



УДК 616.24-008-085:577.182]:599.323.4:001.8

О.А. Лебедько^{1,2}, Б.Я. Рыжавский², Д.И. Жильников²

ВЛИЯНИЕ СУБСТАНЦИИ, СОЗДАННОЙ НА ОСНОВЕ ЭХИНОХРОМА А, НА ИЗМЕНЕНИЯ ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ВВЕДЕНИЕМ БЛЕОМИЦИНА

¹Хабаровский филиал Дальневосточного центра физиологии и патологии дыхания РАН –
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

Исследованы легкие крыс в возрасте 5 суток, составивших 3 группы. Крысам 1-й группы (опытной) в возрасте 1, 2 и 3 суток внутрибрюшинно введены блеомицин (1 мг/кг) и пер ос – субстанция (Суб), включавшая в себя эхинохром А, токоферол и аскорбиновую кислоту, разведенная в дистиллированной воде (из расчета 10 мг/кг массы тела ЭхА, 2,4 мг/кг массы токоферола, 10,3 мг/кг массы аскорбиновой кислоты). Крысам 2-й группы (контрольной) внутрибрюшинно введен блеомицин (1 мг/кг) и пер ос – дистиллированная вода. 3-ю группу составили интактные животные. Эвтаназию животных проводили в возрасте 5 суток. Гистологическое изучение легких крыс контрольной группы выявило в них гиалиновые мембраны, клеточный детрит в бронхах, кровоизлияния, очаги гипертрофии интерстициальной ткани, увеличение числа макрофагов и повышение активности НАДН-Д в их цитоплазме. Введение Суб крысам опытной группы значительно уменьшило выраженность морфологических признаков альтерации легких под влиянием блеомицина.

Ключевые слова: легкие, блеомицин, эхинохром А, морфология.

О.А. Lebedko^{1,2}, B.Ya. Rizhavskii², D.I. Zhilnikov²

EFFECT OF A SUBSTANCE BASED ON ECHINOCROME A ON CHANGES IN THE LUNGS OF NEWBORN RATS CAUSED BY THE ADMINISTRATION OF BLEOMYCIN

¹Khabarovsk Branch of the Far Eastern Center of respiration physiology and pathology of RAS –
Research Institute of maternity and childhood protection;

²Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Abstract

The lungs of rats at the age of 5 days were studied, 3 groups were formed. Rats of the 1st group (experimental) were injected bleomycin (1 mg/kg) intraperitoneally at the age of 1, 2 and 3 days and were given per os the substance that included echinochrome A, tocopherol and ascorbic acid diluted in distilled water (based on 10 mg of echinochrome/kg, 2,4 mg/kg – tocopherol and 10,3 mg/kg – ascorbic acid). The rats of the 2nd group (control) were injected bleomycin (1 mg/kg) intraperitoneally and they received per os distilled water. Group 3 consisted of intact animals. The animals were euthanized at the age of 5 days. Histological examination of the lungs of rats of the control group revealed hyaline membranes, cellular detritus in the bronchi, hemorrhages and foci of hypertrophy of interstitial tissue, an increase in the number of macrophages and an increase in the activity of NADH-D in their cytoplasm. Administration of the drug to rats of the experimental group significantly reduced the severity of morphological signs of lung alteration under the influence of bleomycin.

Key words: lungs, bleomycin, echinochrome A, morphology.

Синдром дыхательных расстройств является ведущей причиной неонатальной смертности у новорожденных при недоношенности [1, 2, 6]. Его важнейшими морфологическими проявлениями в легких служат ателектазы, кровоизлияния, а также нарушения микроциркуляции, повреждения альвеолярного и бронхиолярного эпителия. Часто наблюдающимися и существенно влияющими на эффективность газообмена при этом являются гиалиновые мембраны, имеющие различную морфологию – типичных пристеночных, или обтурирующих просветы альвеол в зонах врожденных

