

На правах рукописи



Зайбель Ирина Александровна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ
ГОМЕОСТАТИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИ АБИКТИНОВОЙ
ИНТОКСИКАЦИИ И СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ**

16 00 02 – патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Барнаул 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет» на кафедре анатомии и физиологии сельскохозяйственных животных Института ветеринарной медицины и биотехнологии

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук
Донкова Наталья Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук,
профессор
Чумаков Виктор Юрьевич

кандидат ветеринарных наук, доцент
Сафронова Екатерина Дмитриевна

Ведущая организация:

Вятская государственная
сельскохозяйственная академия

Защита состоится « 30 » мая 2007 г в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220 002 02 при ФГОУ ВПО «Алтайский государственный аграрный университет» по адресу 656922, г Барнаул, ул Попова, 276, т/факс (3852) 31-06-36

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Алтайский государственный аграрный университет»

Автореферат разослан «24» апреля 2007г

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор ветеринарных наук,
профессор



П И Барышников

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В сельском хозяйстве нет фактора, более тесно связанного с проблемой охраны природы, особенно охраны здоровья человека, чем химизация отрасли. Вопросы безопасного обращения пестицидов, агрохимикатов и химиотерапевтических средств чрезвычайно важны. Способность их к циркуляции в объектах окружающей среды (вода, почва) и их наличие в сельскохозяйственной продукции обуславливает возможность хронического неблагоприятного воздействия на живой организм. К тому же немало действующих веществ пестицидов и агрохимикатов, обладают способностью к материальной биологической кумуляции – накоплению в биосредах человека в крови, грудном материнском молоке, волосах (Жуленко В.Н., Рабинович М.И., Таланов Г.А., 2001, Онищенко Г.Г., 2003, Амиров Н.Х., Васильев В.В., Иванов А.В., 2005).

Увеличение в экосистеме вредных факторов химической этиологии, обусловленное деятельностью человека, и отрицательные последствия применения современных агрохимикатов и химиотерапевтических препаратов становятся причиной изменения важнейших параметров функционирования живых систем, и ставит задачу комплексного изучения воздействия ксенобиотиков на организм (Кашин А.С., 2000, Донкова Н.В., 2004).

В современной агрохимии и животноводстве широкое распространение получили авермектины, как одни из самых эффективных средств борьбы с эндо- и эктопаразитами растений и животных. Применение препаратов данной группы в качестве пестицидов приводит к повышению санитарно-гигиенической опасности, связанной с загрязнением их остатками сельскохозяйственной продукции. По данным некоторых авторов лишь 0,1% применяемых пестицидов достигает цели, остальная же часть является источником загрязнения окружающей среды, в том числе продуктов животноводства (Русаков С.В., Стерлина Т.С., Новик Т.С. и др., 2003, Scogerboe T.L. et al., 2000, Gunter F.A., 2004). Вместе с тем отдаленные последствия воздействия авермектинов на организм животных и человека останутся до конца не изученными.

Известно, что одним из базовых механизмов токсичности ксенобиотиков является индукция ими окислительного стресса. Поддержание устойчивого состояния окислительно-восстановительного гомеостаза клетки может происходить при действии адаптогенов природного происхождения, которые оказывают влияние, как на клеточные мембраны, так и на ее метаболизм, проявляя антиоксидантную и антигипоксидантную активность (Яременко К.В., 1990, Кармолиев Р.Х., 2002, Сулайманова Г.В., 2005).

В настоящее время идет поиск новых видов адаптогенов, которые бы обладали широким спектром защитного действия. Одним из таких адаптогенов является бетулин – тритерпеноид, получаемый из внешней коры березы, проявляющий широкий спектр биологической активности (Pavlova N.J. et al., 2003). Однако, технически гораздо проще и дешевле использовать

бетулиносодержащие экстракты бересты березы, получаемые традиционными методами экстракции органическими растворителями (Кузнецова С.А., 2002, 2005). Вместе с тем механизмы компенсаторно-адаптационных процессов, лежащие в основе действия бетулинсодержащих адаптогенов на организм на фоне токсических и стрессорных факторов, остаются недостаточно выясненными, что существенно снижает возможности их практического применения.

Цель работы: изучить морфофункциональные изменения органов гомеостатического обеспечения крыс при абиктиновой интоксикации и разработать коррекцию этих изменений при помощи бетулинсодержащего фитоадаптогена.

Задачи исследований:

1 Исследовать морфобиохимические показатели крови крыс при токсическом действии ксенобиотика – абиктина.

2 Исследовать процессы перекисного окисления липидов в суспензии клеток костного мозга при воздействии абиктина.

3 Изучить гистоструктуру печени, почек, 12-перстной кишки и головного мозга крыс при абиктиновой интоксикации.

4 Изучить защитное действие фитоадаптогена (экстракта бересты березы) на фоне абиктиновой интоксикации.

Научная новизна. Впервые изучены морфофункциональные изменения в организме крыс при длительном воздействии абиктина, проявляющиеся в виде угнетения кроветворения и развития патологических процессов в органах гомеостатического обеспечения – почках и печени.

