

На правах рукописи

Анашкина Анастасия Александровна

**ВЛИЯНИЕ ИНГАЛЯЦИИ ПЧЕЛИНОГО МАТОЧНОГО
МОЛОЧКА И ПРОПОЛИСА НА ЭНДОГЕННУЮ ИНТОКСИКАЦИЮ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ ЛЕГКИХ У КРЫС**

03.03.01 - физиология

03.01.04 - биохимия

Автореферат
диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2012

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии человека и животных федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научные руководители:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
Крылов Василий Николаевич;

кандидат биологических наук, доцент
Копылова Светлана Вячеславовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
зав. биохимической лаборатории ФГБУ НИИКВИ
Копытова Татьяна Викторовна;
доктор медицинских наук, профессор,
директор базового медицинского колледжа
Смирнов Владимир Павлович

Ведущая организация: государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится « 12 » апреля 2012 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И.Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д.23, корп. 1, биологический факультет. Факс: (8312)65-82-92.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан « _____ » марта 2012 г., размещен на сайте ВАК РФ « 06 » марта 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Копылова С. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последнее время, наряду с синтетическими лекарственными средствами, все чаще исследуют природные соединения с направленной активностью в отношении тех или иных органов и систем больного организма. Одним из перспективных направлений являются препараты на основе пчелопродуктов из-за их антиоксидантных, биостимулирующих, регенераторных и других свойств (Ишмуратова и др., 2007; Крылов и др., 2007). Вместе с тем, несмотря на широкое применение в апитерапии, например, пчелиного яда, в гораздо меньшей степени используются такие высокоактивные продукты, как прополис и маточное молочко пчел. Это объясняется, с одной стороны, их меньшей изученностью, а с другой – сложностью введения в организм, т.к. они имеют многокомпонентный состав. Практически не изучены возможность комплексного использования названных продуктов и механизмы их воздействия на организм.

В соответствии с этим, на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского было разработано ингаляционное средство (патент РФ 21740002 от 15.09.2000) - водно-спиртовая суспензия маточного молочка и прополиса – с условным названием «Апингалин». Ранее было установлено (Копылова и др., 2001; Крылов и др., 2007; Улитин, 2010), что курс ингаляций «Апингалина» способствовал повышению воздухопроницаемости крупных и средних бронхов, улучшал спирометрические характеристики легких при хронических неспецифических заболеваниях легких. Применение ингаляционной смеси маточного молочка и прополиса в комплексе со стандартной терапией позволило повысить эффективность терапии по сравнению с терапией больных общепринятыми методами, что приводило к снижению тяжести течения болезни и сокращению сроков выздоровления. Этот эффект связан с непосредственным влиянием препарата на эпителиальную ткань и улучшением структуры сурфактанта, уменьшением вязкости мокроты, а так же с биологическим действием компонентов маточного молочка и прополиса на гладкую мускулатуру бронхов с соответствующим расслаблением мышц.

Однако терапевтический эффект Апингалина может быть связан и с действием его компонентов на другие системы организма. Более того, компоненты Апингалина, легко всасываясь через слизистые и попадая в кровотоки, могут оказывать на организм и общее действие, не подвергаясь инактивации в печени в первую волну циркуляции.

С другой стороны известно, что заболевания легких связаны с увеличением в крови продуктов эндогенной интоксикации, обусловленных метаболическими нарушениями на клеточном уровне (Новожилова, 2007). Поэтому среди патологических звеньев при заболеваниях легких определенное место занимают биохимические изменения, которые формируются под влиянием эндотоксинов. В некоторых случаях синдром

эндогенной интоксикации выполняет собственную роль в патогенезе, что существенным образом осложняет прогноз и течение заболевания (Попов и др., 2008) и неблагоприятно влияет на качество жизни пациентов. Из этого следует, что течение основного заболевания часто зависит от своевременности дезинтоксикационной терапии (Щекотов, 2010; Шмеркевич, 2007). Поэтому, изучение возможности Апингалина оказывать при резорбции в кровоток детоксицирующее действие будет способствовать расширению спектра его применения в апитерапии заболеваний легких.

Вышеизложенное послужило основанием для выбора цели диссертации.

Цель работы: исследование влияния ингаляционного средства на основе пчелиного маточного молочка и прополиса («Апингалин») на эндогенную интоксикацию у крыс в условиях моделирования отека легких.

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

1. Рассмотреть морфо-функциональное состояние легких как источника эндогенных токсинов.
2. Выявить особенности системы биотранспорта эндотоксинов.
3. Изучить нарушения белкового и фосфолипидного состава плазмы крови, вызванные эндогенной интоксикацией.
4. Рассмотреть пул молекул средней массы в плазме, эритроцитах и моче и выявить функциональную активность органов детоксикации по выведению эндотоксинов.
5. Исследовать влияние ингаляции препарата «Апингалин» на эндогенную интоксикацию в организме крыс с экспериментальным отеком легких.

Научная новизна

В работе впервые проведено комплексное исследование этапов формирования эндогенной интоксикации при экспериментальном отеке легких у крыс, предложена соответствующая схема. Выявлено действие курсовой ингаляции «Апингалина» на различных этапах формирования эндогенных токсинов при отеке легких. Показано, что препарат снижает интенсивность образования токсинов в легких, восстанавливает биотранспортную систему токсических веществ, нормализует соотношение белков и фосфолипидов плазмы, снижает общую токсичность крови, способствует выведению эндогенных токсинов из организма, улучшая функциональное состояние основных органов детоксикации и выведения.

Научно-практическая значимость

Полученные результаты о развитии эндогенной интоксикации в условиях адреналового отека легких могут расширить представления о закономерностях формирования эндотоксикоза при нарушении функций легких. Выявленные свойства ингаляционного средства «Апингалин» влияют на процессы формирования эндогенных токсических веществ в легких, их

транспортную систему, детоксикацию и выведение, нарушения белкового и фосфолипидного состава плазмы вскрывают ряд механизмов корригирующего действия прополиса и маточного молочка, входящих в состав препарата, при альтерации функций легких. Это может служить обоснованием для внедрения комплекса в практическую медицину для детоксикации организма при заболеваниях легких.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При развитии у крыс адrenomалого отека легких в кровь поступают эндогенные токсины при разрушении ткани легких и усилении перекисного окисления липидов.

2. Нарушается работа биотранспортных систем эндотоксинов в крови, в плазме крови возникают нарушения белкового и фосфолипидного обмена.

3. Увеличивается токсичность крови и ухудшается функциональная активность органов детоксикации и выведения.

4. Ингаляции крыс с экспериментальным отеком легких препаратом «Апингалин» способствуют уменьшению эндогенной интоксикации: снижению выброса эндогенных токсинов в кровь из ткани легких, восстановлению системы биотранспорта эндогенных токсинов, нормализации соотношения фракций фосфолипидов и белков.

5. После ингаляций средством «Апингалин» наблюдается снижение токсичности крови, восстановление функциональной активности органов детоксикации и выведения.

Апробация работы

Основные положения доложены на 61-ой научной студенческой конференции биологического факультета ННГУ им. Лобачевского «Биосистемы: организация, проведение, управление» (Нижний Новгород, 2008); Международной научно-практической конференции «Инновации в пчеловодстве» (Адлер, 2008); XV и XVI Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2010, 2011); III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010); XXI съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010); VI Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации» (Иваново, 2010); Международном форуме пчеловодов «Мордовский мед» (Саранск, 2010); Международной научно-практической конференции «Пути развития пчеловодства в России, странах СНГ и Дальнего Зарубежья» (Ярославль, 2011).

Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ им. Н.И. Лобачевского 6 февраля 2012 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, 3 из них в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 134 страницах машинописного текста, иллюстрированы 7 таблицами и 16 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 204 источника, из которых 144 на русском и 60 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 360 белых крысах, самцах, массой 150-200 г. Животные были разделены на 3 группы. К первой – интактной – группе относились животные без какого-либо вмешательства. Крысам второй – контрольной – группы воспроизводили адреналовый ОЛ (Попов, Тополянский, 1975). Для этого животным внутрибрюшинно вводили адреналин в дозе 0,5 мг/кг. Через 10-15 мин визуально наблюдали признаки отека – изменение поведения и вегетативного статуса, значительное учащение дыхания. Животным третьей – опытной – группы моделировали ОЛ, после чего проводили курс ингаляций в течение 10 дней по 10 минут средством «Апингалин». Ингаляции осуществлялись при помощи ультразвукового ингалятора ИУП – 01М. Кровь для анализа брали из подъязычной вены у наркотизированных крыс. Гистологический материал - у наркотизированных и декапитированных крыс. Для забора ночной порции мочи крыс помещали на ночь перед исследованием в камеру для сбора мочи.

В работе использовали водно-спиртовую суспензию прополиса (ГОСТ 28886-90, ВФС 42-1084-81) и маточного молочка (ГОСТ 28888-90, ВФС 42-1291-83), условно названную «Апингалин». Исследуемые продукты пчеловодства предоставлены опытной станцией пчеловодства «Краснополянское» РАСХН.

Распределение материала по этапам исследований представлено в таблице 1.

В работе использовались следующие методы анализа: гистологическое исследование легких и печени (Артишевский, 1999); определение концентрации малонового диальдегида (МДА) (Владимиров, Арчаков, 1972); спектрофотометрическое определение диеновых (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и оснований Шиффа (ОШ); определение сорбционной емкости эритроцитов (СЕЭ) (Тойгабаева в модификации Копытовой, 2006); биуретовый метод определения общего белка плазмы крови и основанный на нем метод количественного определения альбумина (Кигслей-Вейксельбаум, 2002); определение количества фибриногена в плазме весовым методом; определение содержания β - и пре β -липопротеинов турбидиметрическим методом (Бурштейн, Смай); разделение фосфолипидов плазмы на пластинках

“Sorbfit” (Колб, Камышников, 1982); определение соотношения групп белков в высохшей капле сыворотки крови при помощи красителей (Обухова, Конторщикова, 2008); определение молекул средней массы (МСМ) по М.Я.Малаховой (1995).

Статистическая обработка экспериментального материала осуществлялась с применением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений на персональном компьютере с помощью программы BioStat 2008 (версия 5.5.0.0.).

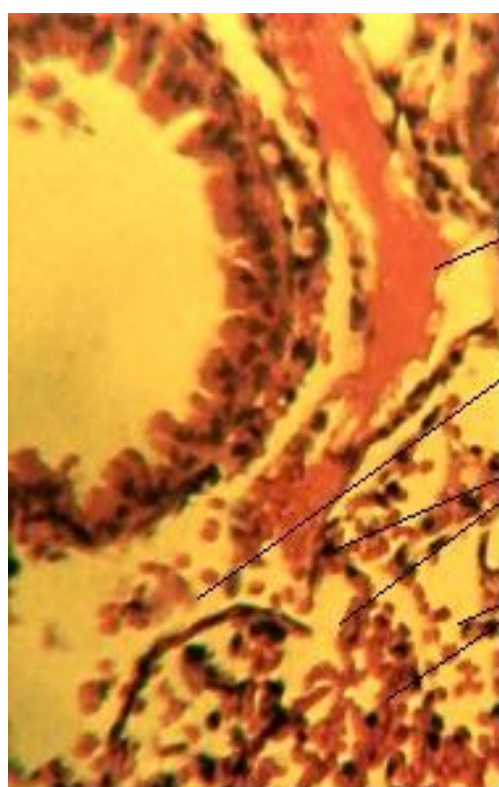
Таблица 1.

Этапы исследований	Исследуемые показатели	Количество животных
1. Изучение этапов формирования эндогенной интоксикации при моделировании адrenaльного отека легких у крыс	гистология тканей легких, МДА, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, основания Шиффа в плазме крови, сорбционная емкость эритроцитов, концентрация альбумина, концентрация пре-β- и β-липопротеинов низкой плотности, общий белок, содержание фибриногена, соотношение фракций фосфолипидов в плазме крови, соотношение фракций белков в сыворотке крови, молекулы средней массы в плазме, моче и на эритроцитах, гистология тканей печени	240
2. Исследование влияния курсовой ингаляции препарата «Апингалин» на этапы формирования эндогенной интоксикации в организме крыс с отеком легких	гистология тканей легких, МДА, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, основания Шиффа в плазме крови, сорбционная емкость эритроцитов, концентрация альбумина, концентрация пре-β- и β-липопротеинов низкой плотности, общий белок, содержание фибриногена, соотношение фракций фосфолипидов в плазме крови, соотношение фракций белков сыворотки крови, молекулы средней массы в плазме крови, моче и на эритроцитах, гистология тканей печени	120

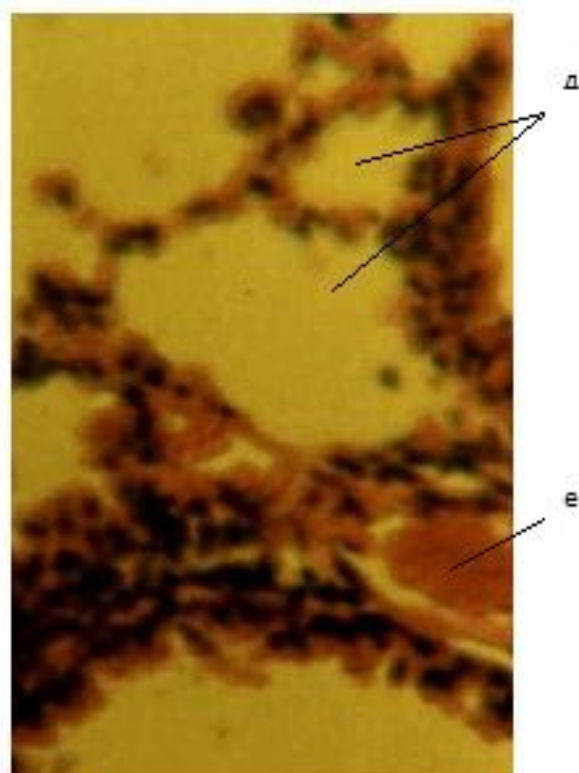
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Морфо-функциональное состояние легких как источника эндогенных токсинов

