеристик тромбоцитов, поэтому на следующем этапе эксперимента нами было проведено исследование некоторых свойств тромбоцитов. Было установлено, что в контрольной группе крыс через 10 дней после моделирования отека легких наблюдается повышение количества тромбоцитов на 35,6% относительно интактных животных ($p < 0,05$) (рис.6). При этом адгезивность тромбоцитов увеличилась на 51%, а время образования тромбоцитарных агрегатов достоверно уменьшилось на 21% относительно интактной группы (рис.5).

Ингаляционная терапия препаратом «Апингалин» не оказывала существенного влияния на общее количество тромбоцитов в крови крыс (рис.5). В то же время «Апингалин» способствовал снижению адгезивности тромбоцитов на 48% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) и восстановлению данного показателя до уровня здоровых животных. Наряду с этим после десятидневной ингаляции крыс препаратом наблюдалось увеличение времени образования тромбоцитарных агрегатов на 30,3% относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (рис.5).



Рис.5. Динамика изменения некоторых характеристик тромбоцитов при ингаляции крыс «Апингалином» в условиях адrenaлового отека легких
 1 – количество тромбоцитов; 2 – адгезивные свойства тромбоцитов;
 3 – время образования тромбоцитарных агрегатов

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); ** - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Проведенный анализ коагулограммы показал, что в контрольной группе крыс через 10 дней после моделирования отека легких наблюдается уменьшение времени начала (T_1), окончания (T_2) и продолжительности свертывания крови (T) на 18%, 19% и 35% соответственно относительно интактных животных ($p < 0,05$) (рис.7). Время начала ретракции и фибринолиза (T_3) достоверно увеличилось на 9%, время существования плотного кровяного сгустка (T_4) – на 57% по сравнению с интактной группой (рис.7).

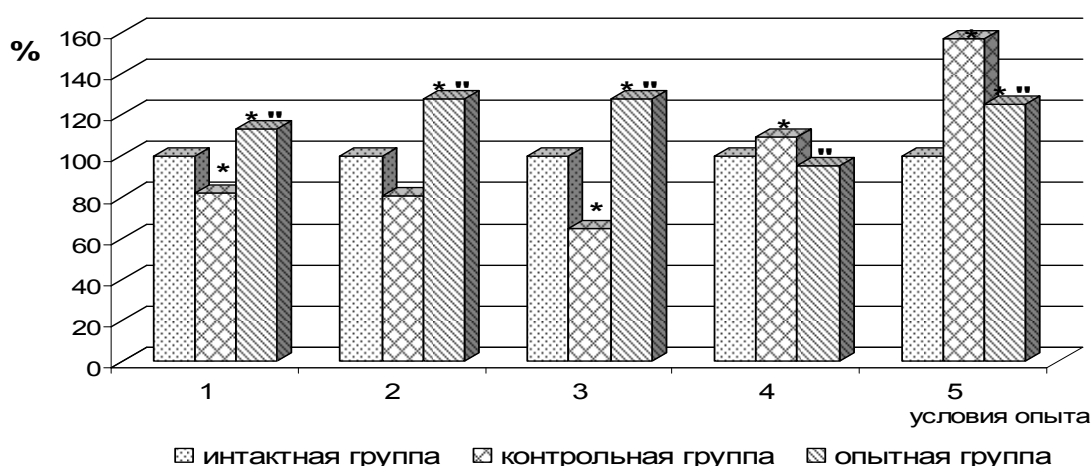


Рис.6. Влияние «Апингалина» на систему свертывания крови крыс при отеке легких

1 – начало свертывания крови; 2 – конец свертывания крови; 3 – продолжительность свертывания крови; 4 – начало ретракции и фибринолиза; 5 – время существования плотного сгустка

Примечание: * - статистически значимые различия по отношению к интактной группе животных ($p < 0,05$); ** - статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных ($p < 0,05$).

После курсовой ингаляции крыс с отеком легких препаратом «Апингалин», наблюдалось достоверное увеличение времени начала (T_1), окончания (T_2) и продолжительности свертывания крови (T) на 31%, 46,7% и 63% соответственно относительно контрольной группы (рис.6). При этом было отмечено уменьшение времени начала ретракции и фибринолиза (T_3) на 13,5%, времени существования плотного сгустка (T_4) - на 32% по сравнению с животными, которым не проводилась ингаляция ($p < 0,05$) (рис.6). Данные сопоставимы с таковыми интактной группы.