Впервые установлены антиоксидантные и антитоксические свойства нового фитоадаптогена – экстракта бересты березы (ЭББ) на фоне воздействия ксенобиотика. Показано, что применение фитоадаптогена ЭББ в условиях абиктиновой интоксикации предотвращает развитие анемии и препятствует развитию деструктивных изменений в почках и печени.

Практическая и теоретическая значимость работы:

Данная работа является фрагментом темы «Структурно-функциональные основы гомеостаза сельскохозяйственных животных при экстремальных состояниях» основных научных исследований института ветеринарной медицины и биотехнологии Красноярского государственного аграрного университета.

Работа носит экспериментальный характер.

Полученные данные расширяют представления о механизме цитотоксического действия абиктина. Выявленные закономерности морфофункциональных изменений позволяют оптимизировать пути коррекции токсических эффектов ксенобиотика. Продемонстрирована эффективность экспериментального препарата – экстракта бересты березы в снижении цитотоксического действия абиктина. Результаты исследования могут быть использованы при оценке степени вреда, наносимого избыточным применением пестицидов, содержащих абиктин.

Внедрение. Основные материалы используются в учебном процессе и научной работе на кафедрах аграрных ВУЗов России Бурятской, Иркутской госсельхозакадемий, Хакасского государственного университета, Алтайского и Красноярского государственных аграрных университетов

Основные положения, выносимые на защиту:

1 Морфобioхимические изменения в периферической крови при длительном воздействии ксенобиотика – абиктина

2 Индукция окислительного стресса в клетках красного костного мозга под действием абиктина в зависимости от дозы и кратности введения препарата

3 Морфофункциональные изменения в органах гомеостатического обеспечения (почки, печени, кишечнике и головном мозге) при длительном воздействии абиктина

4 Защитные свойства фитоадаптогена, выделенного из бересты березы, на фоне токсического действия ксенобиотика

Апробация работы. Основные материалы исследований доложены и получили одобрение на XI Международном симпозиуме «Гомеостаз и экстремальные состояния организма» (Красноярск, 2003), Международной конференции молодых ученых (Улан-Удэ, 2004), Всероссийской научной конференции «Аграрная наука на рубеже веков» (Красноярск, 2004), Сибирском ветеринарном конгрессе (Новосибирск, 2005), XIII Международном симпозиуме «Сложные системы в экстремальных условиях» (Красноярск, 2006)

Публикации. По результатам научных исследований опубликовано восемь печатных работ, из них две – в ведущих научных журналах, перечень которых утвержден ВАК

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений Работа изложена на 113 страницах, содержит 15 таблиц, 2 рисунка, 21 микрофотографию, 12 диаграмм и 1 схему Список литературы включает 229 наименований, из них 34 зарубежных источника

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

Экспериментальная работа выполнена на базе кафедры анатомии и физиологии сельскохозяйственных животных Красноярского государственного аграрного университета и института химии и химических технологий Сибирского отделения Российской Академии Наук (ИХХТ СО РАН)

Исследования проведены на двухстах белых беспородных крысах-самцах массой 150-200 г 2-2,5 месячного возраста Животные содержались в виварии

при температуре воздуха 20-22° С, влажности не более 50%, в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой

В ходе экспериментальных исследований было проведено две серии опытов

В первой серии опытов было сформировано три группы клинически здоровых крыс

Первая группа – контрольные животные, получавшие в эквивалентных количествах физиологический раствор в течение опыта, вторая группа – крысы, получавшие абиктин (Агроветсервис, г Москва) в дозе 0,3 мг/кг подкожно, в течение 14 дней, третья группа – крысы, получавшие абиктин в дозе 1,0 мг/кг подкожно, 14 дней подряд Морфобioхимические, гистологические исследования, изучение процессов перекисного окисления липидов проводили на седьмые и 14-е сутки Для изучения восстановительного периода, исследования проводили на 21-е и 28-е сутки опыта

Во второй серии опытов в качестве адиптогена использовали экстракт бересты березы (ЭББ) Перед применением данный препарат разводили крахмальной суспензией Животные были разделены на четыре группы

Первая группа – контрольные животные, получавшие в эквивалентных количествах физиологический раствор в течение опыта, вторая группа – крысы, получавшие ЭББ (внутрижелудочно, через зонд) в дозе 600 мг/кг в течение 14 дней, третья группа – крысы, получавшие абиктин в дозе 1,0 мг/кг, 14 дней, четвертая группа – крысы, получавшие абиктин в дозе 1,0 мг/кг + ЭББ в дозе 600 мг/кг в течение 14 дней Морфобioхимические, гистологические исследования, изучение процессов перекисного окисления липидов проводили на седьмые и 14-е сутки Для изучения восстановительного периода, исследования проводили на 21-е и 28-е сутки опыта

Материалом для исследований послужили цельная и стабилизированная трилопом Б кровь, сыворотка и мазки крови, суспензия клеток красного костного мозга, печень, почки, 12-перстная кишка и головной мозг крыс

Отбор периферической крови производили утром натошак путем пункции хвостовой вены Подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов проводили в камере Горяева стандартными методами

