

Музалевская Екатерина Николаевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МАСЛА
СЕМЯН АМАРАНТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ОСЛОЖНЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ
ИЗОНИАЗИДОМ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Научный руководитель:

Николаевский Владимир Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Покровский Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится « » _____ 20 года в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « » _____ 201 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В качестве одного из возможных источников биологически активных веществ можно рассматривать широко культивируемые в Центрально-Черноземном регионе растения семейства амарантовых – *Amaranthaceae*. Возобновляемые ресурсы и доступная сырьевая база в сочетании с высокой биологической активностью и низкой токсичностью создает обоснованные предпосылки для проведения исследований по изучению возможности применения масла семян амаранта для коррекции осложнений противотуберкулезной химиотерапии.

Несмотря на то, что реализация Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007-2011 гг.)» позволила снизить заболеваемость и смертность от туберкулеза, в настоящее время эти показатели остаются на высоком уровне (Мохирева Л.В., 2014). Заболеваемость активным туберкулезом за 2014 год составила 54 случая с впервые установленным диагнозом на 100 тысяч человек, смертность – 9,8 умерших на 100 тысяч человек (Щербакова Е.М., 2015).

Одним из основных компонентов в составе комплексного лечения больных туберкулезом является химиотерапия (Мишин В.Ю., 2004). Однако по данным «Аналитического обзора основных статистических показателей по туберкулезу в РФ» (Москва, 2013 г.) она признана эффективной только у 53,5% впервые выявленных больных и у 43,9% – с рецидивом заболевания. Среди причин низких показателей эффективности лечения больных туберкулезом, наряду с лекарственной устойчивостью, следует выделить высокую частоту развития побочных эффектов, ограничивающих проведение полноценной химиотерапии (Мишин В.Ю., 2007; Колпакова Т.А., 2011; Возненко А.А., 2012; Иванова Д.А. и др., 2012). Нежелательные побочные реакции при химиотерапии больных туберкулезом, как правило, имеют системный характер, ухудшают качество жизни и способны привести к инвалидизации (Мишин В.Ю., 2004; Мордык А.В., 2010; Лобзин Ю.В., 2010; Суханов Д.С., 2014). Сведения об их распространенности противоречивы и по данным разных авторов составляют от 13-17% до 62-65% (Мишин В.Ю., 2004; Иванова Д.А. и др., 2012; Mattioni S. et al., 2012).

До настоящего времени одним из основных препаратов остается изониазид, который используется как в качестве монотерапии при проведении первичной и вторичной химиопрофилактики контактных по туберкулезу инфицированных лиц, так и в составе комбинированных схем химиотерапии туберкулеза. Наряду с высокой туберкулостатической активностью изониазид обладает и высокой специфической органотропной токсичностью (Колпакова Т.А., 2002; Мишин В.Ю., 2007).

Для коррекции осложнений химиотерапии в противотуберкулезных учреждениях применяются гепатопротекторные средства растительного происхождения (производные силибинина – Карсил), препараты, содержащие эссенциальные фосфолипиды (Эссенциале Н, Фосфоглив), урсодезоксихолевая кислота (Урсосан), препараты непрямого детоксицирующего действия (Суханов Д.С., 2014). Активно ведется поиск новых средств и альтернативных подходов для коррекции осложнений химиотерапии. Так, например, перспективными метаболическими

средствами коррекции гепатотоксичности, индуцированной противотуберкулезными препаратами, представляются препараты пиридоксин-L-2-пирроидон-5-карбоксилата (Королева М.В., 2015) и таурина (Сабаш Е.В., 2008; Меркулов С.А., 2014; Heidari R. et al., 2013).

Степень научной разработанности проблемы. В семенах амаранта содержится жирное масло, широкий спектр фармакологической активности которого обусловлен содержанием в нём множества различных биологически активных веществ и, прежде всего, фосфолипидов, фитостерина, каротиноидов, токоферолов и сквалена.

Сотрудниками ФГБОУ ВО «ВГУ» разработана оригинальная технология получения масла из семян амаранта методом холодного проходного прессования (Мирошниченко Л.А., 2008), позволяющая сохранить биологически активные вещества в неизменном виде и значительно снизить стоимость производства масла. Унифицированная методика процесса разделения и анализа фосфолипидов (Патент РФ № 2169734), предложенная Сафоновой Е.Ф. с соавт. (2004), впервые позволила установить количественный и качественный состав фосфолипидного комплекса масла семян амаранта, выделив долю эссенциальных фосфолипидов (в среднем 75% от массы фосфолипидного комплекса). Проведено полное фармакогностическое изучение семян амаранта как источника жирного масла и предложен проект фармакопейной статьи предприятия «Амаранта семена» (Коренская И.М., 2012). Под руководством Дзюбы В.Ф. (2007) проведены технологические исследования по разработке состава мази с маслом семян амаранта для лечения ожоговых и раневых поверхностей.

Имеются данные о применении масла семян амаранта в комплексной терапии у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, атеросклеротическими поражениями сосудов нижних конечностей, сахарным диабетом 1 и 2 типа, ишемической болезнью сердца (Офицеров Е.Н., 2007; Волынкина А.П., 2008; Абрагамович О.О., 2009; Заремба Е.Х. и др., 2010; Тутельян В.А. и др., 2011; Martirosyan D.M. et al., 2007). Применение масла семян амаранта для коррекции осложнений химиотерапии в фтизиатрии практически не изучено. Учитывая, что по частоте возникновения и тяжести последствий лечения изониазидом при химиотерапии доминируют полинейропатии, лекарственно-индуцированные поражения печени, побочные реакции со стороны сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта (Фещенко Ю.И. и др., 2008; Иванова Д.А. и др., 2013), патогенетически обоснованным является изучение применения для коррекции осложнений химиотерапии масла семян амаранта, обладающего антиоксидантным, гиполипидемическим, противоязвенным, гастро-, гепато- и кардиопротекторным действием (Близнецова и др., 2006; Петров В.И., Спасов А.А. и др., 2007; Sim S.F. et al., 2014).

Выполнение и защита диссертационной работы входит в перспективный план НИР фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «ВГУ» на 2015-2019 гг. (протокол № 1500-10 от 18.12.2014).

Цель исследования: обоснование возможности применения для профилактики и лечения осложнений, индуцированных изониазидом, прессового масла семян амаранта на основании изучения его фармакологических свойств.

Задачи исследования:

1. Исследовать у пресового масла семян амаранта антитоксические свойства в тесте «гексеналовый сон», гепатопротекторное и мембранопротекторное действие при интоксикации, вызванной тетрахлорметаном.
2. Изучить эффективность применения пресового масла семян амаранта для профилактики и снижения выраженности патогенетических изменений со стороны центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системы при интоксикации изониазидом, в сравнении с эссенциальными фосфолипидами.
3. Оценить состояние микроциркуляторного русла брыжейки крыс, при профилактике и лечении пресовым маслом семян амаранта интоксикации, вызванной изониазидом.
4. Изучить острую токсичность пресового масла семян амаранта.

Научная новизна исследования. Пресовое масло семян амаранта относится к IV классу токсичности.

На модели острого токсического повреждения печени, индуцированного тетрахлорметаном, впервые доказано (Патент РФ № 2526172) наличие гепатопротекторной активности пресового масла семян амаранта. На модели кислотного гемолиза впервые доказана способность пресового масла семян амаранта снижать проницаемость мембран эритроцитов на фоне острого токсического повреждения печени (замедляет скорость кислотного гемолиза более чем на 50%), что свидетельствует о мембранопротекторном действии.

Установлено, что введение пресового масла семян амаранта с профилактической и лечебной целью животным с интоксикацией тетрахлорметаном и изониазидом сопровождается улучшением общего клинического состояния, предупреждает их гибель (в 100% наблюдений), уменьшает выраженность нарушений функциональной активности сердца и процессов пищеварения. Кроме того, при токсическом повреждении печени введение пресового масла семян амаранта уменьшает степень выраженности синдрома цитолиза и холестаза, тормозит процессы липопероксидации, нормализует липидный обмен. Эффективность пресового масла семян амаранта сопоставима с действием эссенциальных фосфолипидов, включенных в стандарт медицинской помощи больным туберкулезом.

На основании полученных результатов впервые предложен способ профилактики и лечения пресовым маслом семян амаранта осложнений, индуцированных изониазидом (Заявка на выдачу патента РФ № 2015134660 «Способ профилактики осложнений, индуцированных изониазидом», Заявка на выдачу патента РФ № 2015134657 «Способ коррекции гепатотоксических реакций, индуцированных изониазидом»).

Предложен способ мониторинга микрососудов в проходящем свете (Патент РФ № 2555136, Патент РФ № 145519, Патент РФ № 152550), который впервые позволил наблюдать динамику изменения состояния микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крыс при интоксикации тетрахлорметаном и изониазидом и экспериментально обосновать возможность коррекции выявлен-

ных нарушений прессовым маслом семян амаранта (Заявка на выдачу патента РФ № 2015134658 «Средство для улучшения микроциркуляторных процессов в организме и способ его использования»).