Таким образом, анализ полученных результатов выявил изменения, свидетельствующие об увеличении количества тромбоцитов и усилении их функциональной активности у крыс контрольной группы. Наряду с этим, наблюдается гиперкоагуляция и снижение фибринолитической активности крови, на что указывают данные коагулограммы. Вероятно, подобные изменения в системе крови вызваны активацией симпато-адреналовой системы, и, как следствие, повышенным содержанием в кровеносном русле катехоламинов. Как известно, тромбоциты на своей поверхности несут адренорецепторы. Соответственно, увеличение уровня катехоламинов в крови, в том числе адреналина, может вызвать активацию клеток (Безруков, 1968; Коркушко, 1973; Дуджак, 2009). Кроме того, повышение функциональной активности тромбоцитов может быть связано с высвобождением медиаторов воспаления, в частности, серотонина – сильного агрегирующего агента (Самаль и др., 1990; Шитикова, 2000; Берковский и др., 2002). По всей видимости, указанные изменения явились одной из причин гиперкоагуляции крови. Кроме того, в ответ на действие агонистов тромбоциты могут высвобождать из внутриклеточных органелл вещества, подавляющие фибринолиз (в частности, ингибитор активатора пламиногена) (Kniithof, 1986; Шахматов, 2010). Следует отметить, что при отеке легких усиливаются процессы ПОЛ. В связи с этим, можно предположить, что повышенная функциональная активность тромбоцитов и нарушения в системе гемостаза могут быть вызваны активацией процессов свободно-радикального окисления, которые, как известно, оказывают негативное влияние на мембраны клеток.

Как видно из полученных результатов, ингаляционная терапия крыс «Апингалином» способствовала улучшению исследуемых функциональных характеристик тромбоцитов - снижению степени адгезии и агрегационных свойств клеток. По-видимому, это обусловлено антиагрегантными свойствами прополиса, входящего в состав препарата. В частности, установлено, что биофлавоноиды подавляют повышенную агрегацию клеток крови, в том числе тромбоцитов, препятствуя образованию тромбов. Из литературных данных известно, что феруловая кислота оказывает ингибирующее действие на метаболизм простагландинов и активность тромбоксансинтетаз (A_2 и B_2), подавляя каскад арахидоновой кислоты на первоначальном этапе (Назарова, 2007). Исходя из этого, можно предположить, что феруловая кислота влияет на время свертывания крови, увеличивая его. Тем самым, пчелиный прополис способствует нормализации

процессов гемокоагуляции (Реуцкий, 2007; Крылов и др., 2007). Кроме того, по всей видимости, после ингаляции препаратом произошло снижение интенсивности процессов свободно-радикального окисления в крови крыс, что связано с мощным антиоксидантным действием биофлавоноидов. Вероятно, это способствовало стабилизации мембран клеток, и, как следствие, нормализации свойств тромбоцитов и системы свертывания крови.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что курсовая ингаляция крыс препаратом на основе прополиса и маточного молочка восстанавливает функциональное состояние тромбоцитов, подавляя повышенную адгезию и агрегацию клеток. «Апингалин» улучшает процессы гемокоагуляции, на что указывают данные коагулограммы: удлинение времени начала, окончания, продолжительности свертывания крови и усиление ретракции и фибринолиза, что в целом свидетельствует о снижении риска возникновения тромбов и улучшении микроциркуляции крови.

Обобщая результаты исследований, можно сделать заключение о том, что ингаляция крысам препарата «Апингалин» в условиях альтерации функций легких приводит к эффективному восстановлению их морфо-функционального состояния. Из гистологической картины тканей легких следует, что одним из важнейших механизмов подобного действия препарата является его влияние на систему крови. Анализ полученных данных показывает, что при ингаляции препарата происходит восстановление как морфологических, так и функциональных характеристик крови. Наблюдается повышение количества эритроцитов и гемоглобина, а так же количества ретикулоцитов, что свидетельствует об обновлении крови. Происходит стабилизация мембран клеток, за счет восстановления нормального соотношения фосфолипидных компонентов – снижения количества лизоформ ФЛ и возрастания доли СМ, ФХ, ФЭА. По всей видимости, это обуславливает повышение электрокинетического потенциала эритроцитов, и, следовательно, приводит к восстановлению функциональной активности клеток, в частности ЭФП. Соответственно, улучшаются реологические свойства крови: уменьшается агрегационная способность эритроцитов, снижается СОЭ, увеличивается ИД клеток, и, следовательно, нормализуется вязкость крови, снижается ССЭ. Вместе с тем, «Апингалин» способствует подавлению повышенной адгезии и агрегационной способности тромбоцитов, восстанавливая функциональное состояние клеток, и нормализации процессов свертывания крови, что выражается в увеличении времени начала, окончания, продолжительности свертывания крови и усилении ретракции и фибринолиза. Таким образом, курсовая ингаляция препарата маточного молочка и прополиса в условиях отека легких у крыс оказывает положительное влияние на клетки крови и процессы гемостаза, тем самым, способствуя улучшению состояния системы крови и организма в целом.