Лейкоцитарную формулу выводили на мазках крови, окрашенных по Паппенгейму Определение концентрации гемоглобина осуществляли гемоглобинцианидным методом на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр)

Содержание общего белка в сыворотке крови определяли по биуретовой реакции Оптическую плотность опытной пробы измеряли на фотоэлектроколориметре с длиной волны 540-560 нм (зеленый светофильтр) Расчет проводили по калибровочному графику

Содержание белковых фракций определяли нефелометрическим методом на основе фосфатного буфера Результат определяли по оптической плотности на фотоэлектроколориметре при длине волны 630-690 нм (красный светофильтр)

Для определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови использовали унифицированный динитрофенилгидрозиновый метод Райтмана – Френкеля

Выделение клеток костного мозга проводили по методу Е Д Гольдберг с соавторами (1992) Источником клеток костного мозга служила бедренная кость опытных крыс Животных забивали методом цервикальной дислокации спинного мозга Вскрывали полость бедренной кости и с помощью иглы и шприца вымывали содержимое кости физиологическим раствором (0,5-1,0 мл раствора на кость) Материал ресуспендировали путем пропускания через иглы уменьшающего диаметра (без образования пены), центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин После этого удаляли третью часть надосадочной жидкости, материал ресуспендировали и готовили мазки

Исследование продуктов перекисного окисления липидов в суспензии клеток костного мозга в тесте с тиобарбитуровой кислотой проводили путем определения содержания ТБК-активных продуктов по методу Л И Андреевой с соавторами (1998) Для анализа брали 0,3 мл суспензии клеток, приливали к ней 3 мл 1% ортофосфорной кислоты, 1,0 мл 0,6 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и 0,1 мл раствора сернокислого железа Пробирки ставили в кипящую водяную баню на 1 час Затем пробирки охлаждали в холодной воде, добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-2, при длине волны 535 нм против бутанола Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида (МДА), равного $1,56 \cdot 10^5$ моль см^{-1}

Для гистологического исследования кусочки печени, почек, 12-перстной кишки и головного мозга фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм Окрашенные гематоксалин-эозином и по методу Ван-Гизон срезы, микроскопировали при об 8х, 40х, 90х и 100х на микроскопе МС 50 Микрофотосъемку проводили камерой CAM V200 совмещенной с компьютером посредством кабеля USB 2.0 с помощью программного обеспечения BioVision 2005

На гистологических препаратах печени и почек подсчитывали количество двуядерных клеток, а так же очаги некрозов, в число которых включали уницеллюлярные и фокальные

Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента на персональном компьютере с помощью пакета программ Microsoft Office XP и XSTAT 2006 Различия считали значимыми, если вероятность случайности не превышала 5% ($P < 0,05$) (Лакин Г Ф , 1990)

2.2. Результаты исследования

2.2.1. Морфофункциональные изменения в организме крыс при абиктиновой интоксикации

Повышенное накопление абиктина в организме крыс приводило к расстройству процессов кроветворения и нарушению синтеза белков. Важным диагностическим показателем токсического действия абиктина являлось появление анемии и нейтрофильного лейкоцитоза.

При введении абиктина в дозе 0,3 мг/кг на седьмые сутки в периферической крови уменьшалось количество эритроцитов на 23,8 %, к 14-м суткам – на 30,5 % ($P<0,05$) по сравнению с показателями контрольной группы (табл 1).

При введении абиктина в дозе 1,0 мг/кг количество эритроцитов на седьмые сутки уменьшалось на 44% ($P<0,05$), к 14-м суткам – на 50,9% ($P<0,05$).

Таблица 1 – Показатели периферической крови крыс при введении абиктина

№ п/п	Условия опыта	Эритроциты, $10^{12}/л$	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, $10^9/л$
7-е сутки				
1	Контроль	$10,88 \pm 0,15$	$165,07 \pm 0,01$	$15,22 \pm 0,16$
2	Абиктин, 0,3 мг/кг	$8,29 \pm 0,12$	$157,23 \pm 1,23^*$	$17,28 \pm 0,60$
3	Абиктин, 1,0 мг/кг	$6,09 \pm 0,18^*$	$123,13 \pm 0,04^{**}$	$22,54 \pm 2,08^{**}$
14-е сутки				
1	Контроль	$11,40 \pm 0,12$	$160,0 \pm 2,06$	$15,22 \pm 0,16$
2	Абиктин, 0,3 мг/кг	$7,93 \pm 0,10^*$	$111,10 \pm 0,89^*$	$26,50 \pm 1,94^{**}$
3	Абиктин, 1,0 мг/кг	$5,60 \pm 0,40^*$	$62,92 \pm 0,83^{**}$	$36,17 \pm 2,36^{***}$

Примечание: достоверность отличий по сравнению с контролем

* $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$

Концентрация гемоглобина достоверно снижалась на протяжении всего эксперимента к седьмым суткам при дозе 0,3 мг/кг – на 5,0 %, а к 14-м суткам – на 30,6 % по сравнению с показателями контрольной группы. При введении абиктина в дозе 1,0 мг/кг, к седьмым суткам концентрация гемоглобина снижалась на 25,4 % ($P<0,05$), а к 14-м суткам – на 60,7 % ($P<0,01$) (табл 1).