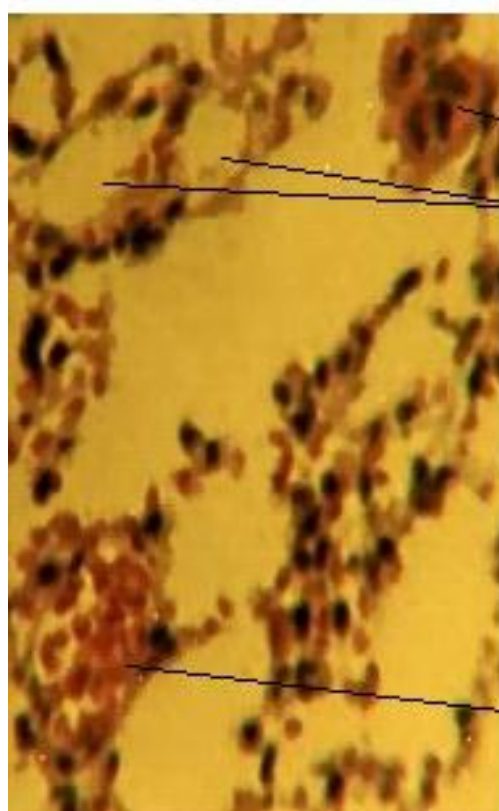
Классический путь развития синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ) включает несколько этапов. Накопление эндотоксинов при их поступлении из патологического очага в кровоток приводит к разбалансировке



I



II



III

Рис 1. Гистологические срезы легких (x128, окрашивание гематоксилин-эозином): I – контрольная группа, II – интактная группа, III – опытная группа; а – жидкость в альвеолах, б – макрофаг, в – разрушенные стенки капилляра и альвеолы; г – «монетные столбики» эритроцитов; д – чистые альвеолы; е – капилляр со свободными эритроцитами, ж – макрофаги с темными включениями, з – восстановленные альвеолы.

биохимического гомеостаза и запуску каскада различных реакций, не свойственных здоровому организму. Включение и напряжение регуляторных и защитных систем ведут к появлению продуктов их патологического функционирования. Одновременно токсины проникают в неизменные клетки, вызывая нарушения внутриклеточного обмена, повреждения мембран и увеличение количества токсических метаболитов. Могут оказаться нарушенными процессы естественной детоксикации и выведения, что по принципу обратной связи, может привести к дальнейшему накоплению эндогенных токсинов (Добротина, Копытова, 2004, Копытова, 2007).

Таким образом, на первом этапе исследований необходимо было определить возможные источники образования эндогенных токсинов при отеке легких (ОЛ). Для этого были проведены гистологические исследования тканей легких (рис. 1). На гистологических срезах легких интактной группы животных патологических изменений легочной ткани выявлено не было. В отличие от этого, в легких контрольной группы выявлялись типичные критерии отека – отечная жидкость и белок в ткани и альвеолах, что свидетельствует о наличии альвеолярного отека (Танхилевич, 2004). Были обнаружены эритроциты, вышедшие в просвет альвеол из-за нарушения целостности капилляров. Все это свидетельствовало о том, что, наряду с легочной тканью, в патологический процесс вовлечена и система крови. Продукты распада клеток и тканей и протеолитические ферменты из очагов деструкции при нарушении барьерных функций мембран выступали в роли эндогенных токсинов (Осадчая и др. 2010; Щекотов, 2010) и стимулировали реакции протеолиза.

Известно, что значительное снижение диффузионной способности легких для газов приводит к развитию в организме гипоксии (Рутгайзер, 2010; Alpert, 2002), которая стимулирует усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). Это положение подтверждалось нашими данными (рис. 2).

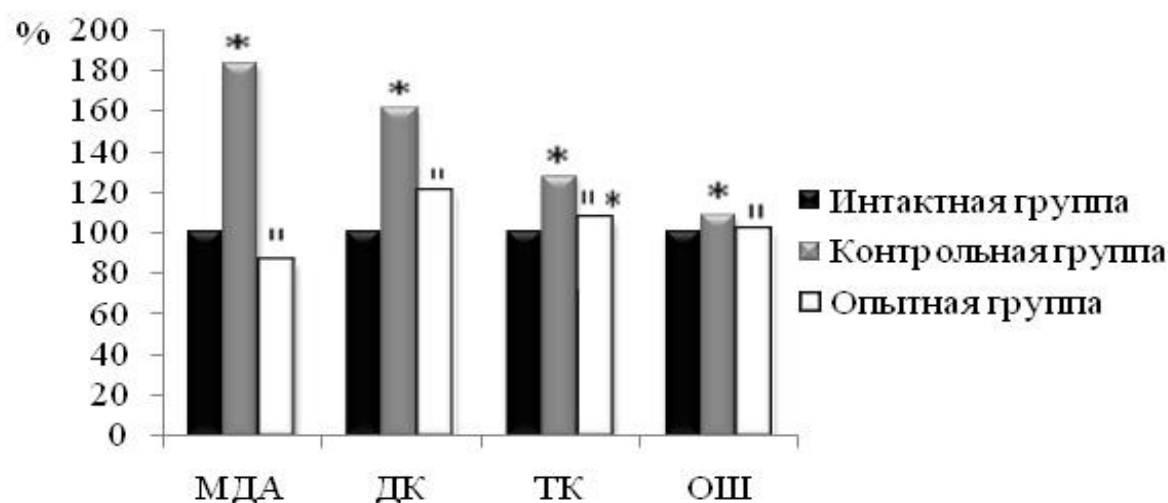


Рис. 2. Показатели перекисного окисления липидов плазмы крови крыс с отеком легких.

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к интактной группе; " - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

Происходило увеличение уровня МДА (на 83,1%), ДК (на 61,2%), ТК (на 27,7%), а так же ОШ (на 8,7%) по сравнению с интактными животными. Увеличение концентрации этих соединений в плазме свидетельствует о повышении ее токсичности (Балаболкин, 2011).

В соответствии с вышеизложенным, мы предполагаем, что основными причинами возникновения эндогенных токсинов при ОЛ являются – разрушение тканей легких и гипоксия, стимулировавшая ПОЛ.

Особенности системы биотранспорта эндотоксинов

Из источников образования эндогенные токсины далее попадают в кровь, связываясь с переносчиками. Поэтому, на втором этапе были изучены изменения в системе биотранспорта эндотоксинов. В норме такие соединения транспортируются в крови в виде комплексов с мембранами эритроцитов, альбумином и липопротеинами, в частности, ЛПОНП (Аксенова, 2000; Щекотов, 2010).