ВЫВОДЫ

1. Ингаляционное введение крысам препарата пчелиного маточного молочка и прополиса («Апингалин») в условиях моделирования адреналового отека приводит к улучшению гистологической картины тканей легких.

2. Курсовая ингаляция крыс на фоне отека легких препаратом Апингалин улучшает морфо-функциональное и структурное состояние крови по сравнению с контролем:

- повышает количество эритроцитов и содержание гемоглобина, увеличивает количество ретикулоцитов;

- способствует восстановлению функциональной полноценности эритроцитов и нормализации реологических свойств крови: повышению ЭФПЭ, снижению агрегационной способности эритроцитов и СОЭ, увеличению ИД эритроцитов, улучшению вязкости крови, снижению ССЭ;

- восстанавливает соотношение фосфолипидных фракций эритроцитов, о чем свидетельствует снижение уровня лизоформ ФЛ, повышение количества СМ, ФХ, ФЭА.

3. Курсовая ингаляция препарата «Апингалин» при моделировании отека легких у крыс способствует нормализации функциональных характеристик тромбоцитов в крови, что выражается в снижении повышенной адгезивной и агрегационной активности клеток. Улучшает показатели коагулограммы: способствует увеличению времени начала, окончания, продолжительности свертывания крови; стимулирует процессы ретракции и фибринолиза; уменьшает время существования плотного сгустка.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Старателева Ю.А.** Исследование действия препарата «Апингалин» на морфо-функциональное состояние эритроцитов в крови крыс при отеке легких / Ю.А. Старателева // Ломоносов – 2008: тезисы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. М., 2008. С.227.
2. Белякова О.А. Электрофоретическая подвижность эритроцитов как отражение гомеостаза при альтерации функций головного мозга / О.А. Белякова., **Ю.А. Старателева** // Тезисы докладов 13-й Нижегородской сессии молодых ученых. Нижний Новгород, 2008. С.8.
3. **Старателева Ю.А.** Действие ингаляции препарата «Апингалин» на некоторые показатели эритроцитов и ретикулоцитов крови крыс при отеке легких / Ю.А. Старателева // Ломоносов – 2009: тезисы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. М., 2009. С. 276.
4. Копылова С.В. Действие препарата «Апингалин» на процессы перекисного окисления при дисциркуляторной энцефалопатии / С.В. Копылова, **Ю.А. Старателева**, Е.А. Антипенко // Материалы Международной научно-практической конференции «Инновации в пчеловодстве». Адлер, 2008. – Рыбное: НИИП, 2009. 260 с.
5. Копылова С.В. Действие препарата «Апингалин» на показатели красной крови крыс при отеке легких / С.В. Копылова, **Ю.А. Старателева** // Материалы координационного совещания и 9-й научно-практической конференции «Интермед». М., 2009. – Рыбное: НИИП, 2009. С.220.
6. **Старателева Ю.А.** Влияние препарата «Апингалин» на некоторые показатели крови крыс при отеке легких / Ю.А. Старателева, А.А. Анашкина, С.В. Копылова // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз-Россия 2010". - Нижний Новгород, 2010. - С. 151
7. Копылова С.В. Влияние препарата «Апингалин» на некоторые показатели эндогенной интоксикации крови крыс при отеке легких / С.В. Копылова, А.А. Анашкина, **Ю.А. Старателева** // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. №2. 2010. С.1-5.
8. Анашкина А.А. Функциональное состояние эритроцитов при отеке легких у крыс и способ его коррекции с использованием пчелопродуктов / А.А. Анашкина, **Ю.А. Старателева**, С.В. Копылова // XXI съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: тезисы докладов. Калуга, 19-25 сентября 2010. – М. – Калуга: БЭСТ-принт, 2010. С. 26-27.
9. Анашкина А.А. Детоксицирующие свойства апингалина / А.А. Анашкина, С.В. Копылова, **Ю.А. Старателева**, В.Н. Крылов // Пчеловодство. №8. 2010. С. 52-53.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИД – индекс деформируемости

ЛФХ – лизофосфотидилхолин

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СМ – сфингомиелин

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

ССЭ – сорбционная способность эритроцитов

ФХ – фосфотидилхолин

ФЭА – фосфотидилэтанолламин

ЭФПЭ – электрофоретическая подвижность эритроцитов