Научно-практическая значимость. Впервые экспериментально обоснована целесообразность применения прессового масла семян амаранта с целью коррекции осложнений, индуцированных изониазидом. Впервые доказано, что прессовое масло семян амаранта способствует нормализации состояния микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крыс при интоксикации тетрахлорметаном и изониазидом. В определенной степени полученные знания об особенностях изменения состояния микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки подопытных животных в норме и при патологии расширяют представление о патогенезе повреждающего действия тетрахлорметана и изониазида и возможности скрининговых исследований потенциальных гепатопротекторов.

Высокая эффективность прессового масла семян амаранта, связанная с воздействием на основные звенья патогенеза интоксикации изониазидом, позволяет рекомендовать его для проведения дальнейших исследований с целью коррекции осложнений химиотерапии во фтизиатрии.

Научные положения, полученные в результате диссертационного исследования, явились основанием для внесения изменений в информацию, содержащуюся в листке-вкладыше, для расширения показаний к применению масла семян амаранта (акт о внедрении от 14.09.2015), а также внедрены в учебный процесс кафедры управления и экономики фармации и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (акт о внедрении от 01.10.2015); кафедр фармакологии (акты о внедрении от 29.09.2015) и патологической физиологии (акт о внедрении от 25.09.2015) ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Прессовое масло семян амаранта проявляет антитоксические свойства в тесте «гексеналовый сон», при интоксикации тетрахлорметаном оказывает гепатопротекторное и мембранопротекторное действие, не уступая по эффективности препарату эссенциальных фосфолипидов.
2. Введение прессового масла семян амаранта с профилактической и лечебной целью в дозе 600 мг/кг значительно снижает летальность и способствует устранению основных патогенетических изменений при интоксикации изониазидом.
3. При лекарственно-индуцированном поражении печени изониазидом прессовое масло семян амаранта в дозе 600 мг/кг оказывает выраженное гепатопротекторное действие, сопоставимое по эффективности с препаратом эссенциальных фосфолипидов.
4. При интоксикации изониазидом прессовое масло семян амаранта в дозе 600 мг/кг уменьшает выраженность нарушений микроциркуляторных процессов.
5. Прессовое масло семян амаранта относится к малотоксичным соединениям (IV класс токсичности).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен анализ литературных данных по изучаемой проблеме, все экспериментальные исследования вы-

полнены автором лично. Лабораторные, гистологические и гистохимические исследования проведены при непосредственном участии автора. Автором самостоятельно проведена математическая обработка данных, анализ результатов исследования, написание рукописи диссертации и автореферата, совместно с соавторами проведена подготовка всех основных публикаций и заявок на получение патентов Российской Федерации по тематике исследования.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на ежегодных научных сессиях ФГБОУ ВО «ВГУ» (2012-2015 гг.); международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2013; научно-технической конференции молодых ученых и специалистов Воронежской области в сфере промышленности и высоких технологий, Воронеж, 2014; а также представлены на международных, всероссийских и региональных конференциях в Москве, Санкт-Петербурге, Воронеже, Владикавказе, Регенсбурге (Германия). Апробация проведена на межкафедральном заседании фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «ВГУ» (протокол № 1500-01 от 30.06.2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 7 в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций, 3 патента РФ на изобретение.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, одним из основных направлений которой является поиск и разработка новых эффективных лекарственных средств для профилактики и лечения различных заболеваний, включая поиск новых биологически активных фармакологических веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, что полностью соответствует цели и задачам диссертационного исследования, включающего экспериментальное изучение фармакологических свойств прессового масла семян амаранта на экспериментальных моделях токсического повреждения печени тетрахлорметаном и изониазидом. Основными методами являются эксперименты на животных и *in vitro*, что в полной мере соответствует используемым в диссертационном исследовании моделям.

Объем и структура научного исследования. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложений. Диссертация изложена на 212 страницах, иллюстрирована 32 таблицами, 22 рисунками. Библиографический указатель включает 212 источников, в том числе 37 публикаций зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе обобщены данные о проблемах безопасности фармакотерапии туберкулеза, структуре осложнений противотуберкулезной терапии, вызываемых изониазидом, и современных подходах к их коррекции. Представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, обосновывающий перспективность ис-

пользования масла семян амаранта в медицине, в том числе, для коррекции осложнений фармакотерапии туберкулеза.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследований, использовавшихся при выполнении поставленных в диссертации задач.

Исследование выполнено на кафедре фармакологии Воронежского государственного университета при поддержке кафедры клинической фармакологии Воронежского государственного медицинского университета¹ с учетом рекомендаций, изложенных в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012), с соблюдением принципов биоэтики, методических подходов к контролю качества экспериментов и мониторингу здоровья лабораторных животных (Каркищенко Н.Н., 2010). Эксперименты одобрены этическим комитетом по экспертизе биомедицинских исследований в ФГБОУ ВО «ВГУ» (протокол № 42-01 от 23.09.2015).

Выборка животных включала 829 особей, в том числе 789 белых аутбредных крыс самцов и 40 белых аутбредных мышей обоего пола. Животные содержались в пластиковых клетках при естественном световом режиме, питание осуществлялось стандартным, сертифицированным комбикормом в соответствии с действующими нормами при свободном доступе к воде и пище. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». При проведении всех исследований соблюдали принцип парных аналогов в подборе животных по полу, возрасту и массе тела.

Объект исследования – масло из зародышей и оболочек семян амаранта нерафинированное, получаемое промышленным путем (ООО «Русская Олива», Россия, ТУ 9141-005-77872064-2011) методом холодного проходного прессования (далее – прессовое масло семян амаранта). Оценку качества прессового масла семян амаранта, полученного от производителя, проводили на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии² по следующим показателям: определение кислотного числа, йодного числа, числа омыления, перекисного числа, наличия минеральных примесей (Государственная Фармакопея РФ XII издание), определение подлинности и количественного содержания фосфолипидов и α -токоферола (Сафонова Е.Ф., 2004).

Расчет доз прессового масла семян амаранта проводили индивидуально для каждого животного в мг/кг массы тела с учетом удельной плотности масла, равной 0,936 г/см³. Оптимальная терапевтическая доза определена, исходя из литературных данных и результатов скрининговых исследований гепатопротекторной активности.

Согласно методическим рекомендациям по изучению гепатопротективной активности препаратов фосфолипидов (Миронов А.Н., 2012) в качестве препарата сравнения был выбран гепатопротектор, содержащий эссенциальные фосфолипиды соевых бобов, включенные в Стандарт медицинской помощи больным туберкулезом – лекарственный препарат «Эссенциале Н» (Санофи-Авентис С.А., далее –

¹ Выражаем глубокую признательность д.м.н., профессору Чернову Ю.Н. и д.м.н., профессору Батищевой Г.А. за оказанную помощь и всестороннюю поддержку.

² Выражаем глубокую признательность к.х.н., доценту Сафоновой Е.Ф. за помощь в проведении исследований.

ЭФЛ): фармакотерапевтическая группа – гепатопротекторное средство; доказательства эффективности при токсических поражениях печени и стеатозе печени получены на основе рандомизированных контролируемых исследований (уровень доказательности «В», Федеральное руководство по использованию лекарственных средств, 2014 г.).

Используемые реактивы: гексенал (порошок Гексенал, «Рижский ХФЗ», Латвия); тетрахлорметан (далее – ТХМ), ХЧ, (ООО «Компонент-Реактив», Россия); изониазид (субстанция, Alfa Aesar, United Kingdom), альфа-хлоралоза, 97% (Acros Organics, USA); уретан, 97% (Acros Organics, USA).

Методы исследования:

Влияние на функциональную активность сердца изучено по данным электрокардиограммы (ЭКГ). Запись ЭКГ у ненаркотизированных зафиксированных животных проводили при усилении 20 mV и скорости движения ленты 50 мм/сек во втором стандартном отведении на электрокардиографе ЭК1Т-04 АКЦИОН (Россия).

Влияние на эмоционально-поведенческие и двигательные реакции животных оценивали при помощи общепринятого теста «открытое поле» и дополнительной методики – теста «эвристические решения», путем построения эвристической модели поиска животными решения задачи по спасению из эмоционально-физической экстремальной ситуации (Чернов Ю.Н. и др., 1989) в модификации (Патент РФ №2506649).

Влияние на показатели функциональной активности печени проводили по степени нормализации биохимических, гистохимических и патологоморфологических показателей. Забор крови и внутренних органов (печени) для исследования проводили в утренние часы после депривации сразу после декапитации животных под хлороформным наркозом.

Биохимическое исследование сыворотки крови было выполнено на биохимическом анализаторе открытого типа Fujuno 270 и включало определение: активности ферментов печени – аланинаминотрансферазы (АЛАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) кинетическим методом (УФ-тест в соответствии с методом IFCC) с использованием диагностических наборов «Fluitest GPT», Е/л; содержание общего билирубина (мкмоль/л) фотометрическим методом с использованием диагностических наборов «ДиаС»; содержание общего холестерина (ммоль/л) ферментативным колориметрическим методом с использованием диагностического набора «Fluitest CHOL». Определение протромбинового времени (сек.) осуществляли с использованием диагностического набора «Диагем-П». Об активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по количеству вторичных продуктов липопероксидации, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, нмоль/л)³ (Стальная И.Д. и др., 1977).

Гистоморфологическую картину печени изучали при окраске препаратов гематоксилином и эозином⁴, гистохимическую картину – при окраске красителем Oil

³ Выражаем глубокую признательность к.м.н., ст.н.с. НИИ экспериментальной биологии и медицины ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Лобеевой Н.В. за помощь в проведении исследований.