В связи с повышенной интенсивностью образования эндогенных токсинов, которые способны блокировать рецепторы мембран, у крыс контрольной группы наблюдалось снижение сорбционной емкости эритроцитов (СЕЭ) на 67,5% (рис. 3). Это является причиной накопления токсинов в плазме и усиления нагрузки на ее системы биотранспорта.

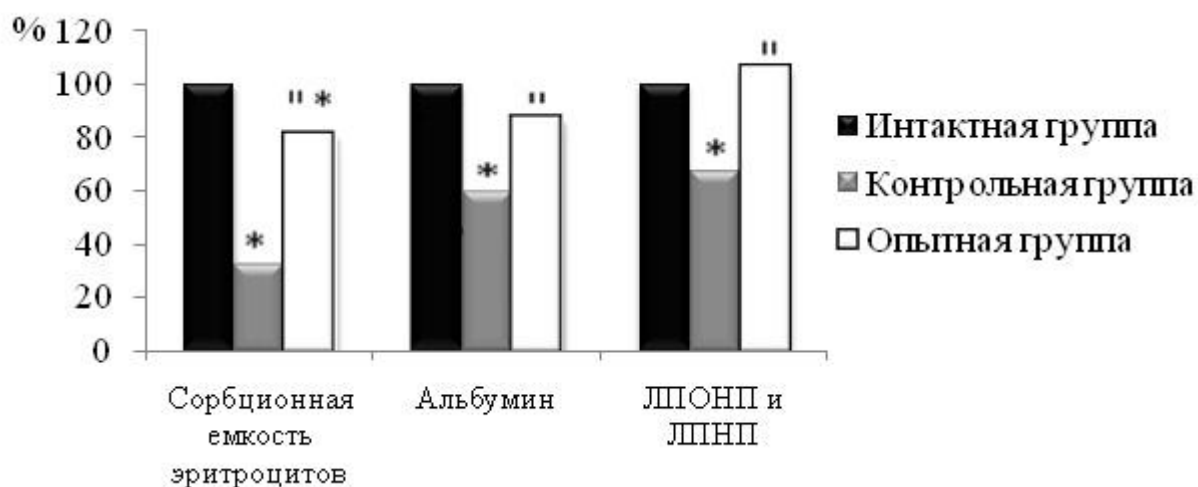


Рис. 3. Система биотранспорта эндогенных токсинов в крови крыс с отеком легких.

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к интактной группе; ** - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

Следствием усиления интенсивности перекисноокислительных и протеолитических реакций было уменьшение концентрации альбумина в плазме крови крыс контрольной группы на 39,9%. Это явление может приводить к повышению концентрации токсических веществ, находящихся в свободном состоянии в плазме и проявлению их агрессивности. Об этом свидетельствовало вовлечение в процесс неосновных транспортных систем, таких как липопротеины (Аксенова, 2000), – снижение уровня ЛПОНП и

ЛПНП в плазме крови контрольной группы крыс на 32.8% по сравнению с интактной.

Таким образом, при ОЛ наблюдалось ухудшение биотранспорта эндогенных токсинов, что затрудняло дальнейшую их трансформацию и выведение из организма, усугубляя ЭИ.

Нарушения белкового и фосфолипидного состава плазмы крови

Механизм ЭИ в основном заключается в повреждающем действии эндотоксинов на те или иные структуры и нарушении метаболических процессов в организме. Для индикации данных изменений был рассмотрен белковый и фосфолипидный профиль плазмы.

Уменьшение уровня общего белка плазмы и фибриногена в контрольной группе животных на 44,5 и 29.8% по сравнению с интактной (рис.4) свидетельствовало о нарушении клеточного метаболизма, усилении катаболических процессов, протеолиза, тромбообразования и тромболизиса, снижении интенсивности анаболизма. Результатом этого являлось накопление в организме вторичных токсинов - продуктов деградации белков (Карякина, Белова, 2001; Чучалин, 2005), входящих в пул МСМ.

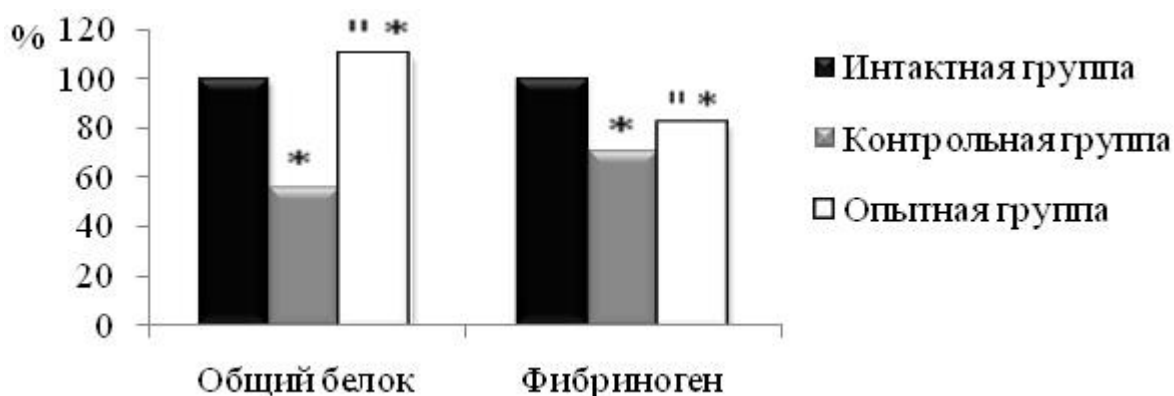


Рис. 4. Концентрация общего белка и фибриногена плазмы крови крыс с отеком легких.

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к интактной группе; ** - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

В связи с описанными выше процессами, а также активацией регуляторных систем при ЭИ в сыворотке крови выявлялись изменения в соотношении фракций белков. При хромокристаллоскопии сыворотки амидочерным 10В было выявлено 4 фракции белков (табл. 2): альбумины, α -глобулины, β -глобулины и γ -глобулины. У контрольной группы наблюдалось достоверное понижение доли альбуминов на 5,3% на фоне повышения доли α -глобулинов на 4,5%. Доли β - и γ -глобулинов изменялись не достоверно. Повышение содержания в сыворотке α -глобулинов, возможно, было связано с выходом в кровь ингибиторов протеиназ в ответ на деструкцию ткани.

Таблица 2.

Соотношение (в %) фракций белков сыворотки крови крыс с отеком легких

Фракции	Группы животных		
	Интактная	Контрольная	Опытная
альбумины	53,07±0,79	47,76±0,97*	53,01±1,02''
α-глобулины	12,00±0,45	16,55±1,16*	11,59±0,65''
β-глобулины	13,95±2,55	11,03±2,11	16,01±1,70
γ-глобулины	20,11±5,53	23,96±4,83	19,36±7,44

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к интактной группе; '' - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

В формировании синдрома ЭИ важная роль принадлежит интенсификации основных мембранодестабилизирующих факторов (Власов, 2011). В связи с этим была произведена оценка изменения состава ФЛ в плазме крови, которая отражает взаимодействия с мембранами (Бутусова, 2007). Было выявлено 4 фракции фосфолипидов: лизофосфотидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА). В плазме крови контрольной группы было обнаружено увеличение ЛФХ – на 10,2%, который входит в пул МСМ и является маркером мембранодеструктивных процессов. При этом наблюдались однонаправленные изменения мембраностабилизирующих фракций (ФХ и ФЭА) в сторону их уменьшения (табл. 3) относительно группы «интактные животные». Полученные данные свидетельствовали об усилении повреждения мембран и накоплении токсических метаболитов.