На фоне развивающейся анемии отмечался рост числа лейкоцитов в периферической крови крыс, длительно получавших абиктин.

При введении абиктина в дозе 0,3 мг/кг количество лейкоцитов возрастало к седьмым суткам опыта на 13,5 %, а к 14-м суткам – в 1,7 раза ($P<0,01$) по сравнению с контролем

В группе, где применяли абиктин в дозе 1,0 мг/кг, количество лейкоцитов увеличивалось к седьмым суткам в 1,5 раза ($P<0,01$), а на 14-е сутки – в 2,37 раза ($P<0,001$)

Рост числа лейкоцитов происходил за счет увеличения количества нейтрофильных гранулоцитов. В лейкограмме периферической крови крыс, получавших абиктин в дозе 1,0 мг/кг, к 14-м суткам опыта количество сегментоядерных нейтрофилов возрастало на 31,7% ($P<0,01$), при этом количество палочкоядерных форм увеличивалось на 6,5 % с одновременным снижением количества лимфоцитов 12,2% ($P<0,001$)

В восстановительный период у экспериментальных животных отмечалась тенденция к постепенному увеличению количества эритроцитов и концентрации гемоглобина, а так же снижению количества лейкоцитов. Так, количество эритроцитов в третьей опытной группе через семь дней после прекращения применения абиктина (21-е сутки эксперимента) увеличивалось на 13,6 %, достигнув $6,36 \pm 0,01 \cdot 10^{12}/л$, а через 14 суток (28-е сутки эксперимента) – на 45,5 % ($P<0,05$), составив $8,15 \pm 0,01 \cdot 10^{12}/л$, но оставаясь ниже показателей контрольной группы на 39,9 %

Уровень гемоглобина в восстановительный период в опытных группах постепенно повышался, и к 28-м суткам составил во второй группе $138,70 \pm 2,9$ г/л, что ниже нормы на 13,8 %, и в третьей группе – $122,87 \pm 2,01$ г/л, что ниже нормы на 23,2 %

Количество лейкоцитов в восстановительный период постепенно снижалось, приближаясь к уровню контрольной группы, но, не достигая их значений. Так, во второй группе к 21-м суткам опыта превышение числа лейкоцитов было на 40 %, а к 28-м суткам – на 20 % ($P<0,01$), что составило соответственно $21,76 \pm 0,32 \cdot 10^9/л$ и $18,93 \pm 1,02 \cdot 10^9/л$. В третьей группе снижение количества лейкоцитов в восстановительный период происходило медленнее и к 28-м суткам опыта уровень лейкоцитов превышал контрольные показатели на 40,5% ($P<0,001$), составив $21,98 \pm 0,97 \cdot 10^9/л$

Описанные выше изменения в восстановительный период расцениваются нами как одно из проявлений резистентности организма со стороны костномозгового кроветворения в виде процесса регенерации крови после токсического действия абиктина

Введение абиктина крысам в дозах 0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг вызывает изменение биохимического состава крови с проявлением зависимости «время – эффект» и «доза – эффект». В сыворотке крови достоверно уменьшается концентрация, изменяется соотношение белковых фракций, увеличивается уровень цитолитических ферментов (аминотрансфераз)

При дозе 0,3 мг/кг количество общего белка в сыворотке крови уменьшалось к седьмым суткам опыта на 4,19% ($P<0,01$) и к 14-м суткам – на 8,24% ($P<0,05$) (рис 1)

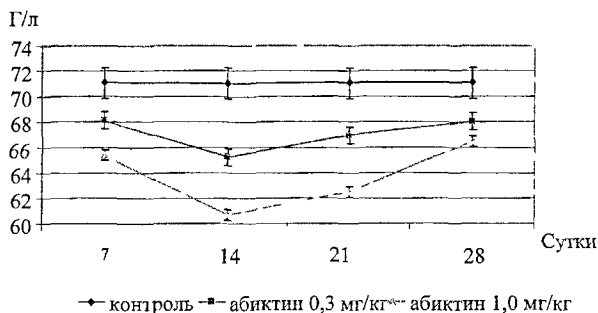


Рис 1 Динамика уровня общего белка при абиктиновой интоксикации

Развитие гипопротенемии происходило, в основном, за счет снижения уровня альбуминов, количество которых к седьмым суткам составило $25,86 \pm 1,02$ г/л ($P < 0,05$), а к 14-м суткам – $19,94 \pm 0,09$ г/л ($P < 0,001$), что в 1,6 раз меньше по сравнению с контролем

Введение абиктина в дозе 1,0 мг/кг вызывало более выраженную гипопротенемию. Количество общего белка в сыворотке крови достоверно уменьшалось к 14-м суткам на 17 % ($P < 0,05$), составив $60,64 \pm 0,27$ г/л (рис 1), что также происходило в основном, за счет понижения уровня альбуминов, концентрация которых к этому времени снизилась вдвое и составила $16,18 \pm 0,09$ г/л ($P < 0,05$) при контроле – $30,21 \pm 1,11$ г/л. Длительное воздействие абиктина приводило, наряду с понижением альбуминов, к увеличению уровня γ -глобулинов на 41 % (во второй группе) и на 58% (в третьей группе)