ателектазов [1, 2, 6, 11]. В связи с высокой практической значимостью синдрома дыхательных расстройств у новорожденных ведется интенсивный поиск средств, способных предупредить его или снизить тяжесть данной патологии. Ранее нами была предложена модель, в которой многие морфологические изменения легких новорожденных недоношенных детей при синдроме дыхательных расстройств воспроизводились введением новорожденным крысам блеомицина – антибиотика с цитостатическими свойствами, обладающего способностью вызывать альтерацию различных

структур легких, индуцировать пневмофиброз [4, 9]. Настоящая работа посвящена изучению влияния на патологические изменения в легких новорожденных, индуцированные введением блеомицина, введением

препарата (Пр), созданного на основе эхинохрома А – соединения, выделенного из тканей морских ежей, обладающего выраженной способностью ингибировать свободнорадикальное окисление [9, 12].

Материалы и методы

Экспериментальное исследование было проведено в соответствии с принципами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях». Изучались легкие крыс, разделенных на 3 группы. Животным 1-й группы (опыт, $n=10$) в возрасте 1, 2, 3 суток внутрибрюшинно был введен блеомицин (1 мг/кг массы тела), растворенный в 0,1 мл физраствора. Непосредственно перед каждым инъектированием блеомицина животным этой группы *per os* вводилась субстанция (Суб), содержащая эхинохром А (Эх А), токоферол и аскорбиновую кислоту (10 мг/кг массы тела в расчете на ЭхА, 2,4 мг токоферола, 10,3 мг аскорбиновой кислоты), разведенная в дистиллированной воде (объем – 0,05 мл). Животным 2-й группы (контроль, $n=12$) вводился блеомицин в той же дозе, как и в 1-й, и *per os* – 0,05 мл дистиллированной воды. 3-ю группу составили интактные крысы ($n=6$). Животные всех групп являлись потомством интактных самцов и самок, содержались одновременно в условиях одного вивария. Забой животных сравниваемых групп производился при достижении ими возраста 5 суток, декапитацией. Легкие фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 7 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. При их изучении полуколичественно, в баллах (от 0 до 3) оценивали те показатели, которые изменяются под влиянием блеомицина: наличие и выраженность гиалиновых мембран, гипертрофию межальвеолярных перегородок, наличие макрофагов в просветах альвеол, кровоизлияний, а также клеточного детрита в просветах бронхов и бронхиол. В легких крыс интактной группы перечисленные альтеративные изменения не выявлялись. У крыс 1-й (опыт) и 2-й (контроль)

групп они проявлялись в разной степени. Отсутствие каждого из этих патологических изменений легких оценивалось в 0 баллов. Выявляемые при изучении среза легкого, проходящего через его долю, единичные гиалиновые мембраны или кровоизлияния размером до 50 мкм, наличие клеточного детрита, занимающего не более четверти их просвета в просвете бронхиол, единичные макрофаги в просветах отдельных альвеол, единичные утолщения интерстициальной ткани межальвеолярных перегородок – в 1 балл. Каждое из этих изменений, наблюдаемых в срезе во многих местах – в 2 балла. Наличие очагов кровоизлияний размером более 100 мкм, большой объем детрита в просветах бронхиол, бронхов, занимающий половину и более площади их просветов, очаги гипертрофии интерстициальной ткани размером более 100 мкм, наличие макрофагов в просветах большинства альвеол оценивались в 3 балла. Измерения размеров патологических очагов проводились окуляр-микрометром.

На криостатных срезах толщиной 20 мкм проводили реакцию на НАДН-дегидрогеназу (НАДН-Д) по [5]. При длине волны 560-580 нм производили фотографирование препаратов, микрофотографии импортировали в программу Видеотест 5. Активность фермента определяли в этой программе на основании цитофотометрии продукта реакции в цитоплазме не менее 25 НАДН-Д-позитивных макрофагов в легком каждого животного. Полученные при балльной оценке данные, а также результаты цитоспектрофотометрии обрабатывали в программе Statistica, используя опцию Deskriptivnaya statistika. Определяли среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку ($M \pm m$). Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение препаратов легких животных контрольной группы выявило изменения, описанные нами ранее [9]. Они включали в себя гиалиновые мембраны в альвеолах, детрит в воздухоносных путях, очаговую гипертрофию интерстициальной ткани, кровоизлияния в альвеолы и интерстициальную ткань (рис. 1). Кроме того, при этом наблюдалось значительное число макрофагов в межальвеолярных перегородках и просветах альвеол (рис. 2). При изучении реакции на НАДН-Д выявлялось увеличенное количество макрофагов, маркировавшихся высокой активностью этого фермента (рис. 3). Цитоспектрофотометрическое изучение интенсивности реакции на НАДН-Д показало ее достоверное увеличение в цитоплазме макрофагов по сравнению с наблюдавшейся у интактных животных ($0,652 \pm 0,018$ усл. ед. против $0,559 \pm 0,026$ усл. ед.). Таким образом, введение блеомицина по-видимому активировало поступление предшественников макрофагов из костного мозга в легкие

[8] и обуславливало в них повышенную интенсивность реакции на НАДН-Д, отражающую активность внутримитохондриального окисления [9]. Эти данные представляют интерес в связи с тем, что макрофаги являются многочисленной группой клеток в интерстициальной ткани легких, составляющей 10-15 % от всех клеток межальвеолярных перегородок и 77-96 % клеток бронхоальвеолярной жидкости. При этом в цитоплазме макрофагов на долю митохондрий приходится более 30 % объема [8]. В бронхиолах и бронхах выявлялись детрит, некротизированные клетки, форменные элементы крови. Таким образом, введение блеомицина новорожденным крысам обусловило развитие в легких изменений, характерных для синдрома дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных детей [1, 2]. При этом описанные патоморфологические изменения, различаясь по интенсивности, наблюдались в легких всех крыс контрольной группы.

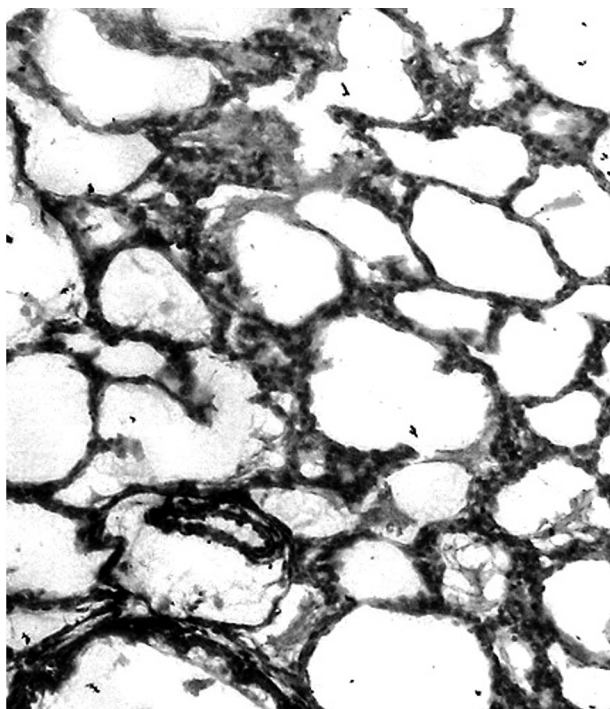


Рис. 1. Легкое крысы контрольной группы. Гиалиновые мембраны в альвеолах. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 15×20

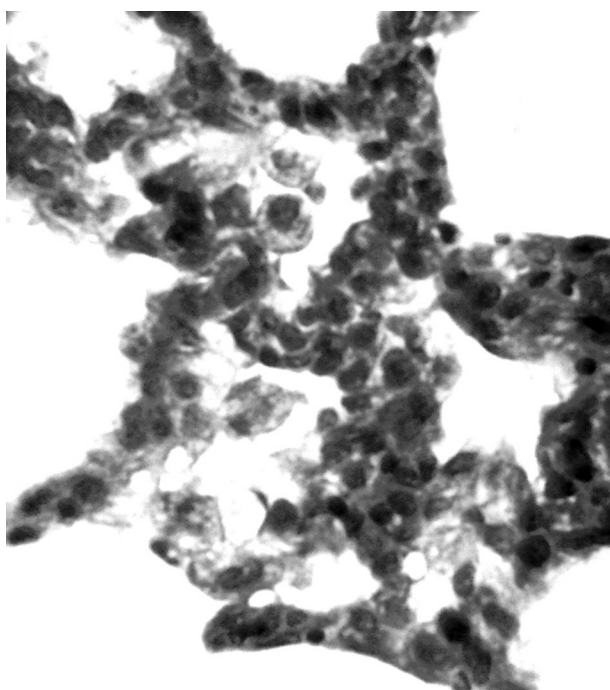
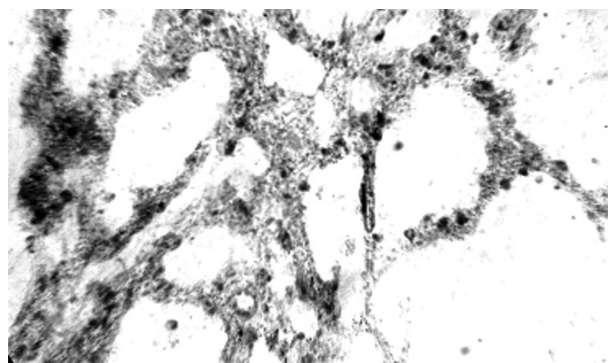
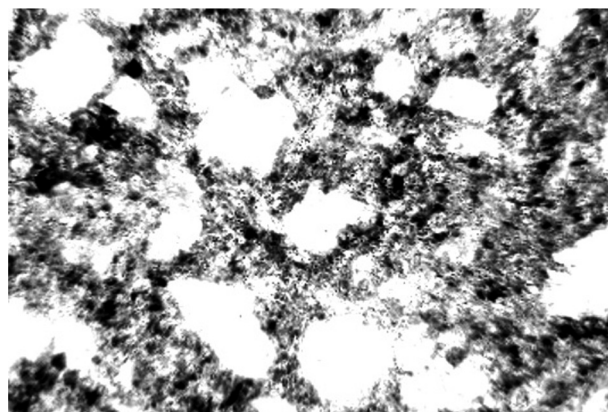


Рис. 2. Легкое крысы контрольной группы. Макрофаги в просветах альвеол. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 15×100

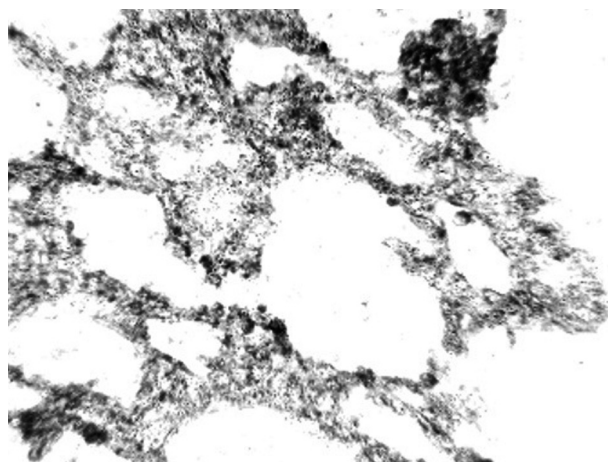
Введение перед инъекцией блеомицина животным опытной группы Суб значительно уменьшило выраженность описанных изменений. Они наблюдались лишь у части крыс этой группы и были менее выражены, чем у животных контрольной группы. Полуколичественная оценка развившихся в легких крыс опытной и контрольной групп патологических изменений органа показала статистически достоверное и значительное уменьшение выраженности всех их в легких крыс данной группы (таблица).



а



б



в

Рис. 3. Легкие крыс из интактной (а), контрольной (б) и опытной групп (в). Реакция на НАДН-Д. Увеличение 15×20. В межалвеолярных перегородках легкого крысы опытной группы меньше, чем у контрольной, количество НАДН-Д-позитивных макрофагов

При этом введение Суб, уменьшившее частоту нахождения макрофагов в просветах альвеол, предотвратило и повышение активности НАДН-Д в этих клетках (таблица). Она была достоверно ниже, чем в контроле ($0,577 \pm 0,017$ усл. ед. против $0,652 \pm 0,018$ усл. ед.) и была близка к данному показателю у интактных крыс ($0,559 \pm 0,026$ усл. ед.). В связи с этим можно предположить, что одним из механизмов действия Пр, уменьшившего тяжесть альтерации в легких, является снижение количества поступающих в них клеток-предшественников макрофагов и активации в них внутримитохондриального окисления. Выявленные

изменения, развившиеся под влиянием блеомицина и значительно уменьшенные при введении Суб, заслуживает внимания и в связи с тем, что митохондрии, в которых происходят НАДН-Д-зависимые процессы биологического окисления [10], являются продуцентами активных форм кислорода, участвующих в регуляции иммунных реакций, с одной стороны, и повреждающих различные структуры органов, с другой [7].

Таблица

Влияние введения препарата, содержащего эхинохром А, токоферол и аскорбиновую кислоту на изменения легких под влиянием блеомицина*

Группа	Блеомицин + препарат (опыт)	Блеомицин (контроль)
Показатели		
Гиалиновые мембраны	0,56±0,17	2,09±0,31
Гипертрофия интерстициальной ткани	1,0±0,16	1,73±0,24
Кровоизлияния	0,44±0,08	1,09±0,28
Клеточный детрит в просветах бронхов	0,33±0,17	1,09±0,16
Макрофаги в просветах альвеол	0,67±0,17	1,82±0,26
Активность НАДН-Д в макрофагах межальвеолярных перегородок	0,577±0,017	0,652±0,018

Примечание. * – все межгрупповые различия статистически достоверны ($P < 0,05$).

Таким образом, на предложенной ранее модели было показано, что патоморфологические измене-

ния, развивающиеся в легких новорожденных крыс под влиянием блеомицина и воспроизводящей важные изменения в органе при синдроме дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных детей, существенно уменьшаются при введении Суб, созданной на основе эхинохрома А. Данные литературы позволяют предполагать, что эффект введения Суб обусловлен высокой способностью ингибировать свободнорадикальное окисление [9,12], являющееся важным механизмом повреждения тканей легкого.

Способность Суб уменьшать степень альтерации легких, число макрофагов в их интерстициальной ткани было показано и в экспериментах на взрослых крысах, подвергнутых воздействию липополисахарида [3]. Таким образом, действие Суб было сходным с выявленным в настоящей работе, хотя эксперименты были поставлены на животных различного возраста, а повреждающие легкие агенты были разными – блеомицин и липополисахарид. Это позволяет предполагать, что Суб, содержащая эхинохром А, токоферол и аскорбиновую кислоту, обладая выраженной способностью подавлять свободнорадикальное окисление [4, 12], может при действии исследованных повреждающих легкие агентов, влиять и на интенсивность миграции из красного костного мозга в этот орган предшественников макрофагов и предотвращать активацию в них внутримитохондриального окисления. Проверка этого предположения заслуживает, по нашему мнению, дальнейшего детального изучения, в том числе, при действии других факторов, повреждающих легкие.

Литература

1. Глуховец Б.И., Гайворонский И.В., Белоусова Н.А., Пахаленко Д.В. Патогенетические особенности синдрома дыхательных расстройств у новорожденных с экстремально низкой массой тела // Архив патологии. – 2005. – Т. 67, № 4. – С. 3-5.
2. Игнатъева А.В., Гаймоленко И.Н., Баранчугова Л.М., Панченко А.С. Патоморфология легких при бронхолегочной дисплазии // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 63-66.
3. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Влияние препарата, содержащего эхинохром А, токоферол и аскорбиновую кислоту, на легкие крыс, подвергнутых введению липополисахарида // Дальневосточный медицинский журнал. – 2020. – № 4. – С. 60-64.
4. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Ткач О.В., Кузнецова М.С., Гусева О.Е. Влияние перорального введения эхинохрома А на структурно-метаболические нарушения, индуцированные блеомицином в легких крыс, на раннем этапе постнатального онтогенеза // Дальневосточный медицинский журнал. – 2015. – № 3. – С. 92-96.
5. Лойда З., Госсрай Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1982. – 270 с.
6. Мороз В.В., Голубев А.М., Перепелица С.А., Смердова Е.Ф., Перепелица С.А., Авакян Ю.М., Качигурова С.В., Яковцев В.Н. Изменения легких у недоношенных новорожденных с болезнью гиалиновых мембран // Общая реаниматология. – 2009. – Т. 5, № 2. – С. 5-11.
7. 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.
8. Руководство по гистологии. Т. 1, 2 / Под редакцией Р.К. Данилова. – СПб.: СпецЛит, 2011.
9. Рыжавский Б.Я., Лебедько О.А. Формирование гиалиновых мембран в легких белых крыс как результат воздействия блеомицина в неонатальном периоде // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – № 9. – С. 379-383.
10. Страйер Л. Биохимия: В 3 т. Т. 2. – М.: Мир, 1985. – 312 с.
11. Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions // Pharmacol. Res. – 2015. – Vol. 97. – P. 122-130.
12. Mishenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A., Lebedko O.A., Ryzhavsii B.Ya., Kuznetsova M.S. Antioxidant composition of echinochrome, ascorbic acid and atocopherol for treating inflammatory processes in lungs // Vestnik FEB RAS. – 2018. – № 6 Supplement. – P. 163-167.



Literature

1. Glukhovets B.I., Gaivoronsky I.V., Belousova N.A., Pakhalenko D.V. Pathogenetic features of the syndrome of respiratory disorders in newborns with extremely low body weight // Archives of Pathology. – 2005. – Vol. 67, № 4. – P. 3-5.
2. Ignatyeva A.V., Gaimolenko I.N., Baranchugova L.M., Panchenko A.S. Pathomorphology of the lungs in bronchopulmonary dysplasia // Far Eastern Medical Journal. – 2012. – № 4. – P. 63-66.
3. Lebedko O.A., Ryzhavskii B.Ya., Zhilnikov D.I. Effect of a preparation containing echinochrome A, tocopherol and ascorbic acid on the lungs of rats exposed to lipopolysaccharide // Far Eastern Medical Journal. – 2020. – № 4. – P. 60-64.
4. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Tkach O.V., Kuznetsova M.S., Guseva O.E. Effect of oral administration of echinochrome A on structural and metabolic disorders induced by bleomycin in rat lungs at an early stage of postnatal ontogenesis // Far Eastern Medical Journal. – 2016. – № 3. – P. 92-96.
5. Loida Z., Gossrau R., Shibler T. Histochemistry of enzymes. – M.: Mir, 1982. – 270 p.
6. Moroz V.V., Golubev A.M., Perepelitsa S.A., Smerdova E.F., Perepelitsa S.A., Avakyan Yu.M., Kachigurova S.V., Yakovtsev V.N. Changes in the lungs in premature infants with hyaline membrane disease // General Reanimatology. – 2009. – Vol. 5, № 2. – P. 5-11.
7. Pinegin B.V., Vorobyova N.V., Paschenkov M.V., Chernyak B.V. The role of mitochondrial reactive oxygen species in the activation of innate immunity // Immunology. – 2018. – № 4. – P. 221-229.
8. A Guide on Histology. Vol. 1, 2 / Ed. by R.K. Danilova. – SPb.: SpetsLit, 2011.
9. Ryzhavsky B.Ya., Lebedko O.A. Formation of hyaline membranes in the lungs of albino rats as a result of exposure to bleomycin in the neonatal period // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – № 9. – P. 379-383.
10. Straer L. Biochemistry: In 3 volumes. Vol. 2. – M.: Mir, 1985. – 312 p.
11. Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions // Pharmacol. Res. – 2015. – Vol. 97. – P. 122-130.
12. Mishenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A., Lebedko O.A., Ryzhavskii B.Ya., Kuznetsova M.S. Antioxidant composition of echinochrome, ascorbic acid and atocopherol for treating inflammatory processes in lungs // Vestnik FEB RAS. – 2018. – № 6 Supplement. – P. 163-167.

Координаты для связи с авторами: Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, директор Хабаровского филиала Дальневосточного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства; Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой гистологии ДВГМУ; Жильников Дмитрий Игоревич – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ.