Таблица 3.

Соотношение (в %) фосфолипидов плазмы крови крыс с отеком легких

Фракции	Группы животных		
	Интактная	Контрольная	Опытная
ЛФХ	5,50±0,41	15,72±0,40*	6,60±0,56''
СМ	10,93±0,55	9,38±0,05	10,85±0,29
ФХ	46,10±1,33	40,50±0,07*	45,85±2,14''
ФЭА	37,60±1,15	33,83±0,07*	36,42±0,50''

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к интактной группе; '' - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

Описанные изменения в белковом и фосфолипидном составе плазмы крови указывали на ухудшение синтетической активности печени (Турсунов, 2009).

Таким образом, у контрольной группы животных после моделирования адреналового ОЛ в плазме крови обнаруживались нарушения белкового и фосфолипидного состава, свидетельствующие о возникновении вторичных токсинов и продуктов патологического функционирования защитных и регуляторных систем.

Пул молекул средней массы в плазме, эритроцитах и моче и функциональная активность органов детоксикации по выведению эндотоксинов

В результате описанных выше процессов в организме крыс с ОЛ значительно увеличивалась интенсивность образования эндогенных токсических веществ. В настоящее время общепризнанным является тот факт, что метаболические расстройства при синдроме ЭИ приводят к образованию и поступлению в кровоток веществ, которые объединяют под общим названием МСМ и считают основным маркером ЭИ (Добротина, Копытова, 2004; Копытова, 2007). Поэтому на следующем этапе исследований было рассмотрено распределение поступивших из первичных очагов образования и образовавшихся вторично МСМ в плазме, эритроцитах и моче.

По нашим данным при адrenaловом ОЛ развивалась третья стадия ЭИ (по классификации В.В. Чаленко, Ф.Х. Кутушева, 1990) - стадия полного насыщения. Она характеризовалась значительным повышением содержания МСМ на эритроцитах (на 68,4%, рис. 6) и увеличенной концентрацией МСМ в плазме (на 16,3%). В моче крыс контрольной группы концентрация МСМ снижалась по сравнению с интактной на 58,3%. Это свидетельствовало о нарушениях системы выведения данных соединений и накоплении в организме избыточного их количества.

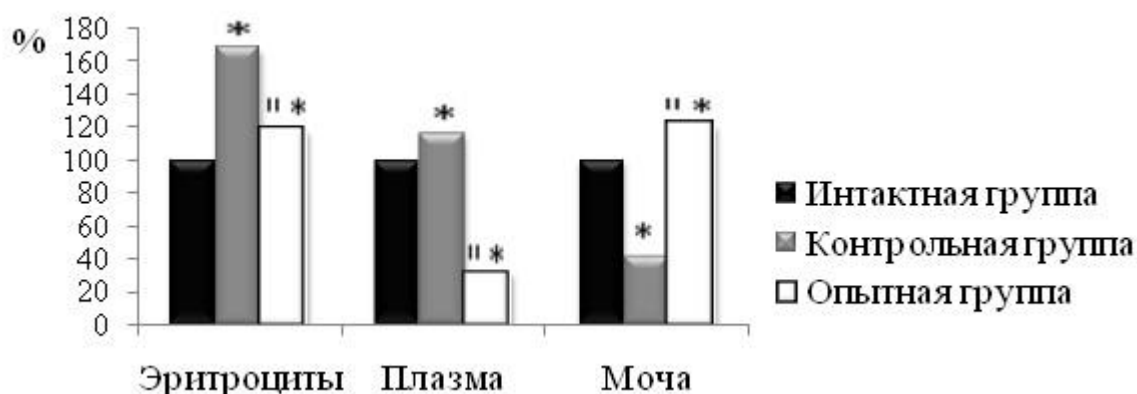
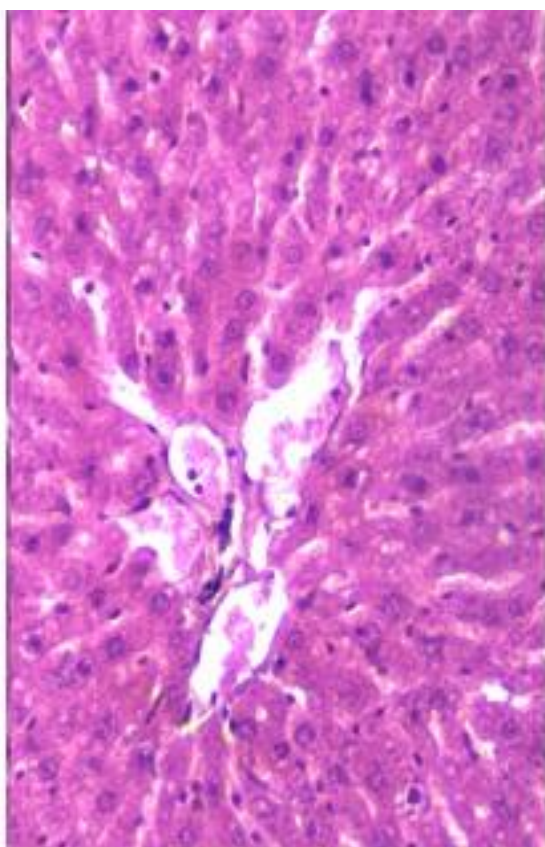


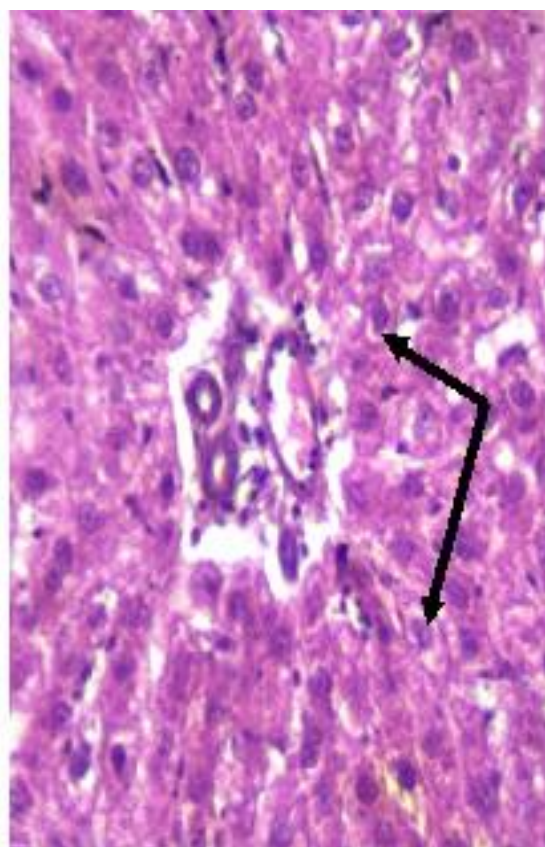
Рис. 5. Содержание МСМ плазмы крови, эритроцитов и мочи крыс с отеком легких.