Во время восстановительного периода уровень общего белка и белковых фракций в сыворотке крови постепенно приближался к значениям контрольной группы. На 28-е сутки уровень общего белка в третьей группе достоверно увеличивался на 8,8 % ($P < 0,05$) по сравнению с 14-ми сутками. При этом количество альбуминов увеличивалось на 40,9 %, составив $22,79 \pm 0,05$ г/л ($P < 0,001$), а общее количество глобулинов не изменялось и составляло $43,56 \pm 0,04$ г/л

Наряду с изменениями уровня общего белка и белковых фракций наблюдалось изменение количества и соотношения ферментов сыворотки крови, таких как АСТ и АЛТ, являющихся маркерами цитолиза гепатоцитов

При введении абиктина в дозе 0,3 мг/кг уровень АСТ и АЛТ увеличивался к 14-м суткам опыта соответственно в 2,1 раза ($P < 0,01$) и 2,9 раза ($P < 0,01$), составив $0,63 \pm 0,05$ ммоль/(л ч) и $0,73 \pm 0,04$ ммоль/(л ч)

Достоверное повышение содержания ферментов при введении абиктина в дозе 1,0 мг/кг отмечалось уже к седьмым суткам. АСТ достоверно увеличивалась по сравнению с контролем в 2,1 раза ($P < 0,01$) и АЛТ – в 3,2 раза

($P < 0,01$), что составило соответственно $0,65 \pm 0,12$ ммоль/(л ч) и $0,79 \pm 0,09$ ммоль/(л ч)

В восстановительный период наблюдалась тенденция к нормализации уровня цитолитических ферментов, однако к 28-м суткам уровень АСТ оставался выше контрольных значений во второй группе в 1,76 раза, в третьей – в 2,5 раза, уровень АЛТ был выше в 2 раза и 3,28 раза соответственно

В проведенных нами исследованиях абиктин индуцировал перекисное окисление липидов в клетках костного мозга с проявлением зависимости от дозы и кратности введения

Семидневный курс введения абиктина в дозе 0,3 мг/кг увеличивал уровень малонового диальдегида до $0,76 \pm 0,08$ мкмоль/л по сравнению с контрольной группой ($0,55 \pm 0,25$ мкмоль/л), то есть на 38 %, а при 14-дневном курсе – до $1,22 \pm 0,12$ мкмоль/л, то есть вдвое (рис 2)



Рис 2 Уровень МДА в суспензии клеток костного мозга при абиктиновой интоксикации

Увеличение дозы абиктина до 1,0 мг/кг сопровождалось активацией свободнорадикальных процессов, к седьмым суткам содержание МДА увеличивалось до $1,09 \pm 0,08$ мкмоль/л, то есть почти вдвое ($P < 0,05$), а к 14-м суткам достигало $1,63 \pm 0,12$ мкмоль/л, то есть возрастала втрое ($P < 0,001$)

Во время восстановительного периода происходило снижение уровня МДА в клетках костного мозга. После введения абиктина в дозах 0,3 и 1,0 мг/кг уровень МДА на 28-е сутки составлял соответственно $0,69 \pm 0,07$ мкмоль/л и $0,76 \pm 0,05$ мкмоль/л, то есть превышал уровень контроля всего на 14%. Это согласуется с тенденцией к нормализации показателей периферической крови в восстановительный период.

При микроструктурном анализе печени, почек, 12-ти перстной кишки и головного мозга крыс, получавших различные дозы абиктина в течение двух недель, установили следующие изменения. На седьмые сутки введения абиктина в дозе 0,3 мг/кг в печени крыс отмечалась умеренно выраженная макрофагальная инфильтрация стромы в области портальных трактов.

С увеличением дозы препарата до 1,0 мг/кг наблюдалось полнокровие вен портальных трактов с небольшой лимфоцитарной инфильтрацией, в гепатоцитах отмечались слабо выраженные дистрофические изменения, часто обнаруживались двуядерные клетки

В почках крыс, получавших препарат в дозе 0,3 мг/кг, на седьмые сутки было заметно умеренное полнокровие капилляров клубочков. Полость капсул почечного тельца хорошо выражена. Подоциты париетального листка капсулы без видимых изменений

При увеличении дозы абиктина до 1,0 мг/кг наблюдалось ярко выраженное полнокровие сосудистых клубочков почечных телец коркового слоя со скоплением лимфоцитов в мезангии. Полость капсулы почечного тельца резко расширена. Появлялись единичные некрозы эпителия канальцев и диффузная инфильтрация лимфоцитами по ходу стромы мозгового слоя

В 12-перстной кишке и головном мозге на седьмые сутки опыта видимых изменений не выявляли

К 14-м суткам опыта интенсивность дистрофических и воспалительных процессов в печени и почках нарастала. Так, в печени крыс, получавших абиктин в дозе 0,3 мг/кг, на 14-е сутки, отмечалось полнокровие вен портальной системы, в междольковой строме обнаруживалось умеренное количество фибробластов

С увеличением дозы до 1,0 мг/кг наблюдались дистрофические и некробиотические изменения в гепатоцитах перипортальной зоны. Гепатоциты часто имели вакуолизированную цитоплазму и пикнотические гиперхромные ядра. Микроскопически выявляли унициллиоллярные и фокальные некрозы

При микроструктурном анализе почек крыс, получавших абиктин в дозе 0,3 мг/кг в течение 14-ти суток, выявлено умеренное полнокровие сосудов среднего и малого калибра, включая капилляры клубочков, с множественными диапедезными кровоизлияниями в корковом слое

При изучении препаратов почек, получавших абиктин в течение 14-и дней в дозе 1,0 мг/кг, отмечались выраженные гемодинамические и гемореологические расстройства по типу выраженного эритроцитарного стаза в капиллярных клубочках, прекапиллярах и венах коркового слоя, множественные обтурирующие, эритроцитарные тромбы в артериях мелкого и среднего калибра. На фоне этого имел место диффузный колликационный некроз эпителиоцитов канальцев коркового слоя, с полной обтурацией просвета в проксимальных и дистальных извитых канальцах. Отмечалось множество очаговых, лейкоцитарно-макрофагальных инфильтратов, которые располагались преимущественно вблизи клубочков, единичные лимфоцитарные инфильтраты в отечной строме коркового слоя

В 12-перстной кишке крыс к 14-м суткам опыта отмечалось укорочение, деформация, вакуольная дистрофия ворсинок, наблюдалось увеличение количества бокаловидных клеток и укорочение крипт

В коре больших полушарий головного мозга и мозжечке выраженных морфологических изменений не выявлено

При исследовании морфометрических показателей печени и почек крыс, получавших абиктин, отмечалось повышение количества очагов некроза при увеличении вводимой дозы препарата с 0,3 мг/кг до 1,0 мг/кг с $24,20 \pm 3,00$ до $32,40 \pm 2,60$ ($P < 0,05$) на 1 см² к 14-м суткам в печени, и в почках с $28,20 \pm 0,96$ до $36,80 \pm 0,24$ ($P < 0,001$)

При этом отмечалось увеличение количества доли двуядерных клеток к 14-м суткам на 48 % в печени и в два раза в почках, что соответственно составило $8,01 \pm 1,25$ и $8,54 \pm 0,44$

Таким образом, абиктин вызывает нарушение морфофункционального состояния организма, проявляющегося нарушением гемопоэтической функции, увеличением перекисидации липидов биомембран костномозговых клеток, дегенеративными (дистрофическими), воспалительными и некробиотическими изменениями, наиболее ярко выраженными в печени и почках

2.2.2. Изучение защитного действия фитоадаптогена (ЭББ) при абиктиновой интоксикации

С целью коррекции токсического действия ксенобиотика – абиктина, применяли бетулинсодержащий адаптоген – ЭББ (экстракт бересты березы), выделенный ИХХТ СО РАН (г Красноярск) Основные компоненты, определяемые в экстракте, относятся к тритерпеноидам лупанового ряда, относительное содержание которых превышает 95 %

Отдельное введение крысам ЭББ не вызывало существенного изменения показателей периферической крови, различия с контролем составляли 2-5 %

Применение ЭББ на фоне абиктиновой интоксикации предотвращало развитие анемии. Количество эритроцитов к седьмым суткам опыта было достоверно выше в четвертой группе по сравнению с третьей на 13 % ($P < 0,05$), а к 14-м суткам – на 7,9 % ($P < 0,05$), что составило соответственно $7,02 \pm 0,24 \cdot 10^{12}/л$ и $6,04 \pm 0,26 \cdot 10^{12}/л$. Концентрация гемоглобина к 14-м суткам составляла $138,0 \pm 0,16$ г/л, что вдвое ($P < 0,001$) больше по сравнению с изолированным введением абиктина

Применение ЭББ предотвращало развитие лейкоцитоза. Количество лейкоцитов увеличивалось незначительно – до $16,14 \pm 0,43 \cdot 10^9/л$ к 14-м суткам, что в два раза ниже ($P < 0,05$), чем при введении препарата изолированно, и может свидетельствовать о противовоспалительном эффекте адаптогена. При этом сегментоядерный нейтрофилез был менее выражен, количество лимфоцитов было более приближенно к уровню контроля – $64,0 \pm 0,45\%$ и составляло $58,9 \pm 0,98\%$ ($P < 0,05$), содержание сегментоядерных нейтрофилов составило $31,2 \pm 0,56\%$, что ниже чем при изолированном применении ксенобиотика на $10,4\%$ ($P < 0,05$)

В восстановительный период, показатели периферической крови у крыс, получавших абиктин совместно с ЭББ, возвращались к уровню контроля быстрее, чем у животных, получавших препарат отдельно. И к 28-му дню опыта

количество эритроцитов и гемоглобина было только на 10% ниже контроля, что составило соответственно $8,38 \pm 0,78 \cdot 10^{12}/л$ и $141,6 \pm 1,02 г/л$ ($P < 0,05$)

Установлено, что экстракт бересты березы при введении абиктина предотвращал изменения биохимического состава крови, либо эти изменения были менее выражены, чем при изолированном действии ксенобиотика. При введении абиктина в дозе 1,0 мг/кг к 14-м суткам количество общего белка снижалось по сравнению с контролем на 14,4% ($P < 0,05$), что составило $60,64 \pm 0,27 г/л$, а при поступлении его на фоне применения ЭББ – на 8% ($P < 0,05$), что составило $65,36 \pm 0,38 г/л$ ($P < 0,05$). Динамика изменений уровня белковых фракций сыворотки крови свидетельствует, что ЭББ предотвращает повышение уровня γ -глобулинов при введении ксенобиотика, составив $16,50 \pm 0,45 г/л$ ($P < 0,05$). Защитное действие ЭББ на фоне абиктиновой интоксикации проявлялось снижением уровня и изменением соотношения аминотрансфераз сыворотки крови, таких как АСТ и АЛТ. Достоверное различие между повышением ферментов наблюдалось уже к седьмым суткам. АСТ увеличивалось на 25% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем, АЛТ на 48% ($P < 0,05$), что составляло соответственно $0,40 \pm 0,02$ ммоль/л ч и $0,49 \pm 0,04$ ммоль/л ч, в то время как эти изменения при изолированном действии абиктина были в 2 раза выше (рис. 3, 4)

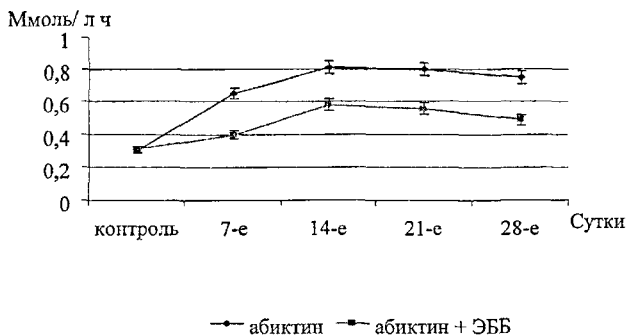


Рис. 3 Влияние экстракта бересты березы на активность АСТ при абиктиновой интоксикации

Экстракт бересты березы на фоне абиктиновой проявлял защитное действие в доза-зависимой манере, снижая количество МДА в клетках костного мозга к 14-м суткам – на 18% ($P < 0,05$) по сравнению с изолированным действием абиктина, составив $0,93 \pm 0,04$ мкмоль/л. Таким образом, экстракт бересты березы понижает показатели ПОЛ при токсическом действии ксенобиотика с проявлением прямой зависимости «доза-эффект» и «время-эффект», что свидетельствует об антиоксидантном действии ЭББ.

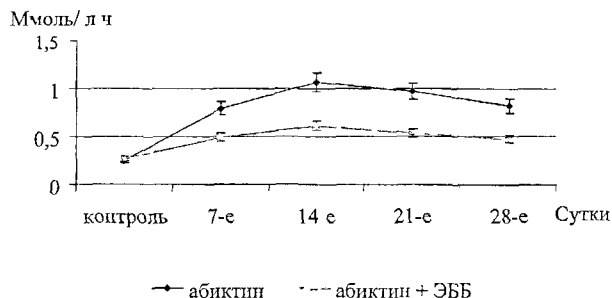


Рис 4 Влияние экстракта бересты березы на активность АЛТ при абиктиновой интоксикации

Микроструктурный анализ печени, почек и 12-перстной кишки крыс, получавших экстракт бересты березы на фоне абиктиновой интоксикации в течение 14-ти дней, подтверждал менее выраженные дистрофические изменения, чем при изолированном введении ксенобиотика

К 14-м суткам опыта в печени крыс, получавших фитоадаптоген на фоне абиктинового воздействия, структура печеночных долек была сохранена, гепатоциты без видимых изменений, однако отмечалось полнокровие центральных отделов долек, умеренно выраженная инфильтрация лимфоцитами по ходу синусоидных капилляров. В некоторых препаратах отмечались неясно выраженные дистрофические изменения гепатоцитов.

В гистологических препаратах почки отмечались единичные некрозы эпителия канальцев, умеренное полнокровие клубочков коркового слоя со скоплением лимфоцитов в мезангии.

В кишке крыс деструктивных изменений не обнаруживалось. Ворсинки и крипты хорошо выражены, количество бокаловидных клеток умеренное.

При исследовании морфометрических показателей отмечалось, что доля двуядерных клеток при совместном введении препарата с экстрактом бересты березы составляла $6,06 \pm 0,94\%$ в печени и $6,98 \pm 0,27\%$ в почках, что на 30% меньше ($P < 0,01$), чем при изолированном действии ксенобиотика, при этом снижалось количество некрозов на 1 см^2 в 2,25 раза ($P < 0,001$) в печени и в 2,35 раза ($P < 0,01$) в почках.

Таким образом, экстракт бересты березы обладает антиоксидантным, антитоксическим, мембраностабилизирующим и противовоспалительным действием, и препятствует развитию деструктивных изменений в органах гомеостатического обеспечения на фоне воздействия ксенобиотика.