⁴ Выражаем глубокую признательность д.вет.н., заслуженному деятелю науки РФ, профессору Сулейманову С.М. за помощь в проведении исследований.

Red O для выявления липидов. Для полуколичественной оценки содержания липидов использовали пятибалльную шкалу (Миронов А.Н., 2012).

Исследование реакции микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крыс выполнено на наркотизированных внутрибрюшинным введением свежеприготовленного раствора хлоралозы (40 мг/кг) и уретана (6 мг/кг) животных методом биомикроскопии в проходящем свете по методике, предложенной А.М. Чернухом с соавт. (1975) в модификации (Патент РФ № 2555136) на установке (Патент РФ № 152550), смонтированной на основе микроскопа БИОМЕД-1 с использованием предложенного способа мониторинга микрососудов в брюшной полости (Патент РФ № 2506649).

Предварительно определяли наличие кровоизлияний в «окошках» брыжейки и проводили измерения их площади с использованием палеток с масштабной координатной сеткой (Бузлама А.В. и др., 2012). При биомикроскопии регистрировали внутрисосудистые (реологические расстройства) и сосудистые (изменение проницаемости стенок микрососудов, диapedез форменных элементов крови, микрокровоизлияния) нарушения в микрососудах (Чернух А.М. и др., 1975). Для полуколичественной характеристики состояния микроциркуляторного русла проводили оценку кровотока по балльной шкале (Смирнова Е.А., 2004).

С помощью цифровой видеокамеры для микроскопа Levenhuk 8 Mpixels, монтируемой на окуляр и соединенной с персональным компьютером, при увеличении в 40 и 80 раз производилась видеозапись результатов исследований микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки на различных стадиях, а также фотосъемка (при увеличении в 100 и 400 раз) гистологических и гистохимических срезов печени с последующей обработкой полученных данных с использованием компьютерной программы TopView, предназначенной для сохранения, просмотра и обработки видеозаписей. На полученных снимках проводили определение линейных размеров клеток и ядер гепатоцитов (мкм), апоптический индекс (как соотношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу клеток), процент некроза гепатоцитов (как соотношение площади, занимаемой гепатоцитами с признаками некроза к общей исследуемой площади паренхимы печени). Определяли средние значения диаметра (мкм) всех сосудов исследуемого сегмента брыжейки, среднее количество капилляров на площади исследуемого сегмента в 1 мм^2 , средний диаметр и длину капилляров (мкм); рассчитывали площадь поверхности капилляров (мм^2) как поверхность цилиндра с заданным сечением и занимаемую капиллярами площадь на исследуемом сегменте брыжейки в 1 мм^2 (Куприянов В.В. и др., 1975).

Статистическую обработку результатов исследования проводили параметрическими и непараметрическими методами анализа (С. Гланц, 1998) с использованием пакета статистических программ STATISTICA 8.0. Для количественных показателей вычисляли выборочное среднее, стандартное отклонение и ошибку среднего.

В третьей главе приведены результаты собственных исследований, посвященных изучению острой токсичности и специфической активности прессового масла семян амаранта.

В результате исследования пероральной острой токсичности (Миронов А.Н., 2012; ГОСТ 32644-2014) установлено, что однократное введение прессового масла семян амаранта в диапазоне доз 500 мг/кг-10 000 мг/кг мышам обоего пола (40 голов массой 18-22 г) и 30 000 мг/кг крысам самцам (20 голов массой 185,6±6,9 г) не вызывает летального исхода в течение 14 дней наблюдения. При этом не зафиксировано судорог, снижения или повышения двигательной активности, беспокойства, нервно-мышечной возбудимости, изменения реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители. При патологоанатомическом исследовании признаков патологических изменений внутренних органов и достоверных изменений их массы не выявлено. На основании полученных данных максимально переносимой дозой следует считать 30 000 мг/кг массы тела животного, что соответствует объему 32 мл/кг. Таким образом, доказано, что масло семян амаранта является малотоксичным (IV класс токсичности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76).

Исследование антитоксической активности в тесте «гексеналовый сон» (Гацура В.В., 1974; Миронов А.Н., 2012): крысы самцы массой 220,5±5,0 г, 3 группы по 5 голов в каждой – 1 контрольная (здоровые животные, вводили только гексенал) и 2 опытных группы. Препарат сравнения ЭФЛ вводили в дозе 80 мг/кг однократно подкожно за 24 часа до гексенала. Прессовое масло семян амаранта в дозе 600 мг/кг вводили однократно подкожно за 24 часа до гексенала. Гексенал вводили в виде 4,0% водного раствора однократно внутрибрюшинно в дозе 60 мг/кг. Установлено, что подкожное введение прессового масла семян амаранта укорачивает длительность гексеналового сна на 32,0%, что сопоставимо с эффектом ЭФЛ и, вероятно, свидетельствует о наличии антитоксической активности.

Первичная оценка гепатопротекторной активности выполнена на 30 белых аутбредных половозрелых крысах самцах массой 207,6±11,1 г на модели токсического повреждения печени, индуцированного однократным подкожным введением ТХМ в виде 50% масляного раствора после депривации в дозе 4 мл/кг (Миронов А.Н., 2012). Препарат сравнения ЭФЛ вводили однократно в желудок в дозе 80 мг/кг за 1 час до введения ТХМ. Прессовое масло семян амаранта вводили однократно в желудок за 1 час до введения ТХМ в дозах: 300 мг/кг, 600 мг/кг и 1200 мг/кг. Регистрация результатов выполнена через 1 сутки после интоксикации.

Установлено, что введение прессового масла семян амаранта в диапазоне доз 300 мг/кг-1200 мг/кг сопровождалось уменьшением относительно контроля выраженности синдрома цитолиза (уменьшение активности АлАТ на 19-67% при $p < 0,05$; рис. 1), концентрации общих гексоз на 12-25% ($p < 0,01$), нормализацией показателей свободно-радикального окисления (снижение концентрации ТБК-активных продуктов на 40-44% при $p < 0,01$, рис. 2, и нормализация содержания свободных SH-групп). При этом наиболее выраженный эффект, сопоставимый с действием препарата ЭФЛ, оказывало масло семян амаранта в дозах 600 мг/кг и 1200 мг/кг.

В гистоморфологической картине печени в отличие от контрольной группы животных, где наблюдалась потеря балочной структуры печеночных долек, явления кариолизиса, кариопикноза и некробиоза, на фоне применения масла семян амаранта в дозах 300 мг/кг и 600 мг/кг выявлены нормализация структурной организации печени, отсутствие признаков некробиоза и дистрофических изменений.

Индекс апоптоза составил $0,18 \pm 0,03$ и $0,12 \pm 0,01$ соответственно против $0,36 \pm 0,06$ в контроле ($p < 0,05$). Увеличение дозы масла семян амаранта до 1200 мг/кг по сравнению с контролем не сопровождалось улучшением гистоморфологической картины печени.

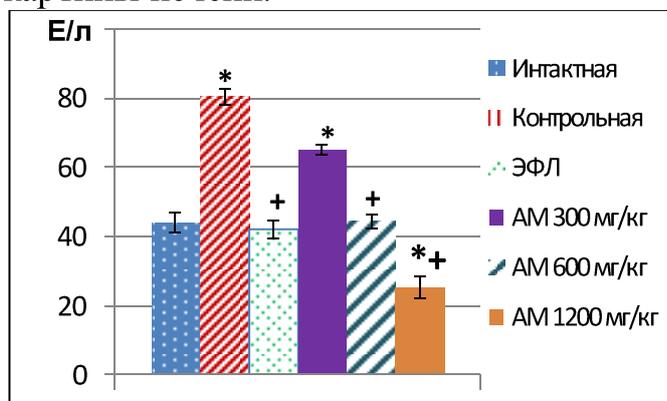


Рис. 1. Активность АлАТ в сыворотке крови, 1 сутки интоксикации тетрахлорметаном.

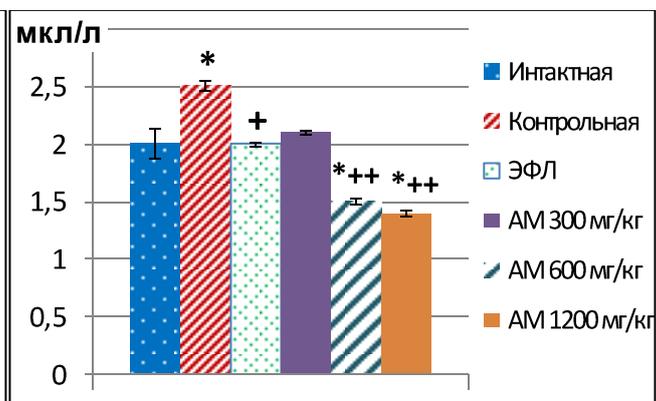


Рис. 2. Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови, 1 сутки интоксикации тетрахлорметаном.

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; критерий Ньюмена-Кейлса: * - $p < 0,05$ – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + - $p < 0,05$; ++ - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с контрольной группой. Вертикальные штрихи соответствуют стандартной ошибке средней величины.

Таким образом, на модели токсического повреждения печени ТХМ доказана гепатопротекторная активность прессового масла семян амаранта, при этом оптимальной следует считать дозу 600 мг/кг.

Изучение влияния прессового масла семян амаранта на проницаемость мембран эритроцитов при токсическом повреждении печени, индуцированном ТХМ (метод регистрации кислотных эритрограмм по Терскову И.А., Гительзону И.И., 1957). Эритроциты получали из крови белых аутбредных крыс самцов (30 голов массой $209,2 \pm 8,4$ г), 6 групп по 5 голов в каждой: контрольная (здоровые животные, вводили только физиологический раствор) и 4 опытные группы. Показатели процесса гемолиза регистрировали непосредственно после добавления гемолизатика (0,1 М раствор соляной кислоты) к эритроцитарной взвеси. ТХМ вводили в виде 50% масляного раствора после депривации однократно внутрибрюшинно в дозе 0,4 мл/кг за 1 час до забора крови. Препарат сравнения ЭФЛ вводили однократно внутрижелудочно в дозе 80 мг/кг за 24 часа до введения ТХМ. Прессовое масло семян амаранта вводили однократно внутрижелудочно за 24 часа до введения ТХМ в дозах 300 мг/кг, 600 мг/кг и 1200 мг/кг.

Установлено, что введение прессового масла семян амаранта предотвращало увеличение скорости гемолиза эритроцитов среднестойкой популяции (табл. 1), о чем свидетельствует уменьшение константы максимальной скорости гемолиза (K_{max}) относительно показателя животных, получавших только ТХМ в дозе 600 мг/кг на 35% ($p < 0,05$), в дозах 300 мг/кг и 1200 мг/кг на 45% ($p < 0,05$) соответственно. Кроме того, K_{max} в дозах 300 мг/кг и 1200 мг/кг ниже K_{max} препарата сравнения на 24% ($p < 0,05$; $p < 0,01$). Период времени от момента добавления в пробу гемолизического агента до начала регистрации фазы собственно гемолиза ($t_{лат}$) достоверно не отличался от кон-

троля, в то время как в пробе животных, получавших только ТХМ, наблюдалось сокращение данного показателя относительно контроля на 60% ($p < 0,05$).

Таблица 1. Влияние прессового масла семян амаранта на показатели кислотного гемолиза при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

Показатели	Контроль (NaCl)	ТХМ	ЭФЛ	АМ		
				300 мг/кг	600 мг/кг	1200 мг/кг
$K_{\text{гем}}, \text{опн ед.}$	$5,78 \pm 0,93$	$8,11 \pm 0,0005^{**}$	$5,89 \pm 0,37^{+}$	$4,45 \pm 0,23^{+\bullet}$	$5,26 \pm 0,97^{+}$	$4,40 \pm 0,71^{+\bullet\bullet}$
$t_{\text{гем}}, \text{сек}$	$125,0 \pm 45,3$	$50,0 \pm 17,3^{*}$	$80,0 \pm 48,2$	$65,0 \pm 31,2$	$105,0 \pm 30,0$	$105,0 \pm 21,2^{+}$

Примечание: ТХМ – тетрахлорметан, ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; t -критерий Стьюдента: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + - $p < 0,05$ – достоверность различий при сравнении с контрольной группой; • - $p < 0,05$; •• - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с препаратом сравнения.

Таким образом, на модели кислотного гемолиза впервые доказано, что введение прессового масла семян амаранта в дозах 300 мг/кг, 600 мг/кг и 1200 мг/кг на фоне токсического повреждения печени, индуцированного ТХМ, сопровождается повышением резистентности мембран эритроцитов к повреждающему действию ТХМ и кислотного гемолизитика.

В четвертой главе приведены результаты углубленного изучения гепатопротекторной активности прессового масла семян амаранта. В течение 14 суток на 335 крысах самцах массой $208,4 \pm 7,84$ г проведено исследование влияния прессового масла семян амаранта, вводимого с профилактической и лечебной целью, на биохимические, гистохимические и гистологические показатели функционального состояния печени при пероральной интоксикации ТХМ.

Для создания модели интоксикации ТХМ вводили в желудок после пищевой депривации однократно в виде 50% масляного раствора в дозе 4 мл/кг (Миронов А.Н., 2012). Масло семян амаранта вводили в желудок с профилактической целью однократно за 1 час до введения ТХМ в дозе 600 мг/кг, а с лечебной – в той же дозе через 24 часа после интоксикации один раз в сутки в течение 3-х суток. ЭФЛ вводили в дозе 80 мг/кг по аналогичным схемам.

Профилактическое и лечебное применение прессового масла семян амаранта предупреждало регистрируемую в контрольной группе животных (в 10% случаев в течение первых 4-х суток после интоксикации) гибель и уменьшало выраженность симптомов интоксикации, о чем свидетельствовала нормализация показателей клинического состояния, начиная с 3-их суток наблюдения, тогда как у выживших животных контрольной группы клиническая картина интоксикации на протяжении 7 суток исследования характеризовалась снижением психомоторной активности (регистрируемой в тесте «эвристические решения») и нарушением процессов пищеварения (вздутие живота и отсутствие дефекаций в течение 3-х суток, снижение потребления корма на 55-80% при $p < 0,01$), на ЭКГ через 24 часа после интоксикации в 50% случаев наблюдалось расщепление комплекса QRS и достоверное ($p < 0,05$) увеличение длительности интервалов QRS и QT.

Введение прессового масла семян амаранта с профилактической целью предотвращало развитие синдрома цитолиза гепатоцитов в первые часы интоксикации (активность АЛАТ и АсАТ ниже контроля соответственно на 27% и 34,2%)

и уменьшало его выраженность через 24 часа после введения ТХМ, о чем свидетельствовало уменьшение активности АлАТ и АсАТ соответственно в 2,3 раза и 1,5 раза ($p < 0,05$) относительно контроля. Полная нормализация активности аминотрансфераз наблюдалась к 10-м суткам исследования (активность АлАТ ниже контроля на 22,9%), тогда как в контрольной группе и группе препарата сравнения возвращение АсАТ к исходной величине не зафиксировано на протяжении 14 суток эксперимента (табл. 2).

Таблица 2. Биохимические показатели крови при профилактическом введении прессового масла семян амаранта при интоксикации тетрахлорметаном

Группа	АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	Билирубин общий, мкмоль/л	Холестерин общий, ммоль/л
Интактная	55,60±7,75	144,91±21,67	2,56±0,80	1,59±0,13
<i>1 час после интоксикации</i>				
Контрольная	84,12±9,01*	254,0±14,82*	3,75±1,44	2,30±0,25*
ЭФЛ	61,21±3,18+	168,37±20,60++	4,87±2,20	1,60±0,15+
АМ	62,98±5,50+	167,21±11,56++	3,18±0,68	1,54±0,30+
<i>24 часа после интоксикации</i>				
Контрольная	383,87±6,41*	341,44±29,47*	22,25±2,27*	1,54±0,38
ЭФЛ	159,80±13,37*+	231,80±18,58*+	22,20±2,46*	2,96±0,08*+
АМ	170,69±8,51*+	223,80±28,89*+	13,01±4,90*++●●	1,92±1,17
<i>10 сутки исследования</i>				
Контрольная	78,95±15,45*	163,58±37,49	5,53±1,16*	2,34±0,52**
ЭФЛ	63,63±6,88	181,16±25,25**	3,58±0,45*++	1,79±0,17
АМ	55,47±7,20+	163,95±37,24	3,43±0,83++	1,67±0,26
<i>14 сутки исследования</i>				
Контрольная	66,24±10,05	244,86±51,39**	3,81±1,19	2,17±0,27
ЭФЛ	55,20±5,72	222,17±31,43*	2,19±0,21	1,98±0,34
АМ	56,29±9,46	147,41±32,64+	2,54±0,55++	1,70±0,24

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; критерий Ньюмена-Кейлса с поправкой Бонферрони: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + - $p < 0,05$; ++ - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с контрольной группой; ●● - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с препаратом сравнения; **жирным шрифтом** выделены показатели, соответствующие параметрам нормы здоровых животных интактной группы.

Содержание в сыворотке крови общего билирубина на протяжении всего периода наблюдения было в 1,6-7,4 раза ($p < 0,05$; $p < 0,01$) ниже контроля (максимально через 72 часа после интоксикации 6,0±1,06 мкмоль/л против 44,35±19,60 мкмоль/л в контроле) и соответствовало показателям нормы на 7-е сутки эксперимента. Уровень общего холестерина в отличие от контроля и препарата сравнения на протяжении всего периода исследования соответствовал показателю интактных животных. Показатель протромбинового времени через 24 часа после интоксикации был ниже контроля и препарата сравнения на 10,2% ($p < 0,05$), а на 7-е сутки – ниже контроля на 39,1% ($p < 0,05$) и сопоставим с показателем в группе ЭФЛ. К 14-м суткам в отличие от контроля, где наблюдалось отсутствие образования фибринового сгустка, протромбиновое время составляло 36,3±0,05 сек. против 19,3±0,15 сек. в интактной группе.