Примечание: * - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к интактной группе; ** - статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

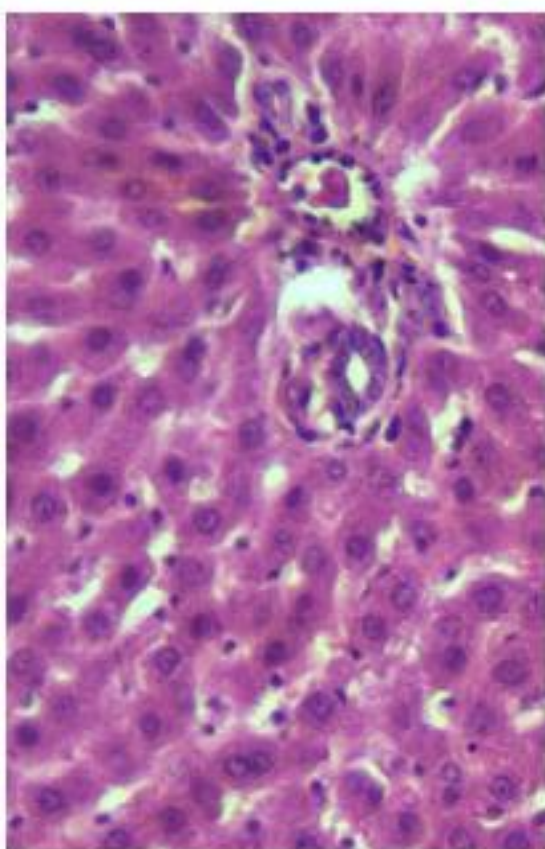
Увеличение продукции МСМ в организме приводило к напряжению и нарушению детоксикационных возможностей печени, что подтверждали гистологические исследования. На гистологических срезах печени (рис. 6) интактной группы наблюдалась классическая дольчатая структура органа, со стороны кровоснабжения не отмечалось каких-либо нарушений. Встречались единичные изменения гепатоцитов по типу зернистой дистрофии.



I



II



III

Рис. 6. Гистологические срезы печени (х60, гематоксилин-эозин): I – интактная группа, II – контрольная группа; III – опытная группа; стрелками указана вакуольная дистрофия.

У крыс контрольной группы наблюдалось сохранение дольчатости строения органа. Однако, выявлялись нарушения кровоснабжения – малокровие микроциркуляторного русла печени, и, как следствие, гипоксия. Со стороны гепатоцитов как в центре, так и на периферии отмечались отчетливо выраженные дистрофические изменения по типу зернистой дистрофии, в некоторой степени до вакуольной. Эти нарушения были вызваны повышением активности ПОЛ, гипоксией, усилением детоксикационной и синтетической нагрузки. Гепатоцит является одним из основных центров детоксикации в печени, поэтому у контрольных животных снижалась детоксикационная активность печени, что отражалось и на выведении токсинов с соответствующим уменьшением элиминации.

Таким образом, при ОЛ снижалась функциональная активность органов детоксикации и выведения эндогенных токсинов, что способствовало их накоплению в организме и усугубляло ЭИ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при ОЛ развитие синдрома ЭИ происходило по классическому пути.

Влияние ингаляции средства «Апингалин» на эндогенную интоксикацию в организме крыс с экспериментальным отеком легких

В отличие от контрольной группы животных, ингаляционное введение «Апингалина» в опытной группе приводило к уменьшению ЭИ у крыс.

После десятидневных ингаляций средством «Апингалин» состояние ткани легких крыс опытной группы значительно улучшилось (рис. 1). Наблюдалось снижение содержания жидкости в альвеолах и окружающей их ткани. Практически не обнаруживались разрушения ткани. Соответственно, уменьшался выход токсических веществ из поврежденных клеток.

Очищение альвеол от жидкости и белка у опытной группы животных снижало уровень гипоксии в организме, уменьшая активность ПОЛ. Входящие в состав средства флавоноиды обладают выраженным антиоксидантным действием (Inokuchi et al., 2006; Guo et al., 2007; Ahn et al., 2009). Поэтому, в плазме крови снижалась концентрация продуктов разных стадий ПОЛ: МДА - на 97,4%, ДК - на 41,5%, ТК - на 21,3%, а также ОШ - на 8,0% по сравнению с контрольными животными (рис 2).

Таким образом, пул эндогенных токсинов, попавших в кровь из патологического очага, уменьшался.

Снижение нагрузки на биотранспортные системы токсинов способствовало улучшению их функции. Отмечалось значительное повышение СЕЭ у опытной группы крыс на 48,8% по сравнению с контролем (рис. 3). Концентрация альбумина в плазме крови крыс опытной группы повышалась на 27,2%, а ЛПОНП и ЛПНП - на 27,9% по сравнению с контролем (рис. 2). Возможно, полученные изменения связаны с уменьшением интенсивности окислительных и протеолитических реакций в связи с улучшением морфофункционального состояния легких.

Снижение образования первичных эндогенных токсинов уменьшало интенсивность возникновения вторичных токсических веществ и напряжение

регуляторных и защитных систем. Как результат, у опытной группы крыс выявлялось уменьшение метаболических нарушений. В ходе исследований было показано, что в опытной группе содержание общего белка плазмы крови повышалось на 54,4% по сравнению с контролем, фибриногена - на 11,9% (рис. 4). При сравнении полученных данных о соотношении белков в сыворотке, было обнаружено, что белковый состав сыворотки крыс опытной группы приближается к таковому интактной (табл. 2). Так, доля альбуминов выросла на 5,2% по сравнению с контролем, а α -глобулинов снизилась на 5,0%. Нормализация белкового состава плазмы указывала на улучшение синтетической активности печени, снижение интенсивности протеолитических реакций, восстановление равновесия между катаболическими и анаболическими процессами.

Аналогичные изменения были получены при анализе фосфолипидного спектра плазмы крови после курсовой ингаляции препаратом «Апингалин» (табл. 3). Было обнаружено достоверное снижение доли ЛФХ – на 9,1%, на фоне повышения доли ФХ и ФЭА по сравнению с контрольными животными. Результаты сопоставимы с таковыми интактной группы. По нашему мнению, это связано со снижением активности ПОЛ, что уменьшает появление мембранодеструктивных фракций.

Описанные выше результаты свидетельствуют о снижении скорости образования вторичных токсинов и продуктов патологической регуляции. Уменьшение метаболических нарушений, возможно, связано с наличием в составе маточного молочка фосфолипидов и белков (Крылов и др., 2007; Stocker, 2003), а также стимулирующим действием на обмен веществ прополиса и маточного молочка (Крылов и др., 2007; Münstedt et al., 2009; Ramos et al., 2007).

Из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что общая интенсивность образования эндогенных токсинов в организме крыс опытной группы снижалась на всех исследуемых этапах развития ЭИ. Соответственно этому после курса ингаляций средством «Апингалин» наблюдалось перераспределение МСМ по средам организма.

После ингаляций средством происходило снижение общей токсичности крови (рис. 4): уменьшение МСМ на эритроцитах на 49,8% по сравнению с контролем, а в плазме – на 84,4%. В моче концентрации МСМ значительно повышалась (на 80,5% по сравнению с контролем), следовательно, улучшалась функциональная активность почек. Эти данные соответствовали I стадии развития ЭИ – латентной.

Улучшалось и состояние печени. На гистологических срезах печени у опытной группы крыс четко определялась дольчатость строения органа. Кровоснабжение печени - в норме. Отмечались единичные гепатоциты с зернистой дистрофией, не превышавшие количеством таковых на срезах печени интактной группы животных. Как в центре, так и на периферии долек в гепатоцитах наблюдалась выраженная митотическая активность. Отмечалась нормальная структура желчных ходов.

Исходя из этого, ингаляции «Апингалина» способствовали детоксикации и выведению МСМ из организма. Образовавшиеся в процессе развития ОЛ эндогенные токсины вовремя детоксицировались и элиминировались, что уменьшало выраженность ЭИ. Мы предполагаем, что средство способствовало не только снижению свободнорадикальной активности, но и выведению азотсодержащих токсинов, которые образуют большую часть пула МСМ, аналогично нитратам. Ишмуратовой и др. (2007) было показано, что при отравлении нитратами маточное молочко выводило исследуемые ксенобиотики из организма. Кроме того, прополис оказывает выраженные гепатопротекторные свойства, связанные с производными кофейной кислоты (Узбекова, Котова, 2008; Castaldo et al., 2002). В маточном молочке содержатся фосфолипиды - широко известные гепатопротекторы. Все это способствовало улучшению детоксикационной активности печени.

На основании полученных нами данных можно сделать заключение о выраженных детоксикационных свойствах средства «Апингалин». Доказательством служит то, что у опытной группы животных после курса ингаляций наблюдалась стадия развития ЭИ, сопоставимая с I – латентной. В отличие от этого, у контрольной группы животных развивалась III стадия – стадия полного насыщения организма эндогенными токсинами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных нами и имеющихся литературных данных, мы предлагаем схему механизма формирования ЭИ при ОЛ. Развитие у крыс ОЛ приводит к возникновению эндогенных токсических веществ при разрушении тканей легких и активации ПОЛ. Перенасыщение транспортных систем эндогенными токсинами вызывает нарушения в системе их биотранспорта. Избыточное появление МСМ опосредовано не только выходом в кровь эндогенных токсинов из патологического очага, но и их взаимодействием и вторичной деградацией биополимеров и мембран, что вызывает появление вторичных токсинов. Данные процессы могут происходить по типу «порочного круга», что служит причиной сдвигов рассматриваемых гомеостатических показателей плазмы и снижает функциональную активность печени и почек. Нарушения в системе биотрансформации и выведения приводят к задержке эндогенных токсинов, усугубляя ЭИ.

Проведенные нами исследования показали, что средство на основе маточного молочка и прополиса «Апингалин» воздействует на разные звенья развития ЭИ. Оно замедляет процессы первичного образования эндогенных токсинов, стимулируя восстановление разрушенных тканей и подавляя процессы ПОЛ. Ингаляции способствуют восстановлению системы биотранспорта субстрата ЭИ, что снижает общую токсичность плазмы и вероятность образования вторичных токсинов. Таким образом, нарушения состава фосфолипидов и белков плазмы сводятся к минимуму. Соответственно, происходит снижение содержания МСМ в крови.

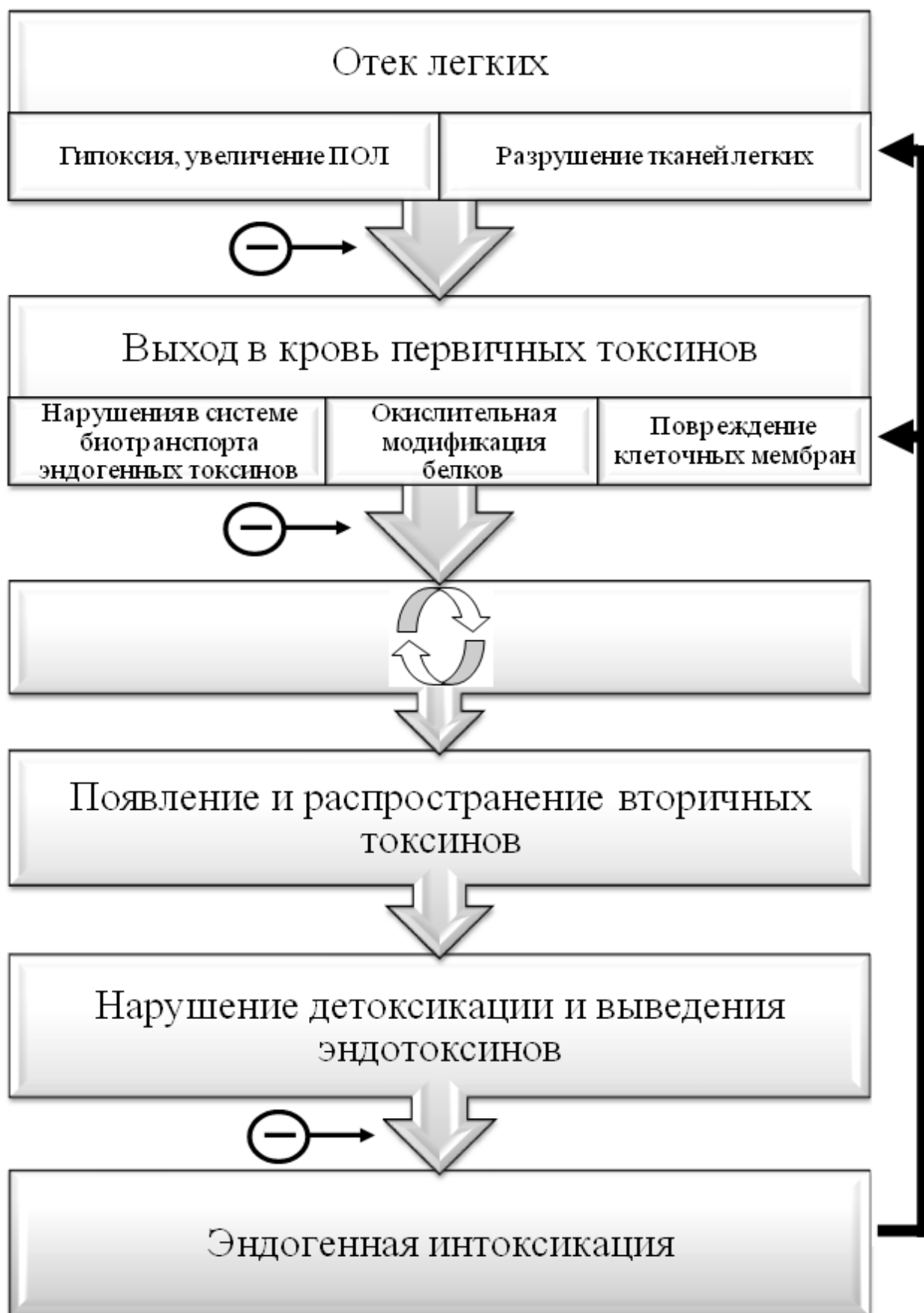


Рис. 5. Схема формирования эндогенной интоксикации при адrenaловом отеке легких у крыс и ее модификации средством «Апингалин».
 Примечание: $\ominus \rightarrow$ – ингибирование препаратом процессов развития эндогенной интоксикации.

Вместе с тем, компоненты препарата стимулируют деятельность детоксикационных и выделительных систем организма, способствуя выведению МСМ. Все вышесказанное является причиной уменьшения выраженности ЭИ. Поэтому у опытной группы животных после курса ингаляций наблюдалась I стадия развития ЭИ. В отличие от этого, у контрольной группы крыс развивалась III стадия. Следовательно, ингаляционное средство на основе маточного молочка и прополиса может снижать уровень эндогенной интоксикации, что показано нами на модели отека легких у крыс.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании адреналового отека легких у крыс развивается эндогенная интоксикация вследствие разрушения тканей легких и стимуляции ПОЛ, что увеличивает концентрацию в плазме МДА, ДК, ТК и ОШ.

2. Появление в крови эндогенных токсинов приводит к нарушениям в биотранспортной системе токсинов – снижению сорбционной емкости эритроцитов, концентрации альбумина, ЛПОНП и ЛПНП, а также к снижению концентрации общего белка и фибриногена, перераспределению фракций белков и фосфолипидов.

3. Увеличивается содержание МСМ в плазме и на эритроцитах, ухудшается функциональная активность печени и почек, что приводит к снижению содержания МСМ в моче.

4. Курс ингаляций средством «Апингалин» при моделировании адреналового отека легких у крыс способствует снижению интенсивности формирования эндогенной интоксикации: уменьшению выброса эндогенных токсинов в кровь из ткани легких, снижению активности ПОЛ, восстановлению системы биотранспорта эндогенных токсинов, повышению сорбционной емкости эритроцитов, концентрации альбумина, ЛПОНП и ЛПНП; повышению концентрации общего белка, фибриногена и нормализации соотношения фракций фосфолипидов и белков.

5. После ингаляций средством «Апингалин» наблюдается снижение выраженности эндогенной интоксикации, что характеризуется уменьшением содержания МСМ в плазме и на эритроцитах, восстановлением функциональной активности печени и почек.

**Список работ Анашкиной (Пашкиной) А.А., опубликованных по теме
диссертации**

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Копылова С.В. Влияние препарата «Апингалин» на некоторые показатели эндогенной интоксикации при отеке легких у крыс / С.В. Копылова, **А.А. Анашкина**, Ю.А. Старателева // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. - №2. - 2010. - С.532-535.

2. **Анашкина А.А.** Детоксицирующие свойства апингалина / А.А. Анашкина, Ю.А. Старателева, С.В. Копылова, В.Н. Крылов // Пчеловодство. - №8. - 2010. - С 52-53.

3. **Анашкина А.А.** Влияние Апингалина на белки и фосфолипиды крови крыс при моделировании отека легких / А.А. Анашкина, С.В. Копылова, В.Н. Крылов // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. - №2. - 2011. - С.169-173.

В других изданиях:

4. **Пашкина А.А.** Изучение детоксикационных свойств ингаляционных препаратов «Апингалин» и «Апингалин-Q» при отеке легких у крыс / А.А. Пашкина // Материалы 61-ой научной студенческой конференции биологического факультета «Биосистемы: организация, проведение, управление». – Нижний Новгород: ННГУ, 2008. - С. 27-28.

5. Копылова С.В. Детоксикационные свойства ингаляционных препаратов «Апингалин» и «Апингалин-Q» при отеке легких у крыс / С.В. Копылова, **А.А. Пашкина** // Материалы международной научно-практической конференции «Инновации в пчеловодстве». Адлер, 2008. – Рыбное: НИИП, 2009. - С. 264-266.

6. Копылова С.В. Действие препарата «Апингалин-Q» на лейкоцитарную формулу крови крыс при отеке легких / С.В. Копылова, Е.В. Крылова, **А.А. Пашкина** // Материалы международной научно-практической конференции «Инновации в пчеловодстве». Адлер, 2008. - Рыбное: НИИП, 2009. - С. 266-267.

7. **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. – М. – Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. - С 26-27.

8. **Анашкина А.А.** Изучение влияния ингаляционного комплекса «прополис - маточное молочко» на кристаллогенез сыворотки крови крыс при отеке легких / А.А. Анашкина, С.В. Копылова, А.К. Мартусевич // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». – Нижний Новгород, 2010. - С. 119.

9. **Анашкина А.А.** Кристаллогенез сыворотки крови крыс при отеке легких / А.А. Анашкина, С.В. Копылова, А.К. Мартусевич // VI Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации»: тезисы докладов. – Иваново, 2010. - С. 334.

10. Гришина А.А. Биокристаллоскопические методы при оценке действия различных стрессирующих факторов / А.А. Гришина, А.К. Мартусевич, **А.А. Анашкина** // VI Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации»: тезисы докладов. – Иваново, 2010. - С. 339.

11. Копылова С.В. Влияние препарата прополиса и маточного молочка на показатели эндогенной интоксикации крыс при экспериментальном отеке легких / С.В. Копылова, **А.А. Анашкина**, Ю.А. Старателева, В.Н. Крылов // Материалы Международного форума пчеловодов «Мордовский мед». – Саранск, 2010. - С. 32-34.

12. **Анашкина А.А.** Влияние Апингалина на уровень эндогенной интоксикации при отеке легких у крыс / А.А. Анашкина, С.В. Копылова, С.С. Сокольский // Материалы Международной научно-практической конференции «Пути развития пчеловодства в России, странах СНГ и Дальнего Зарубежья». – Москва: ВК «Узоречье», 2011. - С. 129-133.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДК – диеновые конъюгаты
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
ЛФХ – лизофосфотидилхолин
МДА – малоновый диальдегид
МСМ – молекулы средней массы
ОЛ – отек легких
ОШ – основания Шиффа
СЕЭ – сорбционная емкость эритроцитов
СМ – сфингомиелин
ТК – триеновые конъюгаты
ФХ – фосфотидилхолин
ФЭА - фсфртидилэтаноламин
ЭИ – эндогенная интоксикация