ВЫВОДЫ

1 Длительное воздействие абиктина приводит к изменениям морфобиохимического состава периферической крови, что проявляется развитием эритропении, гемоглобинемии, нейтрофильного лейкоцитоза. Выявляемая при этом гипо- и диспротеинемия, обусловлена снижением уровня альбуминов и относительным увеличением γ -глобулиновой фракции белков.

2 Абиктин повышает содержание в сыворотке крови аминотрансфераз (АСТ и АЛТ) – маркеров цитолиза гепатоцитов, что свидетельствует о гепатотоксичности ксенобиотика и согласуется с данными гистологического анализа.

3 Абиктин индуцирует перекисное окисление липидов биомембран в клетках красного костного мозга с проявлением зависимости от дозы и кратности введения препарата.

4 Длительное воздействие абиктина приводит к выраженным дегенеративным, воспалительным и некробиотическим изменениям в органах гомеостатического обеспечения – печени и почках. На ранних сроках наблюдения регистрируются дистрофия гепатоцитов, увеличение доли двуядерных клеток, гемодинамические расстройства в почках и развитие некрозов эпителиоцитов проксимальных отделов нефронов. В более поздние сроки выявляются уницеллюлярные и фокальные некрозы в печени и ярко выраженные изменения в тубулярной части нефронов в виде диффузного колликационного некроза эпителиоцитов канальцев коркового слоя.

5 Применение фитоадаптогена ЭББ (экстракта бересты березы) на фоне воздействия ксенобиотика предотвращает развитие анемии, лейкоцитоза, гипо- и диспротеинемии, снижает уровень аминотрансфераз (АСТ и АЛТ) в сыворотке крови.

6 Экстракт бересты березы предотвращает увеличение уровня малонового диальдегида (конечного продукта перекисного окисления липидов) в клетках красного костного мозга с проявлением прямой зависимости «доза-эффект» и «время-эффект», что свидетельствует об антиоксидантном действии фитоадаптогена.

7 Применение экстракта бересты березы на фоне воздействия ксенобиотика нормализует структуры биологических мембран, восстанавливает синтетическую функцию печени, улучшает гемопоэз и препятствует развитию деструктивных изменений в печени и почках.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1 Учитывать полученные данные при оценке степени вреда, наносимого избыточным применением пестицидов, содержащих авермектины

2 Материалы по применению нового фитоадаптогена (экстракта бересты березы) при коррекции морфофункциональных изменений, вызываемых ксенобиотиком, использовать в учебном процессе по курсам патологической анатомии, гистологии, внутренние незаразные болезни, фармакологии и токсикологии, а также в научно-исследовательской работе на биологических и ветеринарных факультетах и профильных НИИ

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Зайбель, И А Влияние абиктина на некоторые гематологические показатели крови крыс / И А Зайбель // Гомеостаз и экстремальные состояния организма Мат-лы XI Междунар симп – Красноярск, 2003 – С 51

2 Зайбель, И А Морфобиохимические изменения крови крыс при подостром введении абиктина / И А Зайбель // Мат-лы Междунар конф молодых ученых – Улан-Удэ, 2004 – С 23

3 Зайбель, И А Перекисное окисление липидов при подостром введении абиктина / И А Зайбель // Ветеринария – 2004 – № 12 – С 47-48

4 Кузнецова, С А Коррекция цитотоксического действия абиктина препаратом растительного происхождения / С А Кузнецова, И А Зайбель // Вестник КрасГАУ – 2004 – № 6 – С 138-141

5 Зайбель, И А Изменение биохимических показателей крови крыс при коррекции действия абиктина препаратом растительного происхождения / И А Зайбель // Мат-лы Сибирского ветеринарного конгресса – Новосибирск, 2005 – С 321-322

6 Зайбель, И А Влияние фитоадаптогена на изменение ПОЛ при токсическом действии абиктина / И А Зайбель // Аграрная наука на рубеже веков Мат-лы Всерос науч-практ конф / Краснояр гос аграр ун-т – Красноярск, 2005 – С 304-305

7 Кузнецова, С А Изучение состава и антиоксидантных свойств гексанового и этанольного экстрактов бересты / С А Кузнецова, Н М Титова, Г С Калачева, И А Зайбель // Вестник Крас гос ун-та – Красноярск, 2005 – № 2 – С 113-118

8 Кузнецова, С А Профилактика вредного влияния ксенобиотиков этанольным экстрактом бересты / С А Кузнецова, Б Н Кузнецов, И А Зайбель, Н В Донкова // Сложные системы в экстремальных условиях Мат-лы XIII Междунар симп – Красноярск, 2006 – С 31-32

Санитарно-эпидемиологическое заключение №24 49 04 953 П 000381 09 03 от 25 09 2003 г

Подписано в печать 20 04 07 Формат 60×84/16 Бумага тип №1

Офсетная печать Объем 1,0 п л Тираж 100 экз Заказ № 947

Издательство Красноярского государственного аграрного университета

660017, Красноярск, ул. Ленина, 117