Наряду с нормализацией биохимических показателей прессовое масло семян амаранта обеспечивало восстановление гистоархитектоники печени, уменьшало выраженность лимфомакрофагальной инфильтрации, предотвращало развитие выявленных в гистоморфологической картине печени животных контрольной группы (рис. 3) некротических (относительная зона некроза через 24 часа после интоксикации составила $2,21 \pm 0,44\%$ против $4,69 \pm 1,59\%$ в контроле при $p < 0,05$) и дистрофических нарушений (белковой и жировой дистрофии), в том числе, значительно снижало степень жировой инфильтрации в гистохимической картине печени, о чем свидетельствовали расположенные в отличие от контроля преимущественно на периферии печеночных долек гепатоциты с мелкими жировыми каплями (степень жировой инфильтрации на 14-е сутки наблюдения $0,83 \pm 0,16$ балла против $2,83 \pm 0,40$ балла в контроле).

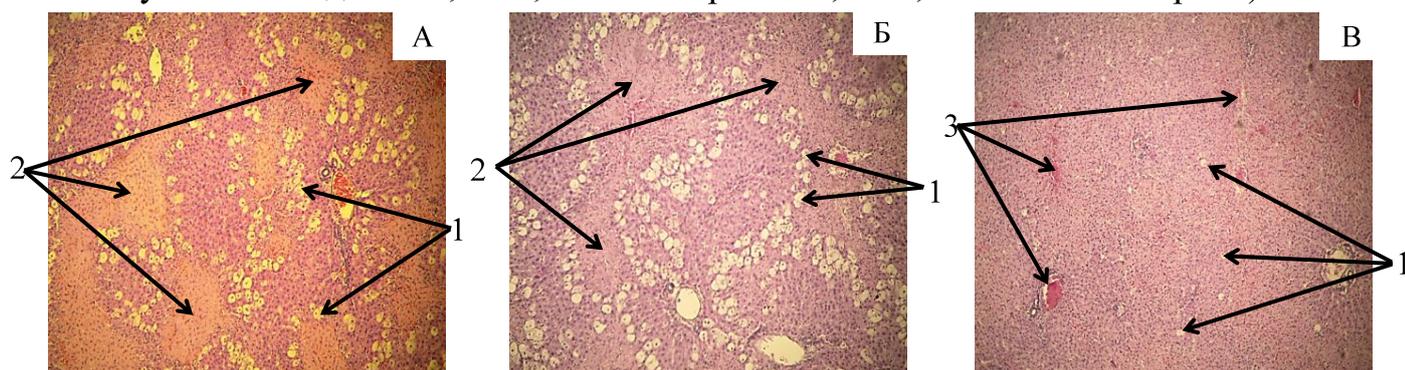


Рис. 3. Гистоморфологическая картина печени крыс при профилактическом введении прессового масла семян амаранта при интоксикации тетрахлорметаном, 1 сутки исследования, окраска – гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$: А – контроль; Б – препарат эссенциальных фосфолипидов: вакуолизированные гепатоциты (1), множественные очаги некроза гепатоцитов (2); В – прессовое масло семян амаранта: следы некротических изменений, единичные периферические гепатоциты вакуолизированы (1), повышение кровенаполнения сосудов (3). Изменения показаны стрелками.

Введение прессового масла семян амаранта с лечебной целью животным с интоксикацией, вызванной ТХМ, на 7-е сутки исследования сопровождалось нормализацией клинического и психоэмоционального состояния, нормализацией активности аминотрансфераз (АлАТ $59,28 \pm 9,27$ Е/л против $55,60 \pm 7,75$ Е/л в интактной группе; АсАТ $147,99 \pm 15,73$ Е/л против $144,91 \pm 21,67$ Е/л в интактной группе) в сыворотке крови, тогда как в контрольной группе возвращение к исходной величине активности АлАТ наблюдалось на 10-е сутки, а активности АсАТ не зафиксировано на протяжении 14 суток эксперимента. Полученные результаты позволяют констатировать сокращение периода восстановления активности маркеров цитолиза в 2 раза по отношению к контролю. По действию на данные показатели эффективность прессового масла семян амаранта была сопоставима с показателями в группе ЭФЛ. Нормализация концентрации общего холестерина ($1,42 \pm 0,12$ ммоль/л против $1,59 \pm 0,13$ ммоль/л в интактной группе) и общего билирубина ($3,39 \pm 0,28$ мкмоль/л против $2,56 \pm 0,80$ мкмоль/л в интактной группе) наблюдалась на 10-е сутки (в группе контроля – на 14 сутки). Протромбиновое время было достоверно ниже контроля на 25,6% ($p < 0,05$) на 7-е сутки и ниже препарата сравнения на 4,8% ($p < 0,01$) на 14-е сутки (при отсутствии образования фибринового сгустка в контроле). При гистоморфологическом исследовании печени, в отличие от контроля, к 14-м суткам наблюдения признаков некроби-

оза и дистрофии выявлено не было, при этом наблюдалось восстановление гистоархитектоники органа. В гистохимической картине печени к 14-м суткам, в отличие от контроля, где сохранялись четко выраженные признаки негенерализованной жировой дистрофии, на фоне введения прессового масла семян амаранта только на периферии дольки в области триады цитоплазма единичных гепатоцитов была заполнена мелкими каплями жира (степень жировой инфильтрации на 14-е сутки наблюдения $0,67 \pm 0,21$ балла против $2,83 \pm 0,40$ балла в контроле).

Кроме того, на данной модели впервые выявлено положительное влияние прессового масла семян амаранта на микроциркуляторные процессы в сосудах брыжейки тонкой кишки крыс. Установлено, что, в отличие от контроля, при применении прессового масла семян амаранта с профилактической целью в брыжейке наблюдалось уменьшение выраженности деструкции магистральных сосудов, о чем свидетельствовало уменьшение в 6 раз регистрируемых в «окошках» брыжейки кровоизлияний. При биомикроскопии, в отличие от контроля и препарата сравнения, на протяжении всего периода наблюдения отмечено отсутствие деструктивных нарушений микрососудов, сопровождающихся диapedезом форменных элементов крови и кровоизлияниями диаметром $(0,4-35,0) \times 10^{-3} \text{ мм}^2$. Начиная с 7-х суток эксперимента при применении масла семян амаранта с профилактической и лечебной целью наблюдалось отсутствие внутрисосудистых расстройств, характеризующихся агрегацией клеток крови, признаками генерализованного сладж-синдрома и стаза. Наряду с этим при введении прессового масла семян амаранта с лечебной целью выявлено увеличение емкости микроциркуляторного русла в 1,3-1,4 раза ($p < 0,01$) за счет увеличения количества капилляров на 1 мм^2 брыжейки (относительно интакта на 15-20% при $p < 0,05$ и контроля на 40-55% при $p < 0,01$) и диаметра венул на 11% ($p < 0,01$).

Таким образом, при интоксикации ТХМ введение прессового масла семян амаранта способствовало нормализации клинического состояния животных, липидного обмена (уменьшало степень выраженности жировой инфильтрации печени в 1,7-4,2 раза, снижало концентрацию общего холестерина в сыворотке крови на 26-33%), уменьшало показатель протромбинового времени на 25-40%, уменьшало выраженность некротических и дистрофических нарушений в ткани печени. При введении с профилактической целью прессовое масло семян амаранта снижало выраженность синдрома цитолиза (снижение активности АЛТ и АсАТ соответственно в 2,3 и 1,5 раза и обеспечивало сокращение по отношению к контролю периода восстановления активности на 28,5%; снижение концентрации общего билирубина в 1,6-7,4 раза и сокращение по отношению к контролю периода нормализации на 50%). При введении с целью лечения прессовое масло семян амаранта способствовало сокращению периода восстановления исследуемых показателей функциональной активности печени в 2 раза по сравнению с контролем.

В пятой главе приведены результаты изучения эффективности прессового масла семян амаранта с целью коррекции осложнений, индуцированных изониазидом.

Для создания модели интоксикации крысам (самцы, 305 особей массой $205,0 \pm 9,2 \text{ г}$) на протяжении 6 суток в утренние часы до основного кормления в желудок вводили изониазид в виде 1% крахмальной слизи в дозе 542 мг/кг (Миронов А.Н., 2012). Масло семян амаранта вводили в дозе 600 мг/кг в желудок на протяже-

нии 6 суток с профилактической целью за 1 час до введения изониазида, а с лечебной – в той же дозе через 24 часа после последнего введения изониазида один раз в сутки в течение 3-х суток. ЭФЛ вводили в дозе 80 мг/кг по аналогичным схемам.

Введение масла семян амаранта с целью профилактики осложнений, индуцированных изониазидом, предупреждало в 100% случаев возникновение регистрируемых в контрольной группе животных судорог (продолжительностью от 40 до 150 минут) и гибель крыс в 33% случаев в течение 3-х часов после однократного введения изониазида. При применении масла семян амаранта на фоне шестикратного введения изониазида регистрируемые показатели клинического состояния животных соответствовали параметрам нормы для взрослых здоровых животных к 7-м суткам наблюдения, тогда как у выживших животных контрольной группы клиническая картина интоксикации на протяжении 10-и суток исследования характеризовалась выраженными нарушениями со стороны центральной и периферической нервной системы, функциональной активности сердца (уменьшение по данным ЭКГ длительности интервала QT, $p < 0,05$), желудочно-кишечного тракта (вздутие живота, снижение потребления корма на 58%-90% при $p < 0,01$) и гепатобилиарной системы, а также микроциркуляторных процессов.

Вместе с тем, введение масла семян амаранта в первые часы интоксикации предотвращало развитие синдрома цитолиза гепатоцитов (табл. 3), о чем свидетельствовало уменьшение по сравнению с контролем и препаратом сравнения активности АлАТ через 1 час после введения изониазида соответственно на 33% и 26% ($p < 0,05$) с последующим возвращением к норме через 24 часа (активность АлАТ и АсАТ в 2 раза выше показателей животных контрольной группы, у которых на протяжении 10-и суток наблюдения зафиксировано резкое снижение активности аминотрансфераз).

Таблица 3. Биохимические показатели крови при введении прессового масла семян амаранта с профилактической целью при интоксикации изониазидом

Группа	АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	Билирубин общий, мкмоль/л	Холестерин общий, ммоль/л
Интактная	55,60±7,75	144,91±21,67	2,56±0,80	1,59±0,13
<i>1 час после интоксикации</i>				
Контрольная	108,57±11,60*	163,46±13,03	2,32±0,28	1,64±0,62
ЭФЛ	98,94±7,44*	174,52±12,80*	2,67±2,36	1,62±0,12
АМ	72,64±2,73*+●	207,98±21,50*+	1,79±0,10+	1,80±0,15
<i>24 часа после интоксикации</i>				
Контрольная	23,49±6,92*	81,92±25,84*	0,98±0,35	3,13±0,80*
ЭФЛ	40,90±4,23*+	161,10±17,60+	2,02±0,23+	1,82±0,36++
АМ	49,91±4,92+	167,24±7,80++	1,27±1,30	2,03±0,24++
<i>14 сутки исследования</i>				
Контрольная	43,04±3,91*	202,36±39,30**	1,82±0,32	1,86±0,26
ЭФЛ	46,51±8,55	127,63±8,58+	2,55±0,10+	1,92±0,35
АМ	53,71±1,58++	147,16±26,50++	2,50±0,35+	1,64±0,15

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; критерий Ньюмена-Кейлса с поправкой Бонферрони: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + - $p < 0,05$; ++ - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с контрольной группой; ● - $p < 0,05$ – достоверность различий при

сравнении с препаратом сравнения; **жирным шрифтом** выделены показатели, соответствующие параметрам нормы здоровых животных интактной группы.

При шестикратном введении изониазида активность АсАТ нормализовалась к 10-м суткам ($147,84 \pm 23,7$ Е/л против $71,68 \pm 28,66$ Е/л в контроле при $p < 0,05$), АлАТ – к 14-м суткам (выше контроля на 25%), тогда как в контрольной группе возвращение данных показателей к исходной величине не зафиксировано на протяжении 14-и суток наблюдения. По действию на данные показатели крови эффективность прессового масла семян амаранта была сопоставима с действием препарата сравнения (табл. 3).

Наряду с этим прессовое масло семян амаранта способствовало нормализации липидного обмена, снижая содержание общего холестерина в сыворотке крови на 22-35% (на 7-е сутки наблюдения $2,12 \pm 0,21$ ммоль/л против $2,72 \pm 0,38$ ммоль/л в контроле при $p < 0,05$), уменьшало на протяжении всего периода наблюдения протромбиновое время (максимально на 7-е сутки – на 34,2% при $p < 0,05$ и составило $26,4 \pm 0,50$ сек. против $40,1 \pm 0,91$ сек. в контроле), предотвращало усиление процессов липопероксидации, о чем свидетельствовало снижение в сыворотке крови концентрации ТБК-активных продуктов в первые сутки интоксикации на 15-19% ($p < 0,05$) относительно контроля с последующей нормализацией к 3-м суткам исследования (рис. 4, 5).

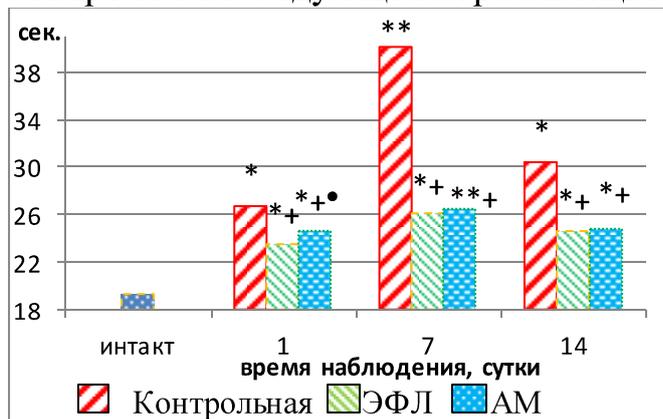


Рис. 4. Динамика протромбинового времени при интоксикации изониазидом.

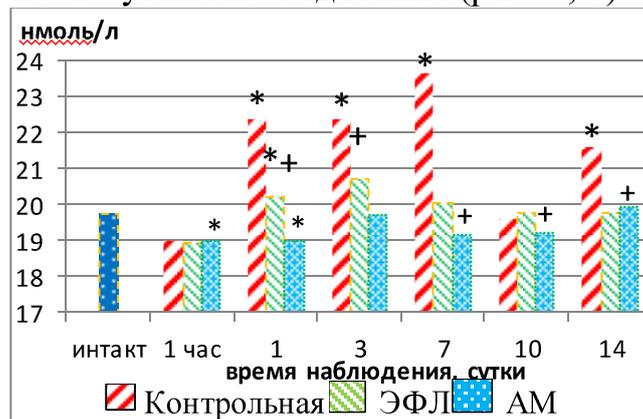


Рис. 5. Динамика изменения концентрации ТБК-активных продуктов в сыворотке крови при интоксикации изониазидом.

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; критерий Ньюмена-Кейлса: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + - $p < 0,05$ – достоверность различий при сравнении с контрольной группой; • - $p < 0,05$ – достоверность различий при сравнении с препаратом сравнения.

При проведении патологоанатомических исследований в отличие от контроля, где, начиная с 3-х суток эксперимента, выявлено значительное увеличение размера желудка, связанное с его переполнением непереваженными пищевыми массами, размер желудка и степень заполнения соответствовали физиологической норме, что, вероятно, обусловлено прокинетическим действием, характерным для растительных масел. Кровоизлияния, регистрируемые в «окошках» брыжейки животных контрольной группы (в том числе, погибших в первые часы после интоксикации), отсутствовали. Массовый коэффициент печени на 7-е сутки интоксикации был меньше показателя контрольной группы на 18% ($p < 0,01$) и соответствовал показателю интактных животных к 10-м суткам наблюдения.

При биомикроскопии сосудов брыжейки тонкой кишки в проходящем свете в отличие от контроля, где на протяжении всего периода наблюдения при естественном заполнении микрососудов кровью и сохранении сосудистого тонуса отмечено изменение диаметра микрососудов, внутрисосудистые расстройства, сопровождающиеся агрегацией клеток крови, признаками генерализованного сладж-синдрома и стаза, а так же нарушения на уровне сосудистой стенки, морфологическим проявлением которых являлись диапедез форменных элементов крови и кровоизлияния диаметром $(1,9-9,9) \times 10^{-3} \text{ мм}^2$, на фоне применения масла семян амаранта с профилактической целью кровоизлияния и диапедез форменных элементов не обнаружены (рис. 6).

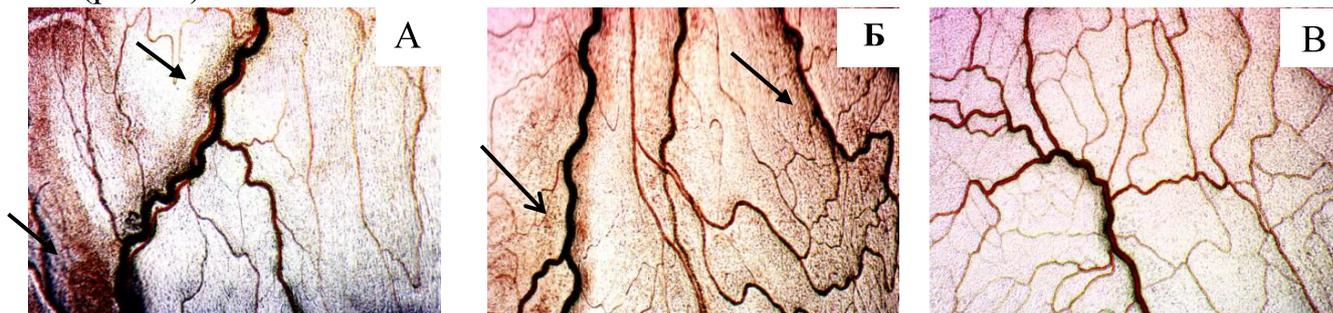


Рис. 6. Микроциркуляторное русло брыжейки тонкой кишки крыс при профилактическом введении прессового масла семян амаранта при интоксикации изониазидом, 7 сутки исследования. Биомикроскопия, ув. $\times 40$: А – контроль, Б – препарат эссенциальных фосфолипидов, В – прессовое масло семян амаранта. Стрелками показан выход форменных элементов крови за пределы сосудистой стенки.

Введение масла семян амаранта способствовало восстановлению кровотока, при этом оценка изменения его интенсивности в микрососудах брыжейки по балльной шкале на 7-е сутки наблюдения составляла $20,0 \pm 0,0$ баллов, что соответствовало показателям животных интактной группы, против $17,0 \pm 1,25$ баллов в контроле.

Морфометрия выявила увеличение диаметра венул на 13-19% ($p < 0,05$) относительно интакта, а также диаметра капилляров (максимально на 10-е сутки относительно интакта и контроля соответственно на 29,5% при $p < 0,01$ и 35,3% при $p < 0,05$). При этом среднее количество капилляров на 1 мм^2 площади брыжейки было выше контроля в 2,4 раза ($p < 0,01$), а площадь, занимаемая капиллярами, превышала показатель интакта в 1,45 раза при $p < 0,01$ (табл. 4).

При гистоморфологическом исследовании установлено, что параллельно с улучшением биохимических показателей и микроциркуляторных процессов масло семян амаранта обеспечивало восстановление гистоархитектоники печени, предотвращало развитие дистрофических и некробиотических процессов при однократном введении изониазида и выражено уменьшало их степень при шестикратном введении (индекс апоптоза на 14-е сутки исследования $0,22 \pm 0,11$ против $0,41 \pm 0,62$ в контроле). Признаков нарушения микроциркуляторных процессов (повышение сосудистой проницаемости, расслоение стенок кровеносных сосудов, расширение междольковых вен), наблюдаемых в контроле, не зафиксировано. В гистохимической картине печени в отличие от контроля, где регистрировали диффузную жировую дистрофию, гепатоциты с жировыми каплями были расположены преимущественно на периферии печеночных балок.

Таблица 4. Изменение количества и площади, занимаемой капиллярами при введении прессового масла семян амаранта при интоксикации изониазидом

Группа	Период наблюдения				
	1 час	24 часа	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Количество капилляров на 1 мм ² , шт.					
Интактная	80,0±11,2				
Контрольная	62,5±14,4	125,0±20,1**	43,7±23,9**	35,0±13,69**	62,5±13,6
ЭФЛ	75,0±17,7	72,5±15,0++	50,0±17,7	60,0±13,7	65,0±13,7
АМ	85,0±22,4	74,0±13,4++	80,0±12,5	83,3±12,9++	106,2±12,5**++●●
Площадь, занимаемая капиллярами на исследуемом сегменте в 1 мм ² , мм ²					
Интактная	0,36±0,08				
Контрольная	0,28±0,07	0,61±0,12**	0,23±0,01**	0,21±0,04**	0,26±0,08
ЭФЛ	0,37±0,14	0,30±0,09++	0,26±0,12	0,27±0,10	0,30±0,11
АМ	0,36±0,03	0,37±0,08++	0,41±0,15	0,53±0,16**+●●	0,54±0,025**+●●

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; *t*-критерий Стьюдента: ** - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с интактной группой; + - $p < 0,05$; ++ - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с контрольной группой; ●● - $p < 0,01$ – достоверность различий при сравнении с препаратом сравнения.

Применение масла семян амаранта с лечебной целью у животных с тяжелой интоксикацией, индуцированной изониазидом, к 10-м суткам наблюдения сопровождалось нормализацией клинического и психоэмоционального состояния, нормализацией активности АЛАТ (47,17±8,29 Е/л против 55,60±7,75 Е/л в интактной группе и 25,17±4,74 Е/л в группе препарата сравнения), АсАТ (152,74±24,25 Е/л против 144,91±21,67 Е/л в интактной группе) и концентрации общего билирубина (2,50±1,25 мкмоль/л против 2,56±0,80 мкмоль/л в интактной группе и 7,49±1,57 мкмоль/л в группе препарата сравнения) в сыворотке крови, тогда как в контрольной группе возвращение к исходной величине данных показателей не зафиксировано на протяжении 14-и суток эксперимента (табл. 3). При этом массовый коэффициент печени был ниже контроля на 16,7% ($p < 0,01$) и соответствовал показателю интактных животных, что согласуется с результатами гистохимических исследований и, вероятно, обусловлено уменьшением степени выраженности жировой дистрофии печени. Кроме того, введение прессового масла семян амаранта сопровождалось снижением концентрации общего холестерина ниже показателя интактной группы на 14,7% (1,33±0,14 ммоль/л против 1,51±0,13 ммоль/л при $p < 0,01$).

На 14-е сутки исследования показатель протромбинового времени был ниже контроля на 12,8% при $p < 0,05$ (26,5±0,24 сек. против 30,4±0,64 сек. в контроле). Выявлено снижение концентрации ТБК-активных продуктов на 16,1% ($p < 0,05$), что свидетельствовало о снижении процессов ПОЛ.

В брыжейке тонкой кишки применение прессового масла семян амаранта с лечебной целью в отличие от контроля предотвращало развитие деструктивных нарушений магистральных и микрососудов, способствовало восстановлению кровотока. Начиная с 10-х суток эксперимента, морфометрия выявила увеличение относительно интакта и контроля диаметра венул соответственно на 16,0% и 12,8% ($p < 0,05$). На 14-е сутки диаметр капилляров превышал показатели интактной и контрольной групп соответственно на 35,2% ($p < 0,01$) и 54,8% ($p < 0,01$), а венул соответственно на

12,7% и 10,2% ($p < 0,05$). Вазодилатация сопровождалась заполнением резервных капилляров (количество капилляров на 1 мм^2 превышало показатели интактной и контрольной групп соответственно на 32,7% и 69,9% при $p < 0,05$) и увеличением занимаемой ими площади в 1,3 раза ($p < 0,01$). В целом выявленные изменения свидетельствуют об увеличении емкости кровеносного русла и, следовательно, улучшении процессов оксигенации на фоне влияния масла семян амаранта.

Вместе с тем, наряду с нормализацией биохимических и микроциркуляторных процессов, к 10-м суткам наблюдения масло семян амаранта обеспечивало восстановление гистоархитектоники печени и уменьшало выраженность некробиотических процессов, индекс апоптоза на 14-е сутки исследования составил $0,24 \pm 0,07$ против $0,41 \pm 0,62$ в контроле (рис. 7). В гистохимической картине печени в отличие от контроля, где регистрировали диффузную жировую дистрофию, на фоне введения масла семян амаранта наблюдались остаточные явления жировой инфильтрации (степень жировой инфильтрации на 10-е сутки наблюдения $0,70 \pm 0,20$ балла против $4,33 \pm 0,21$ балла в контроле).

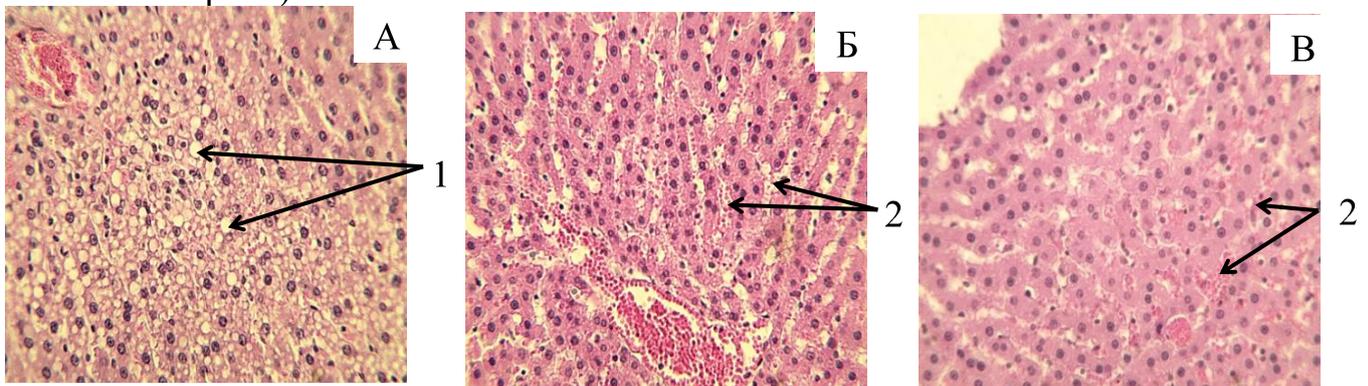


Рис. 7. Гистоморфологическая картина печени крыс при введении прессового масла семян амаранта с лечебной целью животным с интоксикацией изониазидом, 10 сутки, окраска – гематоксилин-эозин, ув. $\times 400$: А – контроль: мелкокапельная жировая дистрофия (1); Б – препарат эссенциальных фосфолипидов; В – прессовое масло семян амаранта: повышение кровенаполнения сосудов (2).

В шестой главе приведен анализ данных, критическая оценка и сравнение полученных результатов, с известными данными уже опубликованных работ по сходной тематике. При этом отмечается, что полученные результаты не противоречат известным научным данным. В результате проведенных исследований доказано гепатопротекторное действие прессового масла семян амаранта, сопоставимое по выраженности с эффективностью препарата эссенциальных фосфолипидов, выявлены мембранопротекторные, антиоксидантные и ангиопротекторные свойства, что позволило впервые предложить использование масла семян амаранта для коррекции лекарственно-индуцированных поражений печени, снижения выраженности нейровегетативных, метаболических и микроциркуляторных нарушений при химиотерапии изониазидом.

ВЫВОДЫ

1. Прессовое масло семян амаранта при введении в дозе 600 мг/кг укорачивает длительность гексеналового сна; обладает гепатопротекторным действием (уменьшает выраженность цитолиза в 1,8 раза) и проявляет мембранопротекторную ак-

тивность (замедляет развитие кислотного гемолиза в 1,5 раза) при интоксикации тетрахлорметаном.

2. Введение прессового масла семян амаранта в дозе 600 мг/кг с профилактической и лечебной целью при интоксикации изониазидом (в дозе 542 мг/кг в течение 6 суток) предупреждает возникновение судорог, нарушения функциональной активности сердца и гибель животных, значительно уменьшает выраженность патологических изменений со стороны центральной и периферической нервной системы, способствует нормализации функции пищеварения и клинического состояния животных на 7 сутки при введении с профилактической целью и на 10 сутки – при введении с лечебной целью.

3. При лекарственно-индуцированном поражении печени, вызываемом изониазидом, прессовое масло семян амаранта в дозе 600 мг/кг снижает степень выраженности синдрома цитолиза (активность АлАТ через 1 час после введения изониазида ниже контроля на 33%), способствуя полной нормализации активности аминотрансфераз на 14 сутки (активность АсАТ ниже контроля на 27%), обеспечивает уменьшение выраженности некробиотических процессов и восстановление гистоархитектоники печени, тормозит процессы липопероксидации (снижает концентрацию ТБК-активных продуктов на 15-19%), нормализует липидный обмен (снижает содержание общего холестерина на 22-35%), и по эффективности сопоставимо с действием препарата эссенциальных фосфолипидов.

4. Введение прессового масла семян амаранта в дозе 600 мг/кг предотвращает развитие в брыжейке крыс деструктивных нарушений стенок магистральных и микрососудов, выражено уменьшает образование в микрососудах агрегатов клеток крови и локальных зон стаза на 7 сутки течения интоксикации изониазидом при введении с профилактической целью и на 10 сутки – при введении с лечебной целью, вызывает заполнение резервных капилляров и достоверное увеличение занимаемой ими площади в 1,3-1,5 раза.

5. Доказано, что прессовое масло семян амаранта относится к малотоксичным соединениям (IV класс токсичности).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Обоснована возможность использования масла семян амаранта, полученного холодным прессованием зародышей и оболочек семян амаранта, для профилактики и коррекции лекарственно-индуцированных поражений печени, снижения выраженности нейровегетативных, метаболических и микроциркуляторных нарушений при химиотерапии изониазидом, расчетная суточная доза для человека – 600 мг.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ РАБОТ

1. Музалевская Е.Н. Первичная оценка антитоксической и гепатопротекторной активности масла семян амаранта хвостатого / Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский // Проблемы разработки новых лекарственных средств: первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых, 3-5 июня 2013 г.: сборник научных трудов. – Москва: ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН, 2013. – С. 74.

2. Гепатиты в клинической практике и их фармакологическая коррекция / **Е.Н. Музалевская**, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов, Г.А. Батищева, А.В. Бузлама // **Системный анализ и управление в биомедицинских системах**. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 537-547.
3. Лекарственно-индуцированные поражения печени и вопросы их фармакологической коррекции / М.Н. Сомова, **Е.Н. Музалевская**, В.А. Николаевский, А.В. Бузлама, Г.А. Батищева, Ю.Н. Чернов // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2013. – Т. 76, № 9. – С. 38-43.
4. **Музалевская Е.Н.** Исследование влияния масла семян амаранта на функционирование микроциркуляторного русла брыжейки крыс / Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, Л.А. Мирошниченко // **Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы Пятой международной научно-практической конференции, 14-15 ноября 2013 г.: сборник научных трудов**. – Санкт-Петербург: Издат-во Политехн. ун-та, 2013. – С. 67-68.
5. Hepatotropic, antioxidant and antitoxic action of amaranth oil / V.A. Nikolaevsky, D.M. Martirosyan, **E.N. Muzalevskaya**, L.A. Miroshnichenko, V.I. Zoloedov // **Functional Foods in Health and Disease**. – 2014. – Vol. 4, № 5. – P. 159-171.
6. **Музалевская Е.Н.** Исследование влияния амарантового масла на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов при экспериментальной патологии печени / Е.Н. Музалевская, Д.Б. Холодов, В.А. Николаевский // **Человек и лекарство: XXI Российский национальный конгресс, 7-11 апреля 2014 г.: сборник научных трудов**. – Москва, 2014. – С. 296.
7. **Музалевская Е.Н.** Разработка субстанции получения лекарственного средства для профилактики и лечения токсических (лекарственных) поражений печени / Е.Н. Музалевская // **Инновационные разработки молодых ученых Воронежской области на службу региона: научно-техническая конференция молодых ученых и специалистов Воронежской области в сфере промышленности и высоких технологий, 16-17 апреля 2014 г.: сборник научных трудов**. – Воронеж: Воронежский ЦНТИ – филиал ФГБУ «РЭА» Минэнерго РФ, 2014. – С. 75-76.
8. Evaluation of amaranth oil for the antitoxic, antioxidant, and hepatotropic (hepatoprotective) properties / D.M. Martirosyan, V.A. Nikolaevsky, **E.N. Muzalevskaya**, L.A. Miroshnichenko, V.I. Zoloedov // **Mental, Neurological and other Chronic Disorders: Biomarkers, Bioactive Compounds, and Functional Foods : 15th International Conference of FFC: third International Symposium of ASFFBC, Regensburg, 10-11 May 2014**. – Regensburg, 2014. – P. 255-256.
9. **Патент РФ № 2506649**, МПК G09B 23/28. Способ выявления психотропной активности лекарственных и нелекарственных веществ / Ю.Н. Чернов, А.В. Бузлама, Г.А. Батищева, М.В. Васин, В.А. Николаевский, А.И. Сливкин, **Е.Н. Музалевская**; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «ВГУ»: заявл. 28.08.2012; опубл. 10.02.2014 // Бюл. – № 4.
10. **Патент РФ на полезную модель № 145519**, МПК А61В 1/06. Световод для биомикроскопии / В.А. Николаевский, **Е.Н. Музалевская**, В.А. Музалевская; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «ВГУ»; заявл. 23.04.2014; опубл. 20.09.2014 // Бюл. – № 26.
11. **Патент РФ на изобретение № 2526172**, МПК А61К 36/21, А61К 31/355. Лечебное средство профилактики и лечения хронических заболеваний печени / В.А. Николаев-

ский, В.И. Золоедов, Н.В. Лобеева, Л.А. Мирошниченко, **Е.Н. Музалевская**; заявитель и патентообладатель ООО «Русская Олива»: заявл. 10.02.2012; опубл. 20.08.2014 // Бюл. – № 23.

12. **Патент РФ на полезную модель № 152550**, МПК А61В 1/06. Установка для биомикроскопии в проходящем свете / В.А. Николаевский, **Е.Н. Музалевская**, Ю.Н. Чернов, А.В. Бузлама, В.А. Музалевская; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «ВГУ»: заявл. 23.04.2014; опубл. 10.06.2015 // Бюл. – № 16.

13. Сквален: Физиологические и фармакологические свойства / **Е.Н. Музалевская**, Л.А. Мирошниченко, В.А. Николаевский, И.Б. Ушаков, Ю.Н. Чернов, В.В. Алабовский, Г.А. Батищева, А.В. Бузлама // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2015. – Т. 78, № 6. – С. 30-36.

14. **Патент РФ на изобретение № 2555136**, МПК А61В 1/06. Способ мониторингования микрососудов брыжейки у лабораторных животных с помощью биомикроскопии / **Е.Н. Музалевская**, В.А. Николаевский, А.В. Бузлама, В.А. Музалевская; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «ВГУ»; заявл. 23.04.2014; опубл. 10.07.2015 // Бюл. – № 19.

15. Экспериментальная модель эвристических решений для выявления психотропной активности лекарственных веществ / А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, **Е.Н. Музалевская**, В.А. Николаевский, Г.А. Батищева // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2015. – Т. 78 Приложение. Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам: материалы 6-й международной конференции, 9-13 ноября 2015 г. – Москва, 2015. – С 13-14.

16. **Музалевская Е.Н.** Коррекция нарушений микроциркуляторных процессов в брыжейке тонкой кишки крыс при интоксикации изониазидом / Е.Н. Музалевская // **Трансляционная медицина**. – 2015. – № 2 Приложение. От трансляционных исследований – к инновациям в медицине: юбилейная научная сессия, посвященная 35-летию ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 28-30 октября 2015 г. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 78-79.

17. Параметры нарушений региональной микроциркуляции в патогенезе интоксикации изониазидом и их коррекция маслом семян амаранта / **Е.Н. Музалевская**, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов, С.М. Сулейманов // **Системный анализ и управление в биомедицинских системах**. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 416-421.

18. **Музалевская Е.Н.** Эффективность профилактического применения масла семян амаранта при осложнениях, вызванных изониазидом / Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов // **Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация**. – 2015. – № 4. – С. 130-135.

19. **Музалевская Е.Н.** Способ оценки нарушений микроциркуляторного русла брыжейки крыс, вызываемых изониазидом / Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов // **Биомедицина**. – 2015. – № 4. – С. 51-60.

20. **Музалевская Е.Н.** Особенности реакции микроциркуляторного русла брыжейки на интоксикацию изониазидом / Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2015. – Т. 78. – № 12. – С. 34-35.