

Романова Ольга Леонидовна

**ОСОБЕННОСТИ И МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЁГКИХ ПРИ
ОТРАВЛЕНИИ БАКЛОФЕНОМ И ЕГО КОМБИНАЦИЕЙ С ЭТАНОЛОМ**

3.3.3. Патологическая физиология

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время в структуре насильственной смертности как в Российской Федерации, так и во всем мире по-прежнему преобладают несчастные случаи, механическая асфиксия, интоксикации химическими соединениями, а также механические травмы. Последствия ненадлежащего приёма лекарственных веществ остаются одной из ведущих причин гибели лиц трудоспособного возраста. При этом, по данным Бюро судебно-медицинской экспертизы г. Москвы, по числу отравлений лекарственные средства занимают третье место после спиртосодержащей продукции и угарного газа. В 2023 году интоксикации лекарственными веществами в структуре всех отравлений составили 13,4% случаев. В некоторых субъектах РФ они находятся на первом месте. Например, в ХМАО в структуре острых отравлений за 1 квартал 2024 года первое место занимают медикаменты (35,8%), второе – алкоголь и его суррогаты – (29,4%), третье – другие неуточненные вещества – (12,2%) [официальный сайт ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в ХМАО-Югре» – <https://fbu3hmao.ru/>].

Около 5-7% всех лекарственных отравлений связано с ненадлежащим применением атипичного миорелаксанта баклофена – селективного агониста ГАМКб-рецепторов. Особенно часто такие интоксикации встречаются среди лиц молодого возраста [Charifou Y. et al., 2016; Franchitto N. et al., 2018; Reynolds K. et al., 2019; Slavova S. et al., 2018]. В 2020 году токсикологическими центрами США было зафиксировано около пяти тысяч случаев передозировки баклофеном, из которых четыре эпизода закончились смертью [Dease N.M., 2023].

В РФ в результате отравления баклофеном (как при его изолированном введении, так и в сочетании с этиловым спиртом) в 2023 году пострадало около 2000 человек, из которых 16 погибли. Непосредственной причиной смерти в этих случаях чаще всего является угнетение центров дыхания и кровообращения, а также остановка дыхания вследствие чрезмерного расслабления дыхательной мускулатуры. Однако известны случаи гибели через значительный промежуток времени после отравления препаратом вследствие метаболических нарушений и структурных повреждений головного мозга, сердца, лёгких [Тагиров А.А. и др., 2014]

Баклофен, являясь миорелаксантом центрального действия, представляет собой производное гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) – селективный агонист ГАМКб-рецепторов [Hleihil M. et al., 2021]. В клинической практике данный препарат нашёл широкое применение. Спектр показаний к назначению баклофена охватывает разнообразные неврологические расстройства [Turner M.S. et al., 2003; Harned M.E. et al., 2011], характеризующиеся увеличением мышечного тонуса. Доказана эффективность баклофена при лечении рассеянного склероза и различных видов патологии спинного мозга, в том числе опухолей, заболеваний, связанных с дисфункцией двигательных мотонейронов, травматических повреждений и воспалительных процессов [Hon A.J. et al., 2020; Biering-Soerensen B. et al., 2022; de Sousa N. et al., 2023; de Sousa N. et al., 2022; De Tanti A. et al., 2017; Masrour M. et al., 2024; Mathur S.N. et al., 2014; Rekand T. et al., 2011; Takagi Y. et al., 2021].

Кроме того, баклофен показал свою высокую эффективность при лечении

цереброваскулярных нарушений, менингита (в комплексной терапии) и черепно-мозговых травм [Park J.Y. et al., 2023; Sun Y. et al., 2022], а также у пациентов с детским церебральным параличом [Dykstra D. et al., 2016; Imerci A. et al., 2019; Leary S. et al., 2006; Reilly M. et al., 2020; Navarrete-Opazo A.A. et al., 2016]. В ряде работ рассматривалась возможность применения баклофена при алкогольной зависимости, однако, авторы сделали вывод о необходимости дальнейшего изучения данного вопроса [Cooney G. et al., 2019; Dixit D. et al., 2016; Léger M. et al., 2017; Logge W.B. et al., 2020; Minozzi S. et al., 2018; Müller C.A. et al., 2015; Paille F. et al., 2021; Pelz P. et al., 2023; Rigal L. et al., 2015; Rolland B. et al., 2016].

Терапевтическое применение баклофена сопровождается значительным риском возникновения нежелательных побочных реакций [Borowski A. et al., 2010; Karapetiantz P. et al., 2019; Braillon A. et al., 2017], затрагивающих в той или иной степени все системы организма. Со стороны сердечно-сосудистой системы отмечаются гипотензия и тахикардия, со стороны дыхательной системы – диспноэ и тахипноэ [Trippenbach T. et al., 1996; Mohon R.T. et al., 2021]. Особую клиническую значимость имеют кардиореспираторные нарушения [Baclofen Monograph for Professionals; American Society of Health-System Pharmacists, 2024].

Интоксикация баклофеном при превышении рекомендованных дозировок характеризуется развитием тревожных расстройств [Wolf M. et al., 2017], нарушением аккомодационного рефлекса, исчезновением корнеального рефлекса и судорожным синдромом. Диспепсические явления включают в себя гиперсаливацию, тошноту; отмечается повышение активности лактатдегидрогеназы, аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы [Машковский М.Д., 2025].

При отравлении баклофеном широкий спектр нарушений наблюдается со стороны центральной нервной системы. Он включает в себя головные боли, патологическую утомляемость, появление галлюцинаций [Ricoix O. et al., 2019; Sanders B.J. et al., 2021], снижение порога судорожной готовности [Triplett J.D. et al., 2019], кататонии [Nahar A. et al., 2017]. В особо тяжёлых случаях возможно развитие коматозного состояния [Weißhaar G.F. et al., 2012; Farhat S. et al., 2020], энцефалопатии с летальным исходом [Chartier M. et al., 2018].

Баклофен известен своим воздействием на различные типы рецепторов, включая дофаминовые, что объясняет его выраженные психотропные свойства [Kent C.N., 2020]. Препарат нередко используется в немедицинских целях, преимущественно среди молодёжи [Тагиров А.А. и др., 2014; Kapil V. et al., 2014; Pelerin J.M. et al., 2023]. В литературе описаны случаи одновременного употребления до 10-12 таблеток баклофена вместе со слабоалкогольными напитками [Agabio R. et al., 2013; Franchitto N. et al., 2018; Vourc'h M. et al., 2016; Vourc'h, M. et al., 2019].

Токсикокинетические исследования позволяют определить концентрации баклофена в различных биологических средах и установить корреляцию между уровнем препарата и выраженностью клинических симптомов интоксикации [Moffat A.C. et al., 2011; Thill C. et al., 2015].

Специфического антидота при отравлении баклофеном не существует. Меры помощи при таких интоксикациях включают в себя симптоматическую терапию и

поддержание функций сердечно-сосудистой и дыхательной систем, включая ИВЛ [de Witte L.D. et al., 2016; Wolf M.E. et al., 2017]. Некоторое время назад появились данные о положительных результатах применения гемодиализа для ускоренного выведения баклофена у пациентов с почечной недостаточностью [Bowman A. et al., 2019]. Детальное исследование изменений в организме под влиянием баклофена имеет важное значение как для совершенствования тактики лечения пострадавших, так и для точного установления причин смерти при летальных исходах [Levine B. et al., 2018]. Глубокое понимание механизмов патогенеза поражения внутренних органов, обусловленных воздействием токсической дозы препарата, необходимо для разработки современных методов диагностики и терапии [Moffat A.C. et al., 2011].

Основными органами-мишенями при отравлении баклофеном являются головной мозг, сердце и лёгкие. Имеются работы, посвящённые гистологическим изменениям в мозге, миокарде при введении баклофена [Issa S.Y. et al., 2018; Асанов А.Р. et al., 2020]. При этом процессы, происходящие в лёгких, на сегодняшний день остаются наименее изученными [Heetla H.W. et al., 2016].

Известно, что патоморфологические и функциональные изменения дыхательной системы могут сохраняться в течение длительного времени после отравления баклофеном как при изолированном его введении, так и в комплексе с этиловым спиртом [Issa S.Y. et al., 2018; Moffat A.C. et al., 2011], однако, механизмы патогенеза этих проявлений по-прежнему не раскрыты, что значительно ограничивает возможности разработки эффективных терапевтических мер, обеспечивающих полноценное восстановление морфофункционального состояния лёгких у данной категории пострадавших.

Таким образом, отравления баклофеном и его комбинацией с этанолом представляют собой острую медико-социальную проблему, требующую комплексного решения.

Степень разработанности темы.

На сегодняшний день достаточно детально изучен механизм действия баклофена, его токсикокинетические и токсикодинамические особенности, описаны побочные действия данного препарата, симптомы передозировки. Показано влияние баклофена на состояние ЦНС, дыхательной и сердечно-сосудистой систем. Известно также, что органами мишенями при отравлении им являются головной мозг, сердце и лёгкие. Имеется значительный объём данных о гистоморфологических изменениях в головном мозге [Issa S.Y. et al., 2018] и миокарде [Асанов А. и др., 2020] при изолированном воздействии баклофена. Также достаточно подробно изучены гистоморфологические изменения в головном мозге при отравлении комбинацией баклофена и этанола, есть данные о динамике развития этих изменений, дана их количественная оценка [Romanova O. et al., 2022; Ibrahim L. et al., 2021]. Исследованы, в том числе с применением наиболее современных методик, их особенности и механизмы развития [Ibrahim L. et al., 2021].

Данные о гистоморфологических изменениях в лёгких ограничены и представлены отдельными публикациями [Issa S.Y. et al., 2018; Moffat A.C. et al.,

2011]. Остаются малоизученными отдалённые последствия отравления баклофеном и его сочетанием с этанолом.

Цель исследования – установить в эксперименте и охарактеризовать патогенетические механизмы развития альтерации паренхимы лёгких при отравлении атипичным миорелаксантом баклофеном и его комбинацией с этанолом.

Задачи исследования:

1. Провести анализ основных показателей, отражающих функциональное состояние дыхательной и сердечно-сосудистой систем при воздействии токсической дозы баклофена изолированно и при его комбинации с этанолом.

2. Выполнить качественную и количественную оценку гистоморфологических изменений в лёгких крыс через 3, 4,5 и 24 часа после введения баклофена в дозировке 85 мг/кг в виде монопрепарата и в комбинации с этанолом, охарактеризовать их динамику и механизмы развития.

3. Оценить фагоцитарную активность лейкоцитов на территории лёгких по степени накопления в них гликогена (ШИК-реакция).

4. