

УДК 616.24-08-091:547.458:[615.324+577.163.2/164.2]:599.324.4

О.А. Лебедько, Б.Я. Рыжавский, Д.И. Жильников

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭХИНОХРОМ А, ТОКОФЕРОЛ И АСКОРБИНОВУЮ КИСЛОТУ, НА ЛЕГКИЕ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ВВЕДЕНИЮ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

¹Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» –
НИИ охраны материнства и детства,

680022, ул. Воронежская, 49, кор. 1, тел. 8-(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru;

²Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-30-53-11, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск

Резюме

Однократное внутривентральное введение липополисахарида Coli026:B6 вызывало через сутки выраженные изменения легких крыс: массивную лимфоидную перибронхиальную инфильтрацию, увеличение объемной плотности межальвеолярной соединительной ткани, количества в ней макрофагов. Интрагастральное введение препарата, содержащего эхинохром, токоферол и аскорбиновую кислоту, предшествующее введению липополисахарида, существенно уменьшило выраженность патологических изменений легких, развивающихся под его влиянием.

Ключевые слова: липополисахариды, легкие, патология, эхинохром, витамины.

O.A. Lebedko, B.Ya. Rizhavskii, D.I. Zhilnikov

EFFECT OF MEDICATION CONTAINING HISTOCHROME A, TOCOPHEROL AND ASCORBIC ACID ON THE LUNGS OF RATS SUBJECTED TO LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION

¹Khabarovsk branch of the Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration –
Research Institute of Maternity and Childhood Protection;

²Far Eastern State Medical university, Khabarovsk

Summary

A single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide Coli026:B6 caused pronounced changes in the lungs of rats a day later: massive lymphoid peribronchial infiltration, an increase in the volume density of interalveolar connective tissue, the number of macrophages in it. Intragastric administration of the medication containing esinochrome, tocopherol and ascorbic acid, preceding the introduction of lipopolysaccharide, significantly reduced the severity of pathological changes in the lungs that develop under its influence.

Key words: lipopolysaccharides, lungs, pathology, echinochrome, vitamins.

Высокая распространенность патологии дыхательной системы, недостаточная эффективность терапии этих заболеваний обуславливают поиск новых средств их лечения. Одним из направлений этого поиска является изучение веществ природного происхождения. К ним относится, в частности, эхинохром А (Эх), выделенный из тканей морских ежей, обладающий выраженной способностью ингибировать свободнорадикальное окисление (СРО), степень повреждения биологических мембран при его активации [15]. Установлено также, что Эх и препарат, содержащий Эх, токоферол и аскорбиновую кислоту, уменьшает интенсивность СРО, альтерации, склерозирования в легких неполовозрелых крыс, подвергну-

тых воздействию блеомицина, липополисахарида (ЛПС) [5, 6, 14]. ЛПС являются активными индукторами воспаления, приводят к увеличению образования свободных радикалов, усилению выработки цитокинов, активации иммунных клеток, выбросу медиаторов воспаления. При этом тяжесть повреждений, развивающихся под их влиянием особенно ярко выражена в легких, в связи с чем они могут служить «маркером» тяжести последствий воздействия ЛПС [3, 4, 13]. Настоящая работа является продолжением исследований влияния Эх на последствия действия агентов, активирующих СРО. Она посвящена изучению влияния Эх на легкие взрослых крыс, подвергнутых введению ЛПС.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено в соответствии с принципами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях». Оно выполнено на взрослых 6-8-месячных крысах линии Вистар, разделенных из 3 группы. Животным опытной группы ($n=6$) интрагастрально был введен препарат, состоящий из Эх, токоферола и аскорбиновой кислоты (из расчета 10 мг/кг Эх), и затем, через 30 минут, внутривентрально, ЛПС Coli 026:B6 (2,5 мг/кг). Животным контрольной группы ($n=6$) был введен только ЛПС в той же дозе. 3-я группа состояла из интактных крыс ($n=6$). Животные всех групп содержались одновременно в условиях одного вивария, корм и воду получали в свободном доступе *ad libitum*. Этаназия проводилась декапитацией под легким эфирным наркозом. Для морфологического исследования

легкие фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин, срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На криостатных срезах толщиной 10 мкм проводили реакцию на НАДН-дегидрогеназу (НАДН-Д) по [7]. Время реакции составляло 30 минут. На этих же срезах проводили методом точечного счета [1] определение соотношения площади среза, занимаемой межальвеолярными перегородками и просветами альвеол, а также объемную плотность НАДН-Д-позитивных макрофагов в межальвеолярных перегородках. Результаты морфометрии обрабатывались на программе Statistica с использованием опции «Дескриптивная статистика». Подсчитывались средний арифметический показатель, стандартная ошибка среднего показателя. Различия между группами оценивались по *t*-критерию Стьюдента. Межгрупповые различия считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение крысам ЛПС (контрольная группа) привело к значительным изменениям как в воздухоносном, так и в респираторном отделах легких. Они проявлялись, во-первых, выраженной лимфоидной инфильтрацией стенок бронхов. Некоторые из них были окружены по всему периметру «муфтой» из лимфоидной ткани. Ее толщина в отдельных участках превышала 500 мкм (рис. 1). Во-вторых, в межальвеолярной соединительной ткани наблюдались многочисленные очаги периваскулярного отека и инфильтрации, содержащие макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы. Кроме того, имелись участки органа со значительным утолщением межальвеолярных перегородок, уменьшенными размерами просветов альвеол (рис. 1, 2).

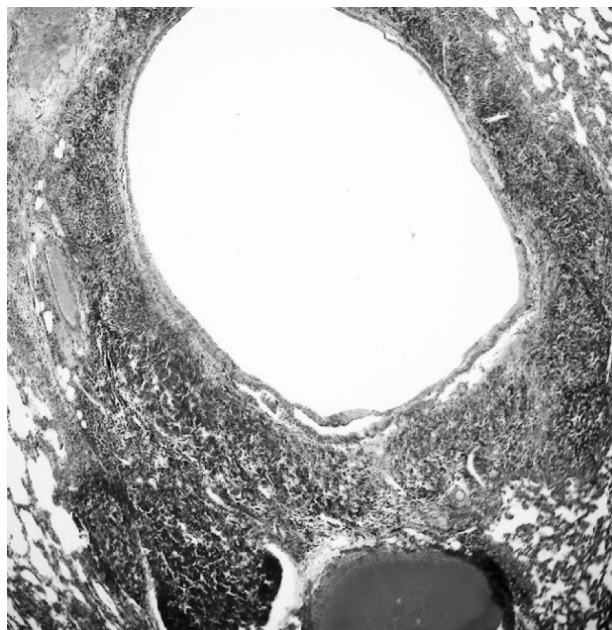


Рис. 1. Легкое крысы контрольной группы (введение ЛПС). Выраженная лимфоидная инфильтрация по всему периметру бронха. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 15×15

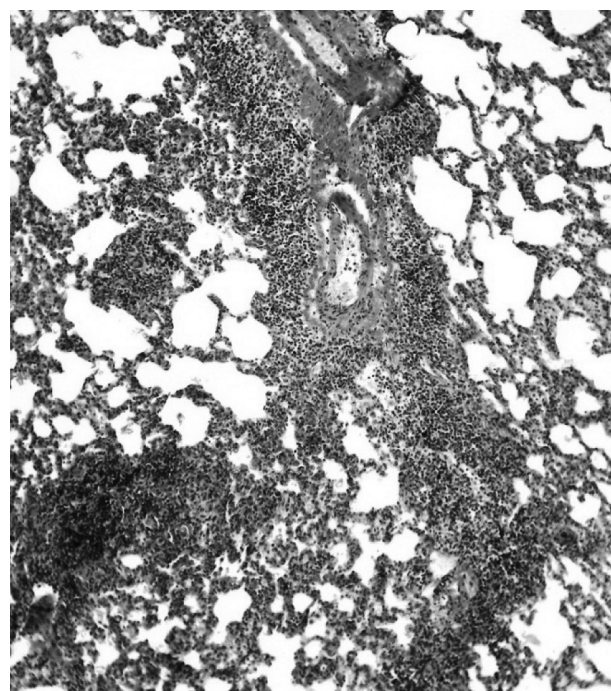


Рис. 2. Легкое крысы контрольной группы (введение ЛПС). Утолщение межальвеолярных перегородок, их лейкоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 15×15

При обзорном изучении криостатных срезов, на которых проводилась реакция на НАДН-Д, выявля-

лось, что в группе животных, которым вводили ЛПС, в респираторных отделах легкого имелось увеличение относительного объема межальвеолярных перегородок и уменьшение – просветов альвеол (рис. 4). Морфометрическое исследование показало, что отношение *межальвеолярные перегородки/просветы альвеол* при этом возрастало с $1,05\pm0,12$ до $1,42\pm0,11$ ($P<0,05$).

Изучение реакции на НАДН-Д, отражающей интенсивность внутримитохондриального окисления [12], показало, что большинство клеток соединительной ткани, расположенных в стенках бронхов, артерий и вен, имели слабую активность фермента. В противоположность этому, в межальвеолярных перегородках, а также в просветах альвеол обна-

руживается значительное число макрофагов, дающих интенсивную реакцию на этот фермент. Они обычно имели размеры 9-12 мкм, преимущественно угловатую, полигональную или отростчатую форму, округлое или бобовидное, не окрашенное продуктом реакции, ядро (рис 3, 4). Данные литературы свидетельствуют о том, что на долю этих клеток, имеющих костномозговое, моноцитарное происхождение, приходится 10-15 % от всех клеток межалвеолярных перегородок и 77-96 % клеток бронхоальвеолярной жидкости [10]. Высокая активность в них НАДН-Д объясняется тем, что в макрофагах на долю митохондрий приходится значительная часть объема цитоплазмы – более 30 % [10]. Благодаря высокой активности фермента в макрофагах они ярко маркировались при примененной гистохимической реакции на НАДН-Д. Как отмечено выше, межалвеолярные перегородки у крыс контрольной группы были утолщены, а их объемная плотность увеличена. Морфометрическое изучение показало, что объемная плотность макрофагов в межалвеолярных перегородках крыс контрольной группы была близка к таковой у intactных крыс ($45 \pm 8,9\%$ и $46 \pm 8,8\%$ соответственно). Поскольку отношение *межалвеолярные перегородки/просветы альвеол* у животных, которым был инъецирован ЛПС, было увеличено, суммарное количество макрофагов в интерстициальной ткани в легких животных контрольной группы возрастало. Данное изменение легких под воздействием ЛПС заслуживает внимания в связи с тем, что эти клетки обладают секреторной активностью, способностью к участию в иммунных процессах и их регуляции [8, 10]. Эти изменения, развившиеся под влиянием ЛПС, представляют интерес и в связи с тем, что митохондрии, в которых происходят НАДН-Д-зависимые процессы биологического окисления [12], являются продуцентами активных форм кислорода, участвующих в регуляции иммунных реакций, с одной стороны, и способных оказывать повреждающее действие на различные структуры тканей, с другой [9].

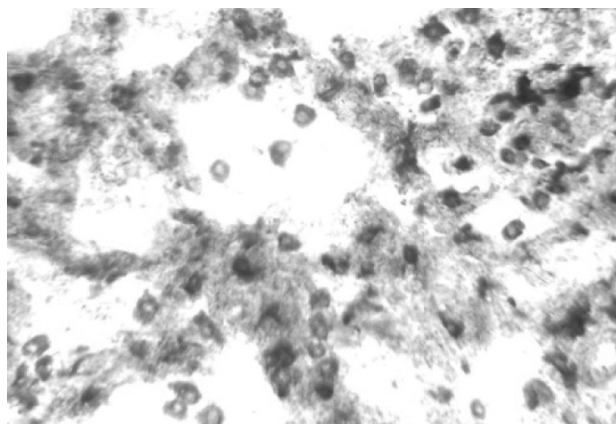


Рис. 3. Легкое крысы, подвергнутой введению ЛПС (контрольной группы). Реакция на НАДН-Д. Макрофаги в межалвеолярных перегородках и просветах альвеол. Увеличение 40×15

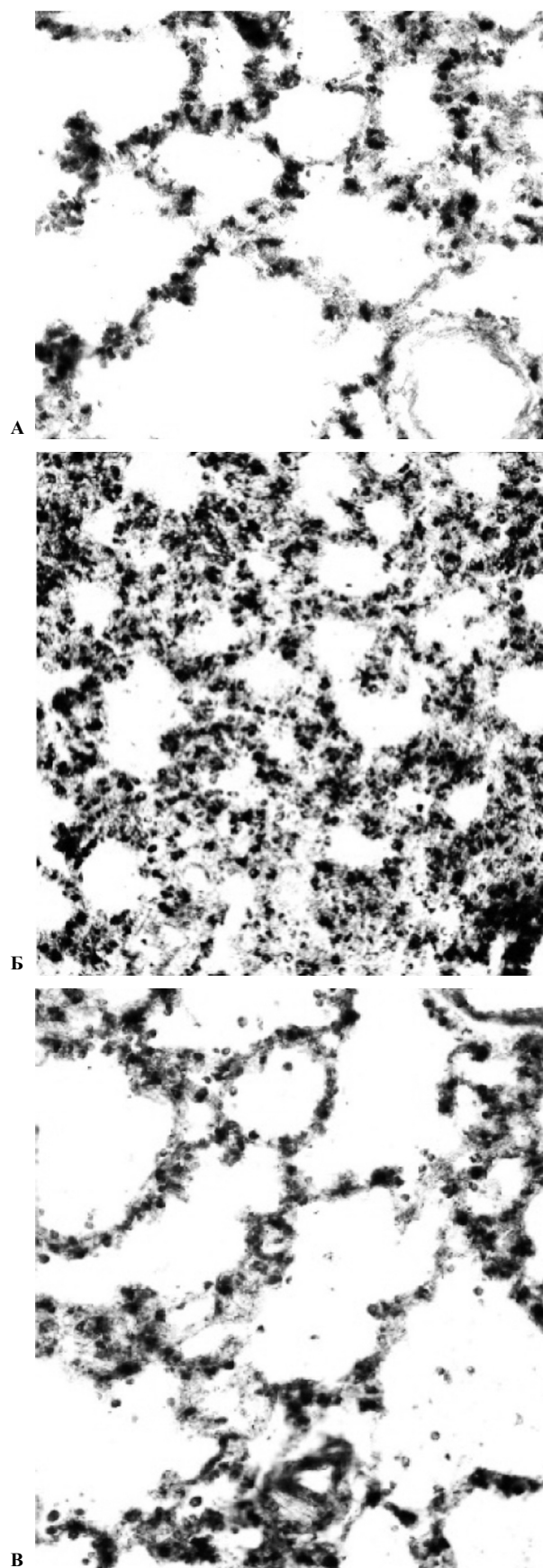


Рис. 4. Легкое крыс: intactной (А), получавшей ЛПС (контрольной группы) (Б), и ЛПС и препарат (В). Реакция на НАДН-Д. Увеличение 20×15. В утолщенных межалвеолярных перегородках крысы контрольной группы увеличенное число НАДН-Д-позитивных макрофагов. Увеличение 20×15

Введение препарата, содержавшего Эх, оказало влияние на легкие крыс, которым был инъецирован ЛПС. В отличие от контроля, в них не обнаруживались массивные перибронхиальные лимфоидные инфильтраты, реже наблюдались периваскулярные лейкоцитарные инфильтраты в межалвеолярных перегородках. При этом они имели меньшие, чем в контроле, размеры (рис. 5). Морфометрическое изучение отношения *межалвеолярные перегородки/просветы альвеол* показало, что оно было близко к таковому у интактных животных и достоверно меньше, чем в контроле ($0,95 \pm 0,12$ против $1,42 \pm 0,11$, $P < 0,05$), что обуславливалось отсутствием утолщения межалвеолярных перегородок (рис. 4, 5). Объемная плотность макрофагов в них при этом не имела существенных отличий от наблюдавшейся у животных контрольной группы ($50 \pm 3,4$ % против $45 \pm 8,9$ %). Поскольку удельный объем межалвеолярных перегородок в легких крыс данной группы был меньше, чем в контрольной, можно полагать, что суммарное число макрофагов в легких животных опытной группы было меньше такового в легких крыс контрольной группы. Оценивая эти факты, можно предполагать, что введение препарата, содержавшего Эх, уменьшало миграцию в легкие предшественников макрофагов, возрастающую при действии ЛПС, оказывающих влияние на различные системы организма [2, 4, 11].

Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение взрослым крысам ЛПС Coli026:B6 привело через одни сутки к выраженным морфологическим изменениям легких. Они обнаруживались как в бронхах, которые окружались массивными лимфоидными инфильтратами, так и в респираторном отделе – стенках альвеол, межалвеолярных перегородках, прояв-

ляясь их утолщением, лейкоцитарной инфильтрацией, большим количеством макрофагов. Предшествующее инъекции ЛПС введение крысам препарата, содержавшего Эх, токоферол и аскорбиновую кислоту, существенно уменьшило степень перечисленных патологических изменений легких у подопытных животных. Эти результаты, вместе с полученными ранее данными [5, 6, 14], позволяют считать, что исследованный препарат, содержащий Эх, обладает способностью значительно уменьшать действие повреждающих легкие агентов как у неполовозрелых, так и у взрослых животных.

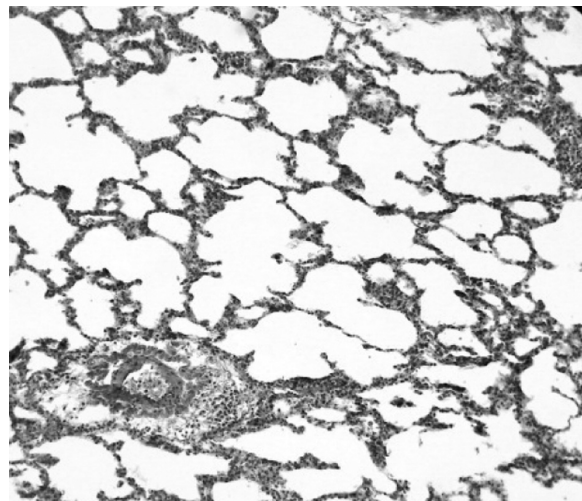


Рис. 5. Легкое крысы, подвергнутой введению ЛПС и препарата. Периваскулярная лейкоцитарная инфильтрация, небольшие участки утолщения межалвеолярных перегородок. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение 15×15

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Галазян Н.М., Белая О.Ф., Малов В.А. и соавт. Липополисахариды – эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – № 2. – С. 11-16.
3. Калашникова С.А., Полякова Л.В. Использование бактериального липополисахарида для моделирования патологических процессов в медико-биологических исследованиях (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. – 2017. – № 2. – С. 209-219.
4. Косырева А.М., Диатроптов М.Е. Морфологические проявления системного воспалительного ответа в печени и легких в разные фазы эстрального цикла // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 2. – С. 111-114.
5. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Кузнецова М.С. и соавт. Влияние эхинохрома А на показатели эндогенной интоксикации при блеомицин-индуцированном пневмофиброзе у белых крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза // Дальневосточный медицинский журнал. – 2019. – № 3. – С. 65-70.
6. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Ткач О.В. и соавт. Влияние перорального введения Эхинохрома А на структурно-метаболические нарушения, индуцированные блеомицином в легких крыс, на раннем этапе постнатального онтогенеза // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 3. – С. 92-96.
7. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1982. – 270 с.
8. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких // Медицинская иммунология. – 2017. – № 6. – С. 657-672.
9. Пинегин Б.В., Воробьева Н.В., Пашенков М.В., Черняк Б.В. Роль митохондриальных активных форм кислорода в активации врожденного иммунитета // Иммунология 2018. – № 4. – С. 221-229.
10. Руководство по гистологии. Т. 1-2 / Под редакцией Р.К. Данилова. – СПб.: СпецЛит, 2011. – 510 с.
11. Рыжавский Б.Я., Лебедько О.А., Лазинская О.В. и соавт. Морфологические изменения головного мозга одномесечных крыс под влиянием липополисахарида // Дальневосточный медицинский журнал. – 2017. – № 4. – С. 69-73.
12. Страйер Л. Биохимия: Т. 2. – М.: Мир, 1985. – 312 с.
13. Чайлахян Р.К., Аверьянов А.В., Забозлаев Ф.Г. и соавт. Сравнительное исследование эффективности трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии, и их кондиционированных сред на модели острого повреждения легких // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 1. – С. 25-32.
14. Kuznetsova M., Lebed'ko O., Ryzhavskii B., Mishchenko N. Effect of oral administration of echinochrome on lipopolysaccharide-induced lung injury in the

immature Wistar rats // European Respiratory Journal. – 2019. – Vol. 54 (suppl. 63).

15. Lebedev A.V., Ivanova M.V., Levitsky D.O.

Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems // Life Sci. – 2005. – № 76 (8). – P. 863-875.

Literature

1. Avtandilov G.G. Medical morphometry. – M.: Medicine, 1990. – 384 p.

2. Galazyan N.M., Belaya O.F., Malov V.A., et al. Lipopolysaccharides – endotoxins of gram-negative bacteria: role in the development of intoxication // Epidemiology and Infectious Diseases. – 2014. – № 2. – P. 11-16.

3. Kalashnikova S.A., Polyakova L.V. Use of bacterial lipopolysaccharide for modeling pathological processes in biomedical research (literature review) // Bulletin of New Medical Technologies. – 2017. – № 2. – P. 209-219.

4. Kosyreva A.M., Diatroptov M.E. Morphological manifestations of the systemic inflammatory response in the liver and lungs in different phases of the estrous cycle // Immunology. – 2013. – Vol. 34, № 2. – P. 111-114.

5. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Kuznetsova M.S., et al. Influence of echinochrome A on endogenous intoxication in white rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the early stage of postnatal ontogenesis // Far Eastern Medical Journal. – 2019. – № 3. – P. 65-70.

6. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Tkach O.A., et al. The influence of oral administration of echinochrome A on bleomycin-induced pulmonary structural and metabolic disorders in the early stage of postnatal ontogenesis // Far Eastern Medical Journal. – 2016. – № 3. – P. 92-96.

7. Loida Z., Gossrau R., Shibler T. Enzyme histochemistry. – M.: Mir, 1982. – 270 p.

8. Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Characteristics and role of different populations of macrophages

in the pathogenesis of acute and chronic lung diseases // Medical Immunology. – 2017. – № 6. – P. 657-672.

9. Pinegin B.V., Vorobyova N.V., Pashchenkov M.V., Chernyak B.V. The role of mitochondrial reactive oxygen intermediates in the activation of innate immunity // Immunology. – 2018. – № 4. – P. 221-229.

10. A Guide on Histology. – Vol. 1-2. / Ed. by R.K. Danilov. – Saint Petersburg: SpetsLit, 2011. – 510 p.

11. Ryzhavsky B.Ya., Lebedko O.A., Lazinskaya O.V., et al. Morphological changes in the brain of one-month-old rats under the influence of lipopolysaccharide // Far Eastern Medical Journal. – 2017. – № 4. – P. 69-73.

12. Straer L. Biochemistry: Vol. 2. – M.: Mir, 1985. – 312 p.

13. Chailakhyan R.K., Averyanov A.V., Zabozaev F.G., et al. Comparative study of the efficiency of transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow, cultured under conditions of normoxia and hypoxia, and their conditioned media. – P. 25-32.

14. Kuznetsova M., Lebed'ko O., Ryzhavskii B., Mishchenko N. Effect of oral administration of echinochrome on lipopolysaccharide-induced lung injury in the immature Wistar rats // European Respiratory Journal. – 2019. – Vol. 54 (suppl. 63).

15. Lebedev A.V., Ivanova M.V., Levitsky D.O. Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems // Life Sci. – 2005. – № 76 (8). – P. 863-875.

Координаты для связи с авторами: Лебедево Ольга Антоновна – д-р мед. наук, директор Хабаровского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – НИИ охраны материнства и детства; Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-76-13-96; Жильников Дмитрий Игоревич – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ.



<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2020-4-65-69>

УДК 612.015.348:591.3.615

Е.Н. Сазонова^{1,3}, Е.Ю. Самарина¹, А.В. Ильиных², О.А. Сазонов¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КИСЛОТНЫХ ЭРИТРОГРАММ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕМБРАНОТРОПНОГО ЭФФЕКТА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-30-53-11, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²КГБУЗ «Перинатальный центр» министерства здравоохранения Хабаровского края,
680028, ул. Истомина, 85, тел. 8-(4212)-45-40-03;

³Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» –
НИИ охраны материнства и детства,
680022, ул. Воронежская, 49, кор. 1, тел. 8-(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск

Резюме

Методом кислотных эритрограмм изучали мембранотропное действие биологически активных пептидов (БАП). Инкубация на воздухе суспензии эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия вызывала снижение их устойчивости к кислотному гемолизу: уменьшалась продолжительность гемолиза, снижалась суммарная стойкость эритроцитов. Инкубация на воздухе суспензии эритроцитов с добавлением растворов БАП (10^{-8} М) изменяла резистентность эритроцитов к гемолизу. Установлено, что БАП: неопиатный аналог лей-энкефалина