

На правах рукописи



Кузина Екатерина Юрьевна

**ПЕРЕКИСНЫЕ И АНТИПЕРЕКИСНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ
ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПЕРОКСИДАЦИИ
И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ**

1.5.5. – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Майкоп – 2025

Работа выполнена в частном учреждении образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» (Самара).

Научный руководитель: **Павлова Ольга Николаевна,**

доктор биологических наук, доцент

Официальные

оппоненты:

Зайцев Владимир Владимирович,

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Биоэкология и физиология сельскохозяйственных животных» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный аграрный университет» (г. Самара)

Пудовкин Николай Александрович,

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Морфология, патология животных и биология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (г. Саратов)

Ведущая организация:

Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югра «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия» Департамента образования и науки Ханты-Мансийского автономного округа – Югры

Защита состоится «04» декабря 2025 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.267.02 при ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет» по адресу: 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Пионерская, 260, конференц-зал научной библиотеки АГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Д.А. Ашхамафа ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет» по адресу: 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Пионерская, 260, и на сайте университета adygnet.ru/nauka/aspirantura-doktorantura-dissertatsionnye-sovety/dissertation/6142/

Автореферат разослан «20» октября 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, д-р мед. наук, доцент



Кузьмин
Андрей Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРАСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Патологии печени, вызванные воздействием токсических веществ, являются широко распространенной проблемой, так как печень выполняет барьерную функцию и играет важную роль в обезвреживании и выводе отравляющих веществ из организма [Булекбаева Л.Э., Ерлан А.Е., Рыспекова Ш.О., 2016 г.; Бураева М.Х.Б., Нищенко В.А., Месхи И.Б., 2021 г.]. Причинами и факторами, способствующими развитию заболеваний печени, могут быть вирусы, токсические вещества, гормональные и метаболические нарушения, неправильное питание, хронические болезни пищеварительной системы и другие. Важная роль в этиологической структуре нарушений функционального состояния печени принадлежит лекарственным средствам и алкоголю. Скорость обработки ядов в организме ограничена и не может пропорционально увеличиваться в соответствии с растущими потребностями. Нарушение функций печени приводит к серьезным расстройствам метаболизма, иммунного ответа, детоксикации, антимикробной защиты организма и активизации процессов свободнорадикального окисления, что влечет значительное увеличение концентрации продуктов перекисидации и их метаболитов. Эти вещества также негативно влияют на обмен веществ и энергии в организме, вызывая морфофункциональные изменения в гепатоцитах [Алекберова С.А., 2019; Ивашкин В.Т. и др., 2019; Зенков Н.К. и др., 2020].

В целом свободнорадикальное окисление составляет основу биоэнергетики живых организмов, и в результате этих реакций в биологических системах образуются, помимо конечных продуктов, активные формы кислорода (АФК), которые выполняют функции вторичных мессенджеров в процессах жизнедеятельности клеток [Еськов В.В. и др., 2018; Усенко С.А., 2019; Майорова Е.А., Корнякова В.В., 2022]. С другой стороны, свободнорадикальное окисление можно назвать универсальным физиологическим явлением, которое обнаруживается при различных патологических состояниях, так как в результате образуются первичные и вторичные радикалы, и если первичные радикалы организм специально производит для выполнения жизненно важных функций, то вторичные радикалы обладают цитотоксическим эффектом и наносят организму значительный вред [Владимиров Ю.А. и др., 2017; Радостева Е.Р. и др., 2019; Никитина О.А. и др., 2022].

Патологическое действие свободных радикалов (СР) связано с их воздействием на структурное состояние и функцию биологических мембран и функциональные свойства ферментов, углеводов и нуклеиновых кислот [Никитина О.А. и др., 2022].

В норме уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) остается низким в крови и тканях. Для предотвращения токсического действия АФК используется сложная саморегулирующаяся система антиоксидантной защиты. В состав этой системы входят специализированные ферменты, которые проявляют специфичность по отношению к определенным АФК, а также низкомолекулярные биоантиоксиданты [Милованова А.В. и др., 2019; Газнюк Л.М. и др., 2022]. Увеличение содержания АФК в клетках приводит к нарушению системы антиоксидантной защиты, прежде всего за счет инактивации антиоксидантных ферментов, что, в свою очередь, может привести к истощению антиоксидантной системы и гибели клетки. В этом случае развивается явление гипероксидации – состояния, при котором окислительные процессы превышают возможности антиоксидантных защитных систем организма [Петренко В.М., 2016; Пятин В.Ф. и др., 2019; Гуреева В.С., Корнякова В.В., 2022; Dab H. et al., 2023]. Исходя из вышеизложенного, детальное изучение биохимии и патогенеза свободнорадикальных процессов приобретает важное значение в современной физиологии.

Для повышения эффективности работы тканевых антиоксидантов в отношении ПОЛ и нормализации функций печени требуется дополнительное введение в организм антиоксидантов – гепатопротекторов [Балукова Е.В., Успенский Ю.П., Фоминых Ю.А., 2018 г.; Прохорова Т.М., Попова Э.В., Гуркина О.А., 2021 г.; Гильдилов, Д.И., 2020 г.].

Гепатопротекторы – препараты, направленные на восстановление гомеостаза в печени, повышение устойчивости органа к действию патогенных факторов, нормализацию функциональной активности и стимуляцию репаративно-регенерационных процессов в печени [Землянова Ю.В., Полякова Е.В., Боряев Г.И., 2023 г.; Репина Э.Ф., Хуснутдинова Н.Ю., Тимашева, 2019 г. Г.В.].

В настоящее время отдается предпочтение гепатопротекторам преимущественно растительного происхождения (54%), сочетающих мягкое терапевтическое действие с минимумом побочных эффектов [Бураева М.Х.Б., Нищенко В.А., Месхи И.Б., 2021 г.].

Поэтому необходимость изучения фармакологических средств, эффективно корригирующих биохимические функции печени и иммунологическую реактивность организма, нарушенные экотоксикантами, остается актуальной проблемой [Леонов В.В., Павлова О.Н., Гуленко О.Н., 2023 г.; Стрелкова Л.Б., Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., 2019 г.; Прохорова Т.М., Попова Э.В., Гуркина О.А., 2021 г.; Землянова Ю.В., Полякова Е.В., Боряев Г.И., 2023 г.].

Проведенный нами анализ литературных данных показал, что биологически активные соединения экстрактов ежевики и пижмы обыкновенной делают целесообразным использование данных объектов в качестве эффективных гепатопротекторов.

Уникальное сочетание БАС (хлорогеновая кислота, гликозиды кемпферола и кверцетина, свободные и конденсированные катехины, проантоцианидины) обуславливают позитивное влияние экстракта ежевики на организм человека [Макарова, Н.В., 2021 г.; Сафронова И.В., Гольдина И.А., Гайдуль К.В., 2017 г.].

Экстракт пижмы обыкновенной, в свою очередь, содержит биологически активные фенольные соединения (апигенин, лютеолин, цинарозид и яцеидин) и имеет богатый набор минеральных компонентов [Кроль Т.А., Зиннатшина Л.В., Балеев Д.Н., 2021 г.; Стоянова Я.В., Стреляева А.В., Кузнецов Р.М., 2023 г.]. Суммарное сочетание этих растительных объектов в соотношении 1:1 взаимно обогащает и усиливает позитивное действие на организм.

Степень разработанности темы. В настоящее время перекисные и антиперекисные механизмы в тканях печени при моделировании гипероксидации CCL4 являются достаточно изученными [Алекберова, С.А., 2019 г.; Балукова Е.В. и соавт., 2018 г.; 17. Волюнец, Г.В. и соавт., 2024 г.; Ивашкин В.Т. и соавт., 2019 г.; Tsukanov V.V. et al., 2021 г.; Tang Sh et al., 2021 г.; Kim, Y.-M. et al., 2021 г.; 151. Lushchak, V.I., 2024 г.; Yaribeygi N. et al., 2020 г.]. Установлено, что при введении CCL4 в организм происходит выраженная активация процессов образования свободных радикалов с последующим увеличением интенсивности перекисного окисления липидов и одновременным истощением активности антиоксидантной системы. В связи с этим возникают патологические изменения в тканях печени, и это нарушает нормальную жизнедеятельность организма [Мусаева Д.М. и соавт., 2020 г.; Тюменцева Н.В. и соавт., 2019 г.; Габдрахманова, И.Д. и соавт., 2020 г.; Леонов В.В. и соавт., 2023 г.; Землянова Ю.В. и соавт., 2023 г.; Репина Э.Ф. и соавт., 2020 г.; Korcha V.S. et al., 2023 г.]. В литературе имеются данные о купировании гипероксидации с помощью природных и синтетических антиоксидантов различного происхождения, отражающие оптимизацию функционирования антиоксидантной системы [Тарасова Л.Н. и соавт. 2020 г.; Леонов В.В. и соавт., 2023 г.; Кузьминова Е.В. и соавт., 2020 г.; Землянова Ю.В. и соавт., 2023 г.; Репина Э.Ф. и соавт., 2019 г.;

Echeverria V. et al., 2021 г.; Xiang X. et al., 2023 г.; Plecítá-Hlavatá L. et al., 2019 г.]. Но устранение дисбаланса активных форм кислорода и продуктов их образования возможны только при определении мишени наиболее чувствительной к гипероксидации. В связи с этим актуальным и обоснованным является продолжение изучения влияния различных антиоксидантов на систему «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» (ПОЛ-АО), а также на физиологическое состояние и иммунный статус организма.

Комплексный подход к исследованию состояния организма, на фоне дисбаланса перекисных и антиперекисных механизмов при нагрузке природными антиоксидантами, включающий не только исследование системы ПОЛ-АО печени, но и реактивных изменений гистоморфологической структуры органа, морфологического и биохимического состава крови животных и скорости монооксигеназных реакций позволит получить более полные сведения о специфике антиоксидантного статуса организма на фоне гипероксидации, влекущих интенсификацию свободнорадикальных процессов в организме, а соответственно послужит основой для разработки современных, перспективных методов защиты окислительного гомеостаза.

Цель исследования – выявить влияние модельной гипероксидации на перекисные и антиперекисные процессы в тканях печени крыс и показать роль растительных экстрактов в процессах регуляции перекисного окисления.

Задачи исследования:

1. Изучить перекисные и антиперекисные процессы в тканях печени крыс в норме, при нагрузке растительными экстрактами и при модельной гипероксидации на фоне нагрузки растительными экстрактами в сравнительном аспекте и провести интегральную оценку окислительно-восстановительного гомеостаза.

2. Исследовать гистоморфологическую структуру печени крыс в норме, в условиях нагрузки растительными экстрактами и при моделировании гипероксидации в условиях нагрузки растительными экстрактами в сравнительном аспекте.

3. Выявить реактивные приспособления к гипероксидации на фоне нагрузки растительными экстрактами морфологического состава крови крыс и состояние их иммунной системы с помощью гематологических лейкоцитарных индексов в сравнительном аспекте.

4. Выявить особенности изменения биохимического состава крови крыс в условиях моделирования гипероксидации при регуляции перекисного окисления растительными экстрактами.

5. Исследовать эффективность гепатозащитного действия экстракта ежевики, пижмы обыкновенной, их смеси в соотношении 1:1 и экстракта расторопши.

6. Изучить в условиях индуцированной гипероксидации репаративные процессы и изменения иммуногенной реактивности в тканях печени и плазме крови крыс на фоне ингибирования перекисного окисления растительными экстрактами.

Научная новизна. В работе впервые:

- показано, что в норме внутрижелудочная нагрузка водными экстрактами ежевики, пижмы обыкновенной, их смеси в соотношении 1:1 и экстрактом расторопши характеризовалась разной степенью выраженности снижения интенсивности перекисных процессов в тканях печени, а при моделировании гипероксидации – способствовала восстановлению нарушенного окислительного гомеостаза и наилучшей эффективностью характеризуется смесь экстрактов пижмы и ежевики в соотношении 1:1;

- произведена интегральная оценка окислительного гомеостаза в тканях печени крыс при нагрузке экстрактом пижмы обыкновенной, ежевики, их смесью в соотношении 1:1 и экстрактом расторопши и при гипероксидации на фоне нагрузки антиоксидантами;

- установлено, что в норме нагрузка крыс растительными экстрактами не оказывает влияние на гистоморфологическую структуру печени крыс, а на фоне гипероксидации – минимизирует количество гепатоцитов в состоянии жирового гепатоза и другие их дистрофические изменения, а также нарушения балочной структуры печени за счет снижения интенсивности перекисных и повышения активности антиперекисных процессов и наибольшей эффективностью отличается смесь экстрактов пижмы и ежевики в соотношении 1:1;

- показано, что в норме нагрузка крыс растительными экстрактами приводит к увеличению числа эритроцитов и лейкоцитов и концентрации гемоглобина в крови в пределах физиологической нормы, а гипероксидация – к снижению количества эритроцитов и лимфоцитов, концентрации гемоглобина и увеличению лейкоцитов, но в условиях моделирования гипероксидации при регуляции перекисного окисления растительными экстрактами установлено снижение этих негативных последствий и наиболее выраженный эффект наблюдается при использовании смеси растительных экстрактов в соотношении 1:1;

- выявлены на фоне неуравновешанности перекисных и антиперекисных процессов функциональные изменения иммунной системы крыс и дисбаланс между специфическим и неспецифическим компонентами иммунитета, отражающий динамику иммунокомпетентных клеток крови крыс в условиях стрессовых воздействий;

- установлено, возрастание концентрации биохимических параметров крови крыс (ЩФ, амилаза, глюкоза, креатинин, мочевины) на фоне гипероксидации, но нагрузка растительными экстрактами нивелировала негативное воздействие CCL4 и наибольшей эффективностью обладает смесь растительных экстрактов пижмы и ежевики в соотношении 1:1;

- установлено, что изучаемые экстракты в условиях модели гипероксидации у крыс обладают в разной степени гепатопротекторными и детоксицирующими свойствами, и наиболее выраженный эффект установлен при использовании смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1;

- выявлено, что нагрузка растительными экстрактами подавляет активацию тканевого и системного воспаления, предотвращает развитие дистрофического и воспалительного процессов в печени, а также стимулирует регенерацию печеночной ткани и наиболее выраженный эффект наблюдается при использовании смеси экстрактов ежевики и пижмы обыкновенной в соотношении 1:1.

Теоретическая значимость. Исследование вносит вклад в развитие представлений о дисбалансе перекисных и антиперекисных процессов в тканях печени крыс при моделировании гипероксидации и ее отражении в изменениях гистоморфологической структуры органа, морфологического и биохимического состава крови, скорости монооксигеназных реакций, рапаративных и иммунных механизмах в тканях животных, что обогащает данные об окислительном гомеостазе и его роли в обеспечении функционирования организма.

Применяемый комплексный подход оценки состояния организма, на фоне дисбаланса перекисных и антиперекисных процессов при нагрузке природными антиоксидантами, включающий биохимические, гематологические и гистологические аспекты вносит новый вклад в понимание механизмов развития гипероксидации в тканях и способах купирования ее негативных последствий, что относится к области фундаментальных знаний.

Таким образом, полученные результаты расширяют теоретические основы физиологии и формируют предпосылки для проведения дальнейших разработок по данной проблеме.

Практическая значимость. Полученные данные в ходе экспериментального исследования имеют потенциальную практическую значимость. Установлено, что применение смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1 эффективно способствует восстановлению баланса перекисных и антиперекисных процессов при моделировании гипероксидации, нивелированию дегенеративных изменений гистоморфологической структуры печени, морфологического и биохимического состава крови животных и скорости монооксигеназных реакций, а также репаративных и иммунных механизмов в тканях крыс, что свидетельствует о ее выраженном гепатопротекторном действии.

В работе получено новое экспериментально обоснованное знание о возможности использования экстрактов пижмы обыкновенной, ежевики, их смеси в соотношении 1:1 для создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения с целью профилактики и лечения токсических, в том числе лекарственных, поражений печени, так как они обладают выраженным гепатопротекторным эффектом.

Данные, полученные в ходе исследования, могут быть использованы в лекционных курсах и на практических занятиях в преподавании медико-биологических дисциплин (биология, физиология, биохимия, патологическая физиология).

На основании полученных данных разработана «Программа для определения оксидативного стресса в тканях». Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2023686110, 04.12.2023. Заявка от 21.11.2023 г.

Теоретико-методологическая основа исследования. Теоретическую основу диссертации составили следующие научные представления:

- о понятии организма, как целостной функциональной системы (Анохин П.К., 1975; Орбели Л.А., 1982);

- о понятии оксидативного стресса, как дисбаланса перекисных и антиперекисных процессов в организме (Селье Г, 1970 г., 1982 г.; Амелина, И.П., Соловьева Э.Ю. 2019; Волощук О.Н., Стус Ю.В., Копыльчук Г.П., 2020; Гуреева В.С., Корнякова В.В. 2022; Vona R., Gambardella L., Cittadini C. 2019; Kehrer J.P., Klotz L.O. 2015; Mladenov M., Lubomirov L., Grisk O. 2023);

- о понятии окислительный гомеостаз (Газнюк Л.М., Липич Т.И., Липич В.В., 2022; Пятин В.Ф., Еськов В.В., Филатова О.Е., 2019; Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. 2009);

- о механизмах токсического воздействия CCL4 на ткани печени и организм в целом (Алекберова С.А., 2019; Тюменцева Н.В., Храпцова Ю.С., Арташян О.С., 2019; Габдрахманова И.Д., Мышкин В.А., Еникеев Д.А., 2020; Хабриев Р.У. 2005 г.; Korcha V.S., Koshak Y.F. 2023);

- о роли природных антиоксидантов в восстановлении баланса перекисных и антиперекисных процессов при оксидативном стрессе (Мусаева Д.М., Самадов Б.Ш., Дубинина Н.В., 2022; Гизингер О.А., Дадали В.А., 2021; Кузьминова Е.В., Семененко М.П., Василиади О.И., 2020; Dubey S., Singh E. 2023; Xiang X., Kwame A.W., Qing Y. 2023; Rasmus P., Kozłowska E. 2023).

Методологическая основа исследования поставлена в соответствии с целью и задачами. В работе использовались системный научный подход, научные принципы объективности, принцип единства теории и практики, принципы доказательной медицины, практической реализуемости, принципы контролируемого исследования и статистического анализа.

В работе использованы физиологические, биохимические, гематологические и гистологические методы. Для реализации поставленных целей и задач был проведен анализ современных литературных данных отечественных и зарубежных авторов. Разработан дизайн исследования на основе анализа отечественной и зарубежной литературы.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Экстракты пижмы обыкновенной, ежевики, их смесь в соотношении 1:1 и экстракт расторопши эффективны в защите организма от избыточной активации ответа на стрессорное воздействие CCL4, так как способствуют восстановлению нарушенного окислительного гомеостаза, при этом наилучшей эффективностью характеризуется смесь экстрактов благодаря синергизму их биологически активных соединений.

- Интегральная оценка окислительного гомеостаза у крыс в норме и при индуцированной гипероксидации с помощью коэффициентов оксидативного стресса в тканях печени позволяет достоверно оценить невысокие отклонения в антиоксидантном статусе организма.

- Внутрижелудочная нагрузка растительными антиоксидантами позволяет уменьшить негативное влияние CCL4 на гистоморфологическую структуру печени, и наиболее выраженный положительный эффект наблюдается при использовании смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1.

- На фоне гипероксидации у крыс наблюдаются значительные патологические изменения морфологических и биохимических параметров крови, а внутрижелудочная нагрузка экстрактами пижмы обыкновенной, ежевики, их смесью в соотношении 1:1 и экстрактом расторопши способствует в разной степени снижению этих негативных последствий, и наиболее выраженный эффект наблюдается при использовании смеси растительных экстрактов в соотношении 1:1.

- Расчет гематологических лейкоцитарных индексов позволяет оценить реакцию иммунной системы организма и выявить проявление, развитие, течение и тяжесть воспалительных процессов и экзогенной интоксикации, а также дисбаланс между специфическим (адаптивным) и неспецифическим (врожденным) компонентами иммунитета.

- Экстракты пижмы обыкновенной, ежевики, их смесь в соотношении 1:1 и экстракт расторопши в условиях модели гипероксидации обладают в разной степени гепатопротекторными, детоксицирующими и репаративными свойствами, которые обусловлены различными в их составе и наибольшую эффективность демонстрирует смесь растительных экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре «Физиология» ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, на кафедрах «Эпизоотология, патология и фармакология» (акт внедрения от 8.10.2024) и «Биоэкология и физиология сельскохозяйственных животных» (акт внедрения от 19.11.2024) ФГБОУ ВО СамГАУ, а также на кафедре «Медико-биологические дисциплины» Медицинского университета «Реавиз» (акт внедрения от 03.12.2024).

Степень достоверности результатов исследования. Высокий уровень достоверности экспериментального исследования обеспечивается анализом современной отечественной и иностранной литературы по теме исследования, что позволило разработать дизайн исследования, сравнить и интерпретировать полученные собственные результаты с имеющимися литературными данными, а также проведением анализов в аккредитованных лабораториях, посредством использования современных научных методов (физиологические, биохимические, гематологические и гистологические); использованием достаточного количества лабораторных животных, методикой формирования групп сравнения, размером

выборки и использованием адекватных поставленным задачам методов статистической с помощью пакета программ STATISTICA Application 10.0.1011.0. В соответствии с поставленными задачами исследования выполнялся расчет частотных таблиц, как одномерных, так и многоуровневых и расчет элементарных статистик: среднее значение (M), ошибки средних (m), стандартное отклонение (σ), расчет долей (%); сравнительный анализ качественных параметров в исследуемых группах с применением непараметрических методов анализа. Критическое значение уровня значимости – 0,05.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Научная весна» (Самара, 2022); I Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Научная весна» (Самара, 2024); Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы физиологии животных» (Москва, 2024); XVII International Scientific and Practical Conference «State and Development Pro-spects of Agribusiness» (INTERAGROMASH 2024).

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности. Направление диссертационного исследования соответствует п. 1 – закономерности и механизмы поддержания постоянства внутренней среды организма; п. 2 – молекулярная и интегративная организация физиологических функций; п. 3 – закономерности и механизмы нервной и гуморальной регуляции, генетических, молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических функций.; п. 4 – закономерности функционирования основных систем организма (нервной, внутренней секреции, иммунной, сенсорной, двигательной, крови, кровообращения, лимфообращения, дыхания, выделения, пищеварения, репродуктивной и др.) при различных состояниях организма. паспорта специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных (биологические науки).

Публикации результатов диссертационного исследования. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России (К2), 1 статья в журнале, индексируемом базой данных Scopus и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен анализ фундаментальной современной литературы по теме диссертации; сформированы группы крыс для исследования в количестве, достаточном для получения статистически достоверных результатов; определен дизайн исследования и все необходимые манипуляции с животными по ходу запланированных экспериментов; проведена аналитическая и статистическая обработка полученных данных, на основе которых сделаны достоверные и обоснованные обобщения и выводы; оформлены автореферат и диссертация.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, иллюстрирована 20 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Список литературы включает 194 источника: 131 отечественных и 63 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Организация и методы исследования. Основная часть экспериментальной работы выполнена на кафедре медико-биологических дисциплин Медицинского университета «Реавиз». Исследование одобрено Этическим комитетом при Медицинском университете

«Реавиз» №393 от 3 октября 2022 г. Эксперименты проведены на 300 белых беспородных крысах-самцах массой 240–260 г.

Схема экспериментов представлена на рисунке 1.

1. Исследование системы ПОЛ-АО печени крыс в норме, при нагрузке растительными экстрактами и при экспериментальном моделировании гипероксидации проводили на 300 крысах. Все крысы были разделены поровну на 10 экспериментальных групп (таблица 1).

Таблица 1 – Группы экспериментальных животных

Объект исследования	Номер группы									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Вода	+	+								
CCl ₄		+		+		+		+		+
Экстракт пижмы лекарственной			+	+						
Экстракт ежевики					+	+				
Масло расторопши							+	+		
Смесь водных экстрактов ежевики и пижмы									+	+

В исследовании использовали экстракты пижмы лекарственной, ежевики и расторопши производства ООО «КорольФарм» с концентрацией действующих веществ 3,5–4,0 %, а смесь экстрактов пижмы лекарственной и ежевики в соотношении 1:1 готовили самостоятельно из готовых экстрактов. Основные действующие вещества экстракта ежевики: хлорогеновая кислота, гликозиды кемпферола и кверцетина, свободные и конденсированные катехины, проантоцианидины. Основные действующие вещества экстракта пижмы обыкновенной: апигенин, лютеолин, цинарозид и яцеидин. Основные действующие вещества экстракта расторопши: таксифолин, кверцетин, кемпферол, силибин, силимарин, силикристин. Приготовление смеси экстрактов пижмы лекарственной и ежевики обусловлено тем, что каждый из них содержит широкий спектр биологически активных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами и их совместное применение будет проявлять синергетический эффект. Все экстракты животным вводили ежедневно однократно в желудок с помощью зонда в дозе 50 мг/100 г массы животного, объемом 1,5 мл в течение 30-ти дней, а крысы 1 (интактные) и 2 (контроль) групп получали дистиллированную воду тем же объемом. Нагрузка крыс экстрактами в указанной дозе обусловлена расчетом суточной потребности в биологически активных соединениях, содержащимися в экстрактах и рекомендуемыми нормами их потребления, а длительность приема – клиническим опытом. Через 30 суток, параллельно с введением экстрактов и воды, животным вводили CCl₄ внутримышечно в виде 50 % масляного раствора на абрикосовом масле в дозе 2 г/кг веса животного в течение 6 дней. На 37-й день опыта крыс выводили из эксперимента в соответствии с этическими нормами под эфирным наркозом методом декапитации, затем проводили извлечение печени, из которой готовили гомогенат. В гомогенатах определяли активность каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР), а также концентрации малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) стандартными лабораторными методами с использованием тестовых наборов фирмы Cloud-Clone Corp (USA) для лабораторных животных. Также исследовали массу печени.

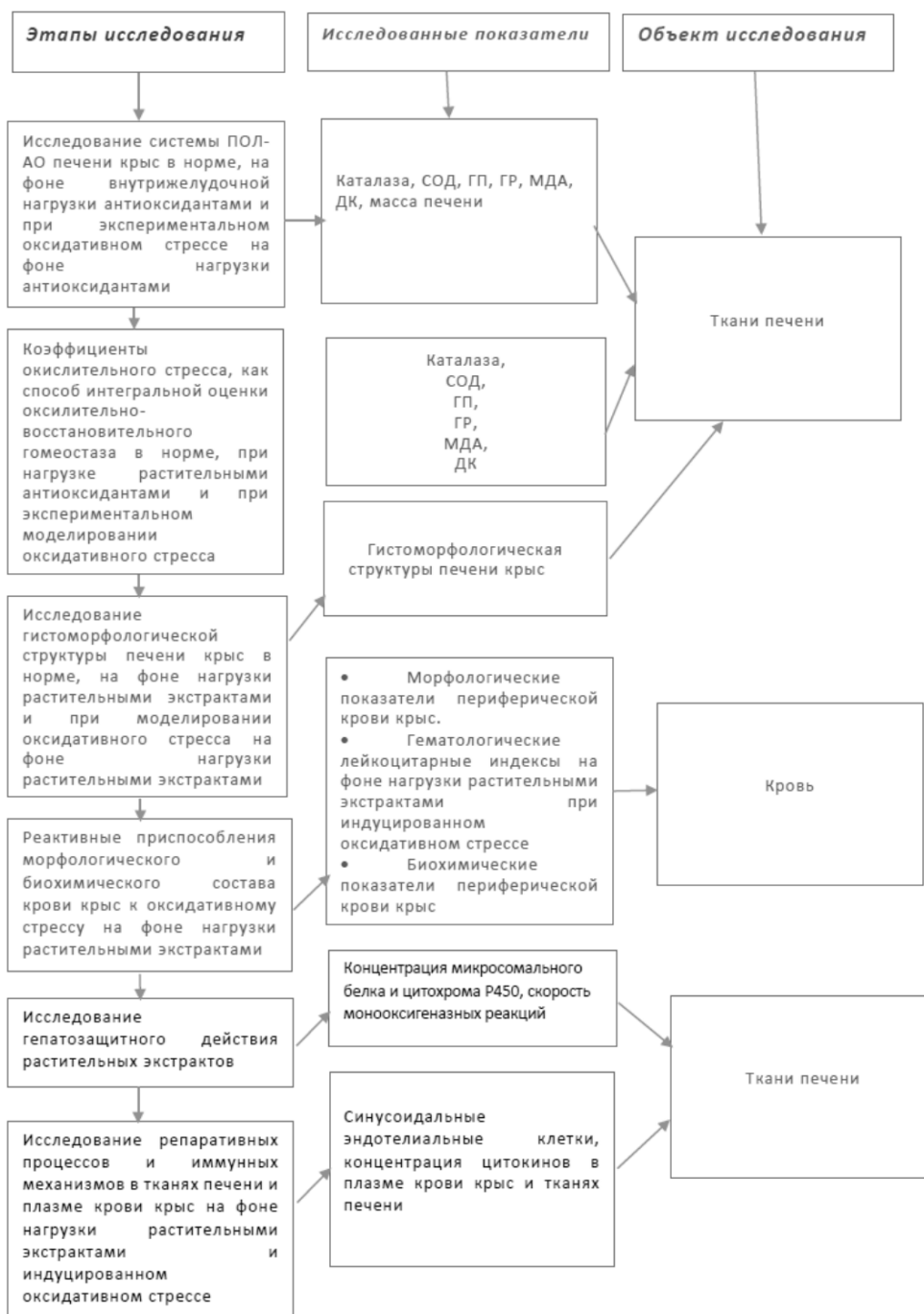


Рисунок 1 – Дизайн исследования.

2. Для интегральной оценки окислительно-восстановительного гомеостаза в норме, при нагрузке растительными экстрактами и экспериментальном моделировании гипероксидации у крыс использовали коэффициенты оксидативного стресса: коэффициент каталаза/СОД; антиоксидантно-прооксидантный индекс; коэффициент МДК/ДК, локальный антиоксидантный индекс (ЛАИ) и общий антиоксидантный индекс (АОИобщ). Все коэффициенты рассчитывались для животных 1, 2, 4, 6, 8 и 10 групп.

3. Исследование гистоморфологической структуры печени крыс в норме, на фоне нагрузки растительными экстрактами и моделировании гипероксидации проводили на 300 крысах (таблица 1). Материалом морфологического исследования служила печень крыс, взятая на 37-й день опыта. Сначала проводили макроморфологическое исследование органа, а

фрагменты центральных участков печени фиксировали в нейтральном забуференном 10 % растворе формалина. Гистологическую проводку материала осуществляли с использованием автоматической станции марки «STP-120» (Германии), для парафинизации блоков применяли систему «EC350» (Германии). Для приготовления микропрепаратов использовали ротационный микротом «HM340E» («Microm Laborgerate GmbH», Германия). Визуализацию изображений осуществляли с использованием светового микроскопа «OLYMPUSBX51» (Япония). Морфометрию срезов печени анализировали с помощью программы «ImageScopeColor» и «cellSensStandart» (Россия) при увеличении окуляра SWH×10 и объективов UPLanFL×200,×400. Определяли среднюю площадь гепатоцитов и их ядер в μm^2 , а также вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Осуществляли подсчет двухъядерных гепатоцитов, производили расчет митотического индекса.

4. Реактивные приспособления морфологического и биохимического состава крови крыс к гипероксидации на фоне нагрузки растительными экстрактами изучали у крыс 2, 4, 6, 8 и 10 групп. Морфологический и биохимический состав крови крыс анализировали на 30-е и 37-е сутки. На основе полученных данных производили расчет лейкоцитарных индексов: ИСНМ, ИСЛМ, ИСЛЭ, индекс Бредекка, индекс Кребса. Биохимический анализ крови включал следующие параметры: щелочная фосфатаза (ЩФ), амилаза, альбумин, общий белок, глюкоза, креатинин, мочевины, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), билирубин общий, гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ). Анализы производили стандартными лабораторными методами.

5. Исследование гепатозащитного действия растительных экстрактов изучали на крысах 1, 2, 4, 6, 8 и 10 групп. На 37-е сутки опыта из печени животных выделяли микросомальную фракцию с применением метода дифференциального центрифугирования. В микросомальных фракциях печени животных определяли содержание микросомального белка и цитохрома P450, а также показатели скорости реакций гидроксирования анилина, N-деметилирования диметиланилина (ДМА) и реакции конъюгации с участием глутатионтрансферазы (ГТФ).

6. Исследование репаративных процессов и иммунных механизмов в тканях печени и плазме крови крыс на фоне нагрузки растительными экстрактами и индуцированной гипероксидации изучали на крысах 1, 2, 4, 6, 8 и 10 групп. На 37-е сутки опыта проводили извлечение печени и образцы ткани погружали в 10 % нейтральный формалин на 24 часа. Подготовку образцов осуществляли с использованием автоматического процессора Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4). Подсчет количества синусоидальных клеток осуществляли в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении микроскопа ×400. Для анализа содержания цитокинов в плазме крови экспериментальных животных производили забор периферической крови, центрифугировали при 3000 об/мин на холоде в течение 15 мин. Подготовка гомогената печени крыс включала гомогенизацию образцов, ресуспендирование с физиологическим раствором (0,85 % р-р хлорида натрия) и центрифугирование при 5000 об/мин на холоде в течение 30 мин. Содержание цитокинов в плазме крови и гомогенатах печени крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием прибора Lazurite Automated ELISA System. Для оценки уровня цитокинов в плазме крови использовали наборы для ИФА фирмы Thermo Scientific.

Статистическая обработка результатов. В работе использовались описательная статистика, параметрический и непараметрический анализ данных.

Результаты проведенного исследования и их обсуждение. В результате эксперимента по исследованию системы ПОЛ-АО печени крыс и массы печени крыс в норме, при нагрузке растительными экстрактами и при моделировании гипероксидации получен массив числовых данных активностей и концентраций ферментов, представленных в таблицах 2 и 3.

Установлено отсутствие влияния внутрижелудочной растительными экстрактами на динамику массы печени здоровых крыс, так как масса органа в экспериментальных группах не отличалась от 1 группы. У животных с моделированием гипероксидации установлено увеличение массы печени относительно животных 1 группы: во 2 группе – на 73,72 %, в 4 – на 34,1 %, в 6 – на 43,8 %, в 8 – на 49,6 % и в 10 – на 21,4 %.

Установлено, что внутрижелудочная нагрузка растительными экстрактами способствует снижению активности антиоксидантных ферментов в тканях печени по сравнению с животными 1 группы: в 3 группе активность каталазы снизилась на 9,6 %, СОД – на 15,2 %, ГП – на 15,7 %, ГР – на 10,8 %; в 5 группе активность каталазы снизилась на 6,7 %, СОД – на 7,1 %, ГП – на 10,3 %, ГР – на 4,1 %; в 7 группе активность каталазы снизилась на 5,8 %, СОД – на 11,1 %, ГП – на 19,6 %, ГР – не изменилась; в 9 группе активность каталазы снизилась на 14,2 %, СОД – на 23,6 %, ГП – на 28,2 %, ГР – на 15,3 %.

Таблица 2 – Масса печени крыс в норме, при нагрузке растительными экстрактами и при моделировании гипероксидации

Группа животных	Характеристика группы	Масса печени, г $M \pm m$
1	Интактные	8,06 ± 0,22
2	Контроль + CCl ₄	13,95 ± 0,51 ¹
3	Экстракт пижмы обыкновенной	8,15 ± 0,26
4	Экстракт пижмы обыкновенной + CCl ₄	10,77 ± 0,34 ^{1,2}
5	Экстракт ежевики	7,99 ± 0,29
6	Экстракт ежевики + CCl ₄	11,55 ± 0,39 ^{1,2}
7	Масло расторопши	8,02 ± 0,31
8	Экстракт расторопши + CCl ₄	12,01 ± 0,44 ^{1,2}
9	Смесь водных экстрактов ежевики и пижмы	8,18 ± 0,36
10	Смесь экстрактов пижмы и ежевики + CCl ₄	9,75 ± 0,37 ^{1,2}

Примечание. В этой таблице различия достоверны при $p < 0,05$: 1 – по сравнению с показателями 1 группы животных; 2 – по сравнению с показателями 2 группы крыс.

Таблица 3 – Функциональные показатели ферментов системы ПОЛ-АО в тканях печени крыс в норме, при нагрузке растительными экстрактами и при моделировании гипероксидации

Группа	Показатель, $M \pm m$					
	Каталаза, мкат/л	СОД, ус.единиц/мг белка печени	ГП, нмоль/мин на 1 мг белка	ГР, нмоль/мин на 1 мг белка	МДА, нмоль/г	ДК, нмоль/г
1	59,6 ± 1,91	203,55 ± 7,33	1375,21±50,37	105,47 ± 3,58	14,2 ± 0,49	32,1 ± 0,99
2	34,9 ± 1,11 ¹	153,1 ± 5,51 ¹	834,30 ± 26,69 ¹	71,20± 2,27 ¹	20,5 ± 0,72 ¹	51,4 ± 1,64 ¹
3	53,9 ± 1,91 ¹	172,69 ± 6,89 ¹	1158,67±47,81 ¹	94,11 ± 3,25 ¹	13,6 ± 0,43	31,4 ± 1,03
4	46,7 ± 1,67 ^{1,2}	169,4 ± 6,27 ^{1,2}	1089,40±37,03 ^{1,2}	90,10±3,24 ^{1,2}	17,8 ± 0,63 ^{1,2}	46,1 ± 1,32 ^{1,2}
5	55,6 ± 2,11 ¹	189,12 ± 6,37	1233,12±42,57 ¹	101,11 ± 3,79	13,9 ± 0,45	29,3 ± 1,12 ¹
6	41,9 ± 1,51 ^{1,2}	164,1 ± 5,91 ^{1,2}	994,20 ± 34,79 ^{1,2}	88,40± 2,83 ^{1,2}	18,0 ± 0,66 ^{1,2}	47,8 ± 1,25 ^{1,2}
7	56,1 ± 2,12	180,91 ± 6,93 ¹	1105,67±48,12 ¹	105,17 ± 3,97	13,7 ± 0,39	30,4 ± 1,05
8	43,2 ± 1,59 ^{1,2}	162,2 ± 6,16 ^{1,2}	1048,26±33,54 ^{1,2}	85,30±3,16 ^{1,2}	17,2 ± 0,55 ^{1,2}	45,4 ± 1,57 ^{1,2}
9	51,2 ± 1,77 ¹	155,44 ± 5,52 ¹	987,39±29,47 ¹	89,43 ± 3,34 ¹	14,0 ± 0,41	27,1 ± 0,93 ¹
10	50,1 ± 1,70 ^{1,2}	174,5 ± 6,11 ^{1,2}	1197,30± 3,10 ^{1,2}	94,10± 3,01 ^{1,2}	15,8 ± 0,58 ^{1,2}	42,3 ± 1,46 ^{1,2}

Примечание. В этой таблице различия достоверны при $p < 0,05$: 1 – по сравнению с показателями контрольной 1 группы животных; 2 – по сравнению с показателями 2 группы крыс.

Внутрижелудочная нагрузка растительными экстрактами не оказывает влияние на концентрацию МДА в тканях печени крыс экспериментальных групп, но способствует снижению концентрации ДК в тканях печени по сравнению с животными 1 группы: в 3 группе – на 2,2 %, в 5 группе – на 8,7 %, в 7 группе – на 5,3 %, а в 9 группе – на 15,6 %.

На фоне гипероксидации установлено снижение активности антиоксидантных ферментов и повышение концентрации продуктов окисления в тканях печени крыс по сравнению с животными 1 группы: во 2 группе активность каталазы снизилась на 41,4 %, СОД – на 23,6 %, ГП – на 37,1 %, ГР – на 31,8 %, а концентрация МДА и ДК возросла на 45,4 % и 64,2 % соответственно; в 4 группе активность каталазы снизилась на 21,6 %, СОД – на 15,5 %, ГП – на 17,8 %, ГР – на 13,7 %, а концентрация МДА и ДК возросла на 26,2 % и 47,3 % соответственно; в 6 группе активность каталазы снизилась на 29,6 %, СОД – на 22,1 %, ГП – на 25,0 %, ГР – на 15,2 %, а концентрация МДА и ДК возросла на 27,7 % и 52,7 % соответственно; в 8 группе активность каталазы снизилась на 27,5 %, СОД – на 19,1 %, ГП – на 20,9 %, ГР – на 18,3 %, а концентрация МДА и ДК возросла на 21,9 % и 45,0 % соответственно; в 10 группе активность каталазы снизилась на 15,9 %, СОД – на 12,9 %, ГП – на 9,7 %, ГР – на 9,8 %, а концентрация МДА и ДК возросла на 12,1 % и 35,1 % соответственно.

Таким образом, развитие гипероксидации в результате токсического поражения печени приводит к ухудшению работы энзиматических и неэнзиматических эндогенных антиоксидантов и интенсифицирует окислительные процессы в организме, но введение экзогенных природных антиоксидантов в составе растительных экстрактов способствует восстановлению нарушенного гомеостаза, и наилучшей эффективностью характеризуется смесь экстрактов пижмы и ежевики в соотношении 1:1.

Интегральную оценку окислительного гомеостаза при нагрузке растительными экстрактами и моделировании гипероксидации у крыс проводили с использованием коэффициентов оксидативного стресса и в результате получен массив числовых, представленный в таблице 4.

Таблица 4 – Коэффициенты оксидативного стресса у крыс в норме, при нагрузке растительными экстрактами и при моделировании гипероксидации

Группа	Сутки	Коэффициент, М ± m				
		Кат/СОД	АПИ	МДА/ДК	ЛАИ	АОИ _{общ}
1	30	0,297±0,010	4,19±0,142	0,45±0,014	854,34±28,193	-
	37	0,293±0,008	4,23±0,135	0,44±0,011	847,08±27,985	-
2	30	0,228±0,007	4,22±0,149	0,40±0,009	847,08±28,214	-0,008±0,001
	37	0,297±0,011 ¹	1,70±0,061 ¹	0,45±0,010 ¹	260,64±9,383 ¹	-0,881±0,028
4	30	0,276±0,009	3,96±0,134	0,39±0,013	684,41±26,481	-0,044±0,001
	37	0,312±0,011 ¹	2,62±0,089 ¹	0,43±0,008 ¹	444,40±14,221 ¹	-0,099±0,003
6	30	0,255±0,006	4,00±0,124	0,38±0,009	756,48±25,721	-0,026±0,001
	37	0,293±0,005 ¹	2,33±0,083 ¹	0,47±0,015 ¹	381,98±13,369 ¹	-0,217±0,007
8	30	0,266±0,009	4,09±0,151	0,38±0,006	740,81±25,187	-0,053±0,002
	37	0,310±0,008 ¹	2,51±0,077 ¹	0,45±0,011 ¹	407,39±14,258 ¹	-0,139±0,005
10	30	0,287±0,007	3,66±0,139	0,37±0,013	568,47±17,622	-0,061±0,003
	37	0,329±0,011 ¹	3,17±0,091 ¹	0,52±0,017 ¹	553,31±19,919 ¹	0,108±0,003

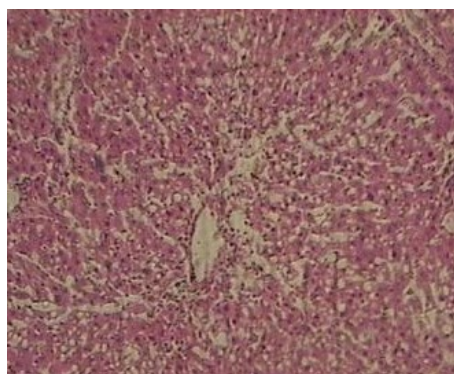
Примечание. В этой таблице различия достоверны при $p < 0,05$: 1 – по сравнению с показателями этой же группы животных на 30 суток опыта

При исследовании динамики коэффициентов оксидативного стресса установлено следующее: у животных 1 группы установлено незначительное колебание коэффициентов к 37 суткам; у крыс 2 группы установлено снижение коэффициентов катала/СОД на 23,2 %, АПИ – на 59,7 %; МДА/ДК – на 11,1 %, ЛАИ – на 69,2 % по сравнению с 30 сутками опыта; у крыс 4 группы также установлено снижение значений коэффициентов катала/СОД на 11,5 %, АПИ – на 33,8 %; МДА/ДК – на 9,3 %, ЛАИ – на 35,1 % по сравнению с 30 сутками опыта; у

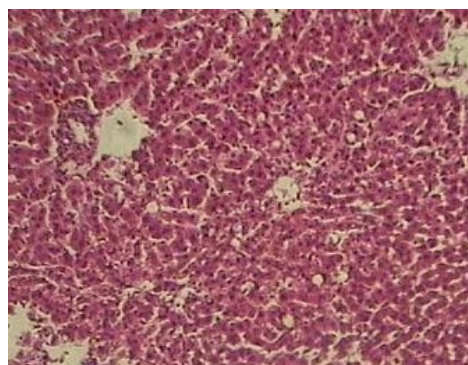
крыс 6 группы установлено снижение значений коэффициентов катала/СОД на 13,0 %, АПИ – на 41,8 %; МДА/ДК – на 19,1 %, ЛАИ – на 49,5 % по сравнению с 30 сутками опыта; у крыс 8 группы установлено снижение значений коэффициентов катала/СОД на 14,1 %, АПИ – на 38,6 %; МДА/ДК – на 15,6 %, ЛАИ – на 45,0 % по сравнению с 30 сутками опыта; у крыс 10 группы на 37 сутки установлено снижение значений коэффициентов катала/СОД на 12,8 %, АПИ – на 13,4 %; МДА/ДК – на 28,8 %, а коэффициент ЛАИ изменился незначительно по сравнению с 30 сутками опыта.

АОИобщ у животных 1 группы оценить невозможно, поэтому его рассчитывали только для крыс 2,4,6,8 и 10 групп и в норме он имеет значение близкое к нулю, а на 37 сутки во 2 группе он снизился в 110 раз от значения на 30 сутки, в 4 группе – в 2,25 раза, в 6 группе – в 8,3 раза, в 8 группе – в 2,6 раза, а в 10 группе повысился в 1,8 раза от значения на 30 сутки.

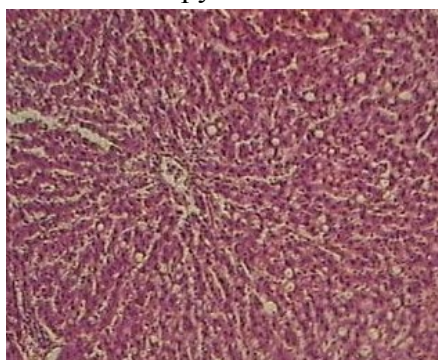
В ходе исследования гистоморфологической структуры печени крыс в норме, на фоне нагрузки растительными экстрактами и при моделировании гипероксидации установлено, что сама по себе внутрижелудочная нагрузка крыс растительными экстрактами не оказывает влияния на гистоморфологическую картину ткани печени, а гипероксидация оказывает существенное влияние (рис. 2).



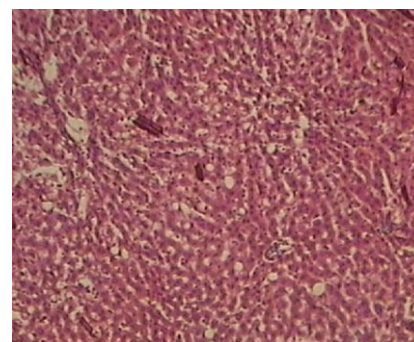
Группа 2



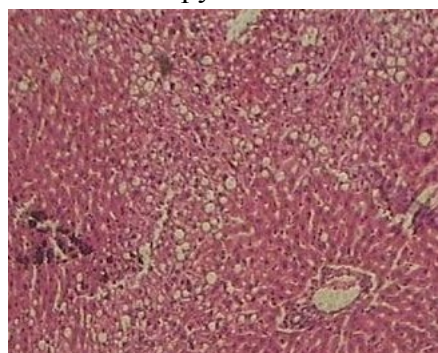
Группа 4



Группа 6



Группа 8



Группа 10

Рисунок 2 – Микропрепарат печени крысы, окраска гематоксилин-эозин; ув. $\times 160$.

В ходе морфологического исследования препаратов печени крыс 2, 4, 6, 8 и 10 групп установлены разной степени выраженности диффузная зернисто-вакуолярная дистрофия гепатоцитов, очаговые некрозы паренхимы под капсулой и миграция в эти зоны полиморфноядерных лейкоцитов, полнокровие синусоидальных капилляров и капилляростаз вен портальных трактов и части центральных вен долек, интерстициальный отек. При поражении печени CCl_4 наблюдается интенсивное накопление жиров и ее увеличение (табл. 5).

Таблица 5 – Гистологические показатели печени крыс на фоне нагрузки растительными экстрактами при гипероксидации

Показатель, $M \pm m$	Группы экспериментальных животных					
	1 группа Интактные	2 группа Контроль + CCl_4	4 группа Экстракт пижмы + CCl_4	6 группа Экстракт ежевика + CCl_4	8 группа Экстракт расторопши + CCl_4	10 группа Смесь экстрактов + CCl_4
Количество гепатоцитов на 1 мм^2	2459,3 ± 88,5	4568,6 ± 159,9 ¹	3641,7 ± 123,8 ^{1,2}	3952,1 ± 126,46 ^{1,2}	3789,5 ± 128,8 ^{1,2}	3465,7 ± 110,9 ^{1,2}
Размер гепатоцитов, мкм	22,79 ± 0,79	12,41 ± 0,43 ¹	18,22 ± 0,65 ^{1,2}	15,34 ± 0,54 ^{1,2}	16,48 ± 0,56 ^{1,2}	19,64 ± 0,69 ^{1,2}
Размер ядра гепатоцитов, мкм	6,13 ± 0,21	6,11 ± 0,19	6,14 ± 0,23	6,15 ± 0,22	6,10 ± 0,17	6,13 ± 0,19
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,26 ± 0,01	0,49 ± 0,02 ¹	0,34 ± 0,02 ^{1,2}	0,40 ± 0,02 ^{1,2}	0,37 ± 0,02 ^{1,2}	0,31 ± 0,02 ^{1,2}
Количество двуядерных клеток, %	16,3 ± 0,61	146,2 ± 5,26 ¹	115,3 ± 3,68 ^{1,2}	121,5 ± 4,37 ^{1,2}	122,2 ± 4,52 ^{1,2}	109,6 ± 3,95 ^{1,2}
Митотический индекс, %	0,54 ± 0,02	34,6 ± 1,25 ¹	25,1 ± 0,85 ¹	26,7 ± 0,91 ¹	27,8 ± 0,95 ¹	20,6 ± 0,70 ¹

Примечание. В этой таблице различия достоверны при $p < 0,05$: ¹ – по сравнению с показателями интактных животных; ² – по сравнению с показателями контрольной группы крыс.

При морфометрическом исследовании срезов печени на 37-е сутки после введения CCl_4 в течение 6 суток у животных наблюдается увеличение количества гепатоцитов на единицу площади (1 мм^2): во 2 группе количество гепатоцитов было больше, чем у интактных животных на 85,8 %, в 4 группе – на 48,1 %, в 6 группе – на 60,7 %, в 8 группе – на 54,1 %, а в 10 группе – на 40,9 %. На фоне гипероксидации установлено уменьшение размеров гепатоцитов: во 2 группе размер гепатоцитов уменьшился по сравнению с интактными животными на 45,5 %, в 4 группе – на 20,1 %, в 6 группе – на 32,7 %, в 8 группе – на 27,7 %, а в 10 группе – на 13,8 %.

Несмотря на изменение размеров гепатоцитов, размер ядер этих клеток у животных всех экспериментальных групп был примерно на одном уровне, при этом ядерно-цитоплазматический индекс на фоне гипероксидации изменялся в большую сторону: во 2 группе он был больше, чем у интактных животных на 88,5 %, в 4 группе – на 30,8 %, в 6 группе – на 53,8 %, в 8 группе – на 42,3 %, а в 10 группе – на 19,2 %.

При оценке регенераторных процессов печени крыс установлено, что CCl_4 влияет как на внутриклеточную, так и на клеточную регенерацию, о чем свидетельствует достоверное повышение числа митозов и количества двуядерных клеток. Так, во 2 группе крыс количество двуядерных гепатоцитов увеличилось в 8,9 раза по сравнению с интактными животными, в 4 группе – в 7,1 раза, в 6 и 8 группах – в 7,5 раз, а в 10 группе – в 6,7 раза. Установлено, что во 2 группе крыс количество митозов увеличилось в 64,1 раза по сравнению с интактными животными, в 4 группе – в 46,5 раз, в 6 группе – в 49,4 раза, в 8 группе – в 51,5 раза, а в 10 группе – в 38,1 раза.

Таким образом, при оценке регенераторных процессов печени экспериментальных крыс установлено достоверное повышение числа митозов, количества клеток на единицу площади препарата, числа двуядерных клеток. При этом преобладают внутриклеточные восстановительные процессы. Внутрижелудочная нагрузка растительными экстрактами позволяет снизить негативное влияние CCl_4 на ткани печени, и наиболее выраженный эффект наблюдается при применении смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики.

При исследовании реактивных приспособлений морфологического состава крови крыс к гипероксидации на фоне нагрузки растительными экстрактами было установлено, что внутрижелудочная нагрузка крыс антиоксидантами в составе растительных экстрактов приводит к увеличению количества эритроцитов и лейкоцитов, а также концентрации гемоглобина в пределах физиологической нормы, а гипероксидация наоборот, способствует снижению концентрации гемоглобина, количества эритроцитов и нефизиологическому повышению концентрации лейкоцитов, особенно сегментоядерных, а нагрузка растительными экстрактами способствует уменьшению таких негативных последствий, и наиболее выраженный эффект наблюдается при применении смеси.

На основании полученных данных морфологического состава крови крыс контрольной и экспериментальных групп произведен расчет гематологических лейкоцитарных индексов, позволяющих оценивать состояние иммунной системы, степень интоксикации, эффективность проводимой терапии, адаптации организма к внешним условиям (рис. 3).

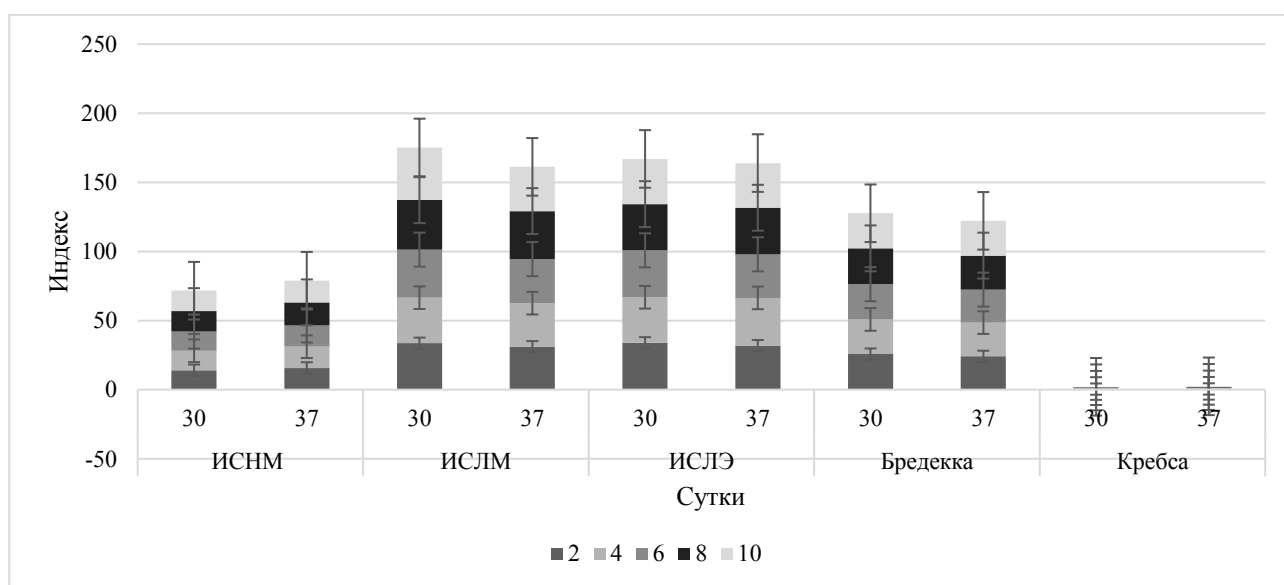


Рисунок 3 – Динамика лейкоцитарных индексов у крыс.

У крыс 2 группы на 37 сутки установлено повышение ИСНМ и индекса Кребса на 11,8 % и 24,4 % соответственно, и снижение ИСЛМ на 7,6 %, ИСЛЭ – на 6,2 % и индекса Бредекка – на 6,3 %; у крыс 4 группы установлено повышение ИСНМ, ИСЛЭ и индекса Кребса на 9,2 %, 5,0 % и 14,3 % соответственно, и снижение ИСЛМ на 4,3 % и индекса Бредекка – на 2,5 %; у крыс 6 группы установлено повышение ИСНМ и индекса Кребса на 11,1 % и 17,1 % соответственно, и снижение ИСЛМ на 8,4 %, ИСЛЭ – на 7,1 % и индекса Бредекка – на 6,4 %; у крыс 8 группы установлено повышение ИСНМ и индекса Кребса на 12,4 % и 17,1 % соответственно, и снижение ИСЛМ на 3,0 %, индекса Бредекка – на 5,0 %, а ИСЛЭ увеличился незначительно; у крыс 10 группы установлено повышение ИСНМ и индекса Кребса на 5,9 % и 9,5 % соответственно, и снижение ИСЛМ на 15,9 %, а ИСЛЭ и индекс Бредекка – изменились незначительно.

Отсутствие достоверных отличий в динамике индекса Кребса, индекса Бредекка и ИСЛЭ возможно связано с коротким периодом нагрузки животных растительными экстрактами и поэтому не отразилось в работе звеньев специфического и неспецифического иммунного ответа. Достоверные отличия ИСНМ и ИСЛМ по отношению к исходным значениям индексов у крыс, получавших растительные экстракты по отдельности и смесь, позволяют судить об интенсификации некоторых иммунных механизмов у животных.

Введение в организм CCl_4 оказывает выраженное токсическое действие и доказательством этого служит возрастание активности ферментов: амилазы, ЩФ, АСТ, АЛТ, ГГТ, концентрации глюкозы, мочевины и креатинина и билирубина в крови и снижение концентрации альбумина и общего белка. Введение в организм антиоксидантов в составе растительных экстрактов способствует снижению интенсивного влияния CCl_4 на организм и восстановлению нарушенного гомеостаза, и наиболее выраженный положительный эффект наблюдается при применении смеси растительных экстрактов.

Оценку эффективности гепатозащитного действия растительных экстрактов проводили по изучению в печени животных содержания микросомального белка и цитохрома P450, а также по показателям скорости реакций, гидроксирования анилина, N-деметилирования диметиланилина и реакции конъюгации с участием глутатионтрансферазы, отражающих активность детоксицирующей микросомальной системы печени (рис. 4).

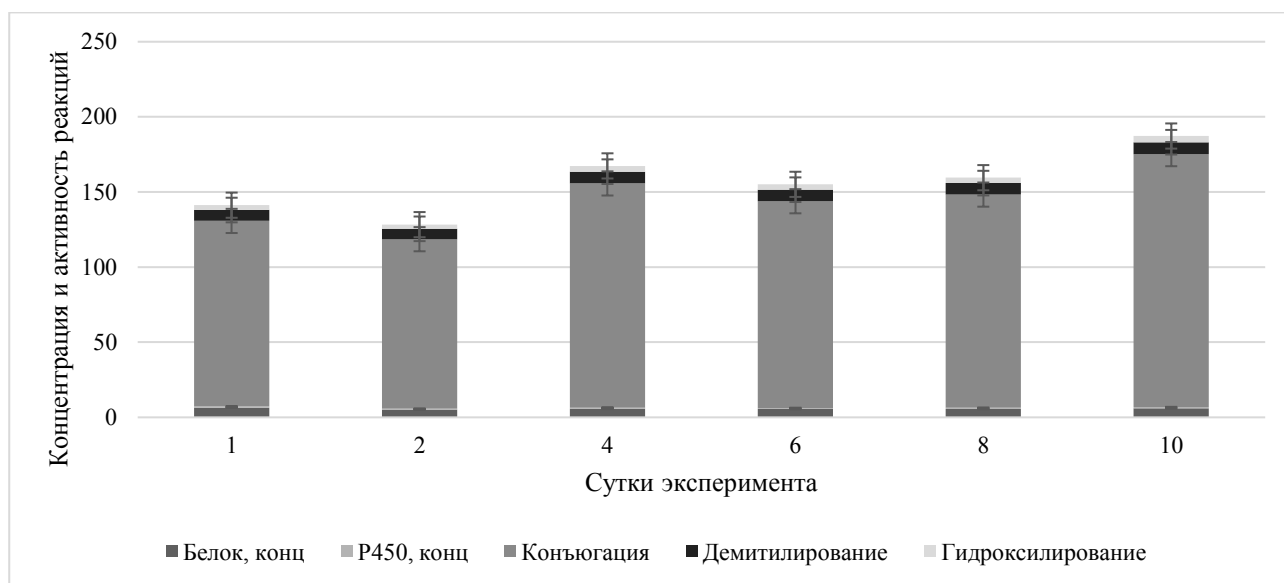


Рисунок 4 – Концентрации микросомального белка и цитохрома P450, а также скорость ферментативных реакций в условиях модели гипероксидации на фоне нагрузки растительными экстрактами.

В микросомах печени крыс 2 группы по сравнению с 1 группой установлено уменьшение концентрации микросомального белка на 19,8 % и цитохрома P450 на 25,2 %, что свидетельствует о токсическом поражении печени тетрахлорметаном. При этом у крыс 4, 6, 8 и 10 групп установлено снижение концентрации микросомального белка на 12,3 %, 15,8 %, 13,9 % и 8,4 % соответственно и незначительно возрастание концентрации цитохрома P450, кроме 10 группы (повышение концентрации на 13,6 %) по сравнению с интактными крысами. Наблюдаемая тенденция к повышению содержания доли цитохрома P450 на мг белка может свидетельствовать о компенсаторной индукции цитохрома P450 в печени под действием изучаемых растительных экстрактов.

На фоне гипероксидации у животных 2 группы установлено снижение скорости реакции конъюгации глутатионтрансферазы, N-деметилирования диметиланилина и гидроксилирования анилина на 8,7 %, 4,7 % и 13,7 % соответственно по сравнению с животными 1 группы, а у крыс, получавших растительные экстракты наоборот, скорости изучаемых реакций на фоне ОС возросли: в 4 группе на 20,8%, 7,9% и 19,3% соответственно; в 6 группе на 11,4 %, 6,1% и 10,9 %; в 8 группе – на 14,9 %, 5,4 % и 12,1 % соответственно и в 10 группе на 36,4 %, 9,4 % и 28,3 % соответственно.

По результатам исследования динамики синусоидальных клеток в норме и на фоне нагрузки растительными экстрактами при инициировании гипероксидации установлено, что на фоне гипероксидации снижается количество синусоидальных клеток в тканях печени и во 2 группе их количество снизилось на 41,3 %, в 4 группе – на 21,9 % в 6 группе – на 25,2 %, в 8 группе – на 34,6 % и в 10 группе на 6,9 %.

Результаты исследования концентрации цитокинов в плазме крови и тканях печени экспериментальных животных в норме, на фоне нагрузки растительными экстрактами при индуцированной гипероксидации представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 – Концентрация цитокинов в плазме крови крыс в норме и на фоне нагрузки растительными экстрактами при индуцированной гипероксидации

Группы	Показатель	Цитокины, М ± m			
		TNFα, пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-18, пг/мл	IL-10, пг/мл
1		16,29 ± 0,59	40,19 ± 1,41	5,61 ± 0,21	3589,13 ± 122,0
2		571,36 ± 18,28 ¹	42,44 ± 1,51	8,42 ± 0,29 ¹	89,58 ± 2,93 ¹
4		493,61 ± 17,29 ^{1,2}	59,31 ± 1,85 ^{1,2}	8,17 ± 0,27 ¹	993,69 ± 35,21 ^{1,2}
6		486,41 ± 17,15 ^{1,2}	51,28 ± 1,99 ^{1,2}	8,03 ± 0,33 ¹	829,32 ± 30,68 ^{1,2}
8		461,78 ± 16,62 ^{1,2}	58,25 ± 1,76 ^{1,2}	8,00 ± 0,41 ¹	803,41 ± 28,92 ^{1,2}
10		343,94 ± 11,62 ^{1,2}	68,93 ± 2,03 ^{1,2}	8,97 ± 0,39 ¹	1149,74 ± 47,12 ^{1,2}

Примечание. В этой таблице различия достоверны при $p < 0,05$: ¹ – по сравнению с показателями 1 группы; ² – по сравнению с показателями 2 группы крыс.

Таблица 7 – Концентрация цитокинов в тканях печени крыс в норме и на фоне нагрузки растительными экстрактами при индуцированной гипероксидации

Группы	Показатель	Цитокины, М ± m						
		IL-1α, пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-18, пг/мл	TNFα, пг/мл	IFNγ, пг/мл	IL-10, пг/мл	TGF-β, пг/мл
1		951,25 ± 34,25	28,31 ± 0,88	562,31 ± 20,23	688,18 ± 24,78	951,31 ± 30,44	180,86 ± 6,51	822,25 ± 29,60
2		1493,62 ± 53,77 ¹	37,93 ± 1,17 ¹	783,43 ± 28,21 ¹	1162,13 ± 37,19 ¹	729,27 ± 23,34 ¹	512,37 ± 16,9 ¹	239,41 ± 8,37 ¹
4		1212,36 ± 61,28 ^{1,2}	36,30 ± 1,31 ¹	691,45 ± 23,52 ^{1,2}	997,81 ± 31,93 ^{1,2}	851,14 ± 27,24 ^{1,2}	336,44 ± 11,77 ^{1,2}	579,34 ± 18,54 ^{1,2}
6		1295,84 ± 57,38 ^{1,2}	35,61 ± 1,13 ¹	703,21 ± 22,51 ^{1,2}	1039,22 ± 33,25 ^{1,2}	813,61 ± 26,04 ^{1,2}	380,59 ± 12,55 ^{1,2}	621,29 ± 21,75 ^{1,2}
8		1301,82 ± 63,71 ^{1,2}	36,20 ± 1,33 ¹	685,47 ± 23,99 ^{1,2}	981,16 ± 31,69 ^{1,2}	834,26 ± 30,03 ^{1,2}	345,82 ± 12,79 ^{1,2}	603,84 ± 19,32 ^{1,2}
10		1141,51 ± 60,24 ^{1,2}	30,81 ± 1,15 ^{1,2}	644,21 ± 22,56 ^{1,2}	871,72 ± 31,38 ^{1,2}	891,41 ± 30,31 ²	283,31 ± 9,06 ^{1,2}	731,53 ± 24,87 ^{1,2}

Примечание. В этой таблице различия достоверны при $p < 0,05$: ¹ – по сравнению с показателями 1 группы; ² – по сравнению с показателями 2 группы.

Установлено, повышение продукции цитокинов в сыворотке крови крыс на фоне гипероксидации по сравнению с животными 1 группы: во 2 группе концентрация TNF α возросла в 35,1 раза, IL-6 – незначительно, IL-18 – на 50,1% и IL-10 в 40,1 раза; в 4 группе концентрация TNF α возросла в 30,3 раза, IL-6 – на 47,5 %, IL-18 – на 45,6 % и IL-10 в 3,6 раза; в 6 группе концентрация TNF α возросла в 29,9 раза, IL-6 – на 27,5 %, IL-18 – на 43,1 % и IL-10 в 4,3 раза; в 8 группе концентрация TNF α возросла в 28,3 раза, IL-6 – на 44,9 %, IL-18 – на 42,6 % и IL-10 в 4,5 раза; в 10 группе концентрация TNF α возросла в 39,8 раза, IL-6 – на 71,5 %, IL-18 – на 59,9 % и IL-10 в 3,1 раза.

Установлено, повышение продукции IL-1 α , IL-6, IL-18, TNF α , IL-10 и снижение концентрации IFN γ и TGF- β в тканях печени крыс на фоне гипероксидации по сравнению с животными 1 группы: во 2 группе концентрация IL-1 α возросла на 57,0 %, IL-6 – на 34,0 %, IL-18 – на 39,3 %, TNF α – на 68,9 %, IL-10 – в 2,8 раза, а концентрация IFN γ и TGF- β снизилась на 23,3 % и в 3,4 раза соответственно; в 4 группе концентрация IL-1 α возросла на 27,5 %, IL-6 – на 28,2 %, IL-18 – на 22,9 %, TNF α – на 44,9 %, IL-10 – в 1,9 раза, а концентрация IFN γ и TGF- β снизилась на 10,5 % и на 29,5 % соответственно; в 6 группе концентрация IL-1 α возросла на 36,2 %, IL-6 – на 25,8 %, IL-18 – на 25,1 %, TNF α – на 51,0 %, IL-10 – в 2,1 раза, а концентрация IFN γ и TGF- β снизилась на 14,5 % и на 24,4 % соответственно; в 8 группе концентрация IL-1 α возросла на 36,9 %, IL-6 – на 27,8 %, IL-18 – на 21,9 %, TNF α – на 42,5 %, IL-10 – в 1,9 раза, а концентрация IFN γ и TGF- β снизилась на 12,3 % и на 26,6 % соответственно; в 10 группе концентрация IL-1 α возросла на 20,0 %, IL-6 – на 8,8 %, IL-18 – на 22,7 %, TNF α – на 26,7 %, IL-10 – в 1,6 раза, а концентрация IFN γ и TGF- β снизилась на 6,3 % и на 11,0 % соответственно.

Таким образом, установлено, что в ответ на диффузное токсическое повреждение печени и возникновение гипероксидации на системном уровне наблюдается усиленная выработка провоспалительного цитокина TNF α и подавление продукции IL-10, при этом концентрация провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-18 изменяется не существенно.

При этом на локальном уровне отмечается увеличение концентрации IL-1 α , IL-18, TNF α , IL-10 и снижение IL-6, IFN γ , TGF- β . Повышенная продукция IL-1 α и IL-18 в тканях печени, по-видимому, запускает локальное воспаление, повышая уровни таких цитокинов, как TNF α , IL-6. Повышение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 подтверждает ключевую роль данного медиатора в регуляции иммунного ответа и способность подавлять секрецию провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6. Таким образом, использование растительных экстрактов подавляет активацию тканевого и системного воспаления, предотвращает развитие дистрофического и воспалительного процессов в органе, а также стимулирует регенерацию печеночной ткани и наиболее выраженный эффект наблюдается при использовании смеси экстрактов ежевики и пижмы обыкновенной в соотношении 1:1

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в условиях нагрузки растительными экстрактами в тканях печени снижается активность антиоксидантных ферментов и диеновых конъюгатов в диапазоне от 5 до 29 %, но в условиях гипероксидации она способствует восстановлению окислительного гомеостаза, что обусловлено предотвращением образования гидропероксидов и обрыва цепных реакций окисления, расщеплением образующихся гидропероксидов без образования радикалов, инаktivацией свободных радикалов, стимулирующей экспрессии генов антиоксидантных ферментов и подавлением активности прооксидантных ферментов действующими веществами экстрактов и наибольшую эффективность демонстрирует смесь

растительных экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1 благодаря синергизму их биологически активных соединений.

2. Выявлено, что в условиях нагрузки крыс растительными экстрактами гистоморфологическая структура печени не претерпевает изменений, а при гипероксидации выявляются диффузная зернисто-вакуолярная дистрофия гепатоцитов, очаговые некрозы паренхимы и накопление жиров, увеличение количества гепатоцитов на 85,7%, двуядерных клеток – в 8,9 раза, ЯЦИ – на 88,5 % и митозов – в 64,1 раза, но регуляция перекисного окисления растительными экстрактами в условиях гипероксидации способствовала снижению степени выраженности дегенеративных изменений печени, что выражалось меньшим количеством гепатоцитов и двуядерных клеток в среднем на 19,0 %, ЯЦИ – на 27,6 %, митозов – на 27,6 % и большими размерами гепатоцитов (в среднем на 40,0 %) и наиболее положительный эффект наблюдался при использовании смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1.

3. Показано, что нагрузка растительными экстрактами способствует увеличению количества эритроцитов (от 6,8 до 13,8 %), лейкоцитов (от 14,8 до 19,3 %) и концентрации гемоглобина (от 5,8 до 7,6 %) в крови крыс в пределах физиологической нормы, а при гипероксидации у животных выявлено снижение количества эритроцитов (5,5 %) и лимфоцитов (6,2 %), концентрации гемоглобина (6,0 %) и увеличение лейкоцитов (57,1 %), что характеризует дисбаланс между специфическим и неспецифическим компонентами иммунитета, а регуляция перекисного окисления растительными экстрактами в условиях гипероксидации нормализует морфологический состав крови животных и наиболее выраженный эффект наблюдается при применении смеси пижмы и ежевики в соотношении 1:1.

4. Определено, что CCl₄ оказывает выраженное токсическое действие, проявляющееся возрастанием концентрации ферментов: амилазы (в 7,2 раза), ЩФ (на 18,5 %), АСТ (на 156,2 %), АЛТ (67,9 %), ГГТ (на 71,6 %), концентрации глюкозы (на 44,1 %), мочевины (на 302,7 %), креатинина (на 325,0 %) и билирубина (на 49,5 %) в крови крыс и снижение концентрации альбумина (на 24,6 %) и общего белка (на 13,2 %), что свидетельствует о формировании токсического гепатита с выраженными цитолитическим и холестатическим синдромами и состояния гипероксидации, а регуляция перекисного окисления растительными экстрактами в условиях гипероксидации нормализует нарушенный гомеостаз за счет стабилизации мембран клеток и лизосом и нейтрализации токсичных свободных радикалов и наиболее выраженный эффект наблюдается при применении смеси экстрактов пижмы и ежевики в соотношении 1:1.

5. Доказано, что в условиях гипероксидации растительные экстракты эффективно ингибируют перекисное окисление в тканях печени крыс путем компенсаторной индукции цитохрома P450, проявляя гепатопротекторные и детоксицирующие свойства в снижении токсического действия CCl₄ на микросомальные ферменты печени ($p \leq 0,05$) и активность ферментов, катализирующих реакции гидроксирования, деметилирования и конъюгации ($p \leq 0,05$) и наиболее выраженный эффект установлен при использовании смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1.

6. Доказано, что в условиях гипероксидации растительные экстракты способствуют усилению выработки провоспалительного цитокина TNF α ($p \leq 0,05$) и подавление продукции IL-10 ($p \leq 0,05$) на системном уровне, а на локальном уровне – увеличению концентрации IL-1A, IL-18, TNF α , IL-10 ($p \leq 0,05$) и снижению – IL-6, IFN γ и TGF- β ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о подавлении активации тканевого и системного воспаления, дистрофических процессов в печени и стимуляции ее регенерации и наиболее выраженный эффект наблюдается при использовании смеси экстрактов ежевики и пижмы обыкновенной в соотношении 1:1 благодаря синергизму их биологически активных соединений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в ходе диссертационного исследования данные позволяют рекомендовать включение смеси экстрактов пижмы обыкновенной и ежевики в соотношении 1:1 в схемы терпии и профилактики токсических поражений печени на основании выявленных в ходе исследования положительных влияний данной смеси на восстановление дисбаланса перекисных и антиперекисных процессов, гистоморфологической структуры печени, морфологического и биохимического состава крови крыс, скорости монооксигеназных реакций, а также иммунных и репаративных процессов.
2. Предложенная смесь растительных экстрактов позволяет стабилизировать окислительный гомеостаза организма, что показывает эффективность ее дальнейшего использования в исследованиях по изучению патологических состояний, вызванных гипероксидацией.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В результате обобщения теоретического материала и результатов экспериментальных исследований определены направления дальнейшей разработки темы: изучение корреляционных взаимосвязей перекисных и антиперекисных процессов в мозге, сердце и других органах, и оценка стабилизации нарушенного окислительного гомеостаза при использовании растительных экстрактов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исследование иммунных механизмов в тканях печени и плазме крови крыс на фоне нагрузки растительными экстрактами и индуцированном оксидативном стрессе / О.Н. Павлова, О.Н. Гуленко, Д.С. Громова, Е.Ю. Кузина // **Генетика и разведение животных (К2)**. – 2024. – № 1. – С. 60–66. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2024-1-60-66>
2. Изучение биохимических и морфологических особенностей крови крыс при нагрузке экстрактом Пижмы обыкновенной на фоне оксидативного стресса / Е.Ю. Кузина, О.Н. Павлова, О.Н. Гуленко, Д.С. Громова // **Современные вопросы биомедицины (К2)**. – 2024. – Т. 8, № 2. https://doi.org/10.24412/2588-0500-2024_08_02_13
3. Исследование морфологических и биохимических особенностей крови крыс при нагрузке экстрактом ежевики кустистой на фоне оксидативного стресса / Е.Ю. Кузина, О.Н. Гуленко, О.Н. Павлова, О.Е. Валиуллина, А.А. Федотова // **Международный научно-исследовательский журнал (К2)**. – 2024. – № 5 (143). <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.53>
4. Study of reparative processes and immune mechanisms in liver tissues and blood plasma of rats against the background of loading with plant extracts and induced oxidative stress / Ekaterina Kuzina, Olga Pavlova, Olga Gulenko, Darya Gromova, Olga Bukareva // E3S Web Conf. XVII International Scientific and Practical Conference “State and Prospects for the Development of Agribusiness – INTERAGROMASH 2024”. – 18 June 2024. – Vol. 113. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202411305013>
5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023686110. Программа для определения оксидативного стресса в тканях / Кузина Е.Ю., Леонов В.В., Гуленко О.Н., Павлова О.Н., Аносова Е.Ю., Еганян А.С., Казиахмедова З.Г. Заявка № 2023684694; пост. 21.11.2023; регистр. 04.12.2023.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОИ_{общ} – общий антиоксидантный индекс
АФК – активные формы кислорода
ГП – глутатионпероксидаза
ГР – глутатионредуктаза
ДК – диеновый конъюгаты
ИСЛМ – индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов
ИСЛЭ – индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов
ИСНМ – индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов
ЛАИ – локальный антиоксидантный индекс
МДА – малоновый диальдегид
ОС – оксидативный стресс
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПОЛ-АО – перекисное окисление липидов-антиоксидантов
СОД – супероксиддисмутаза
СР – свободный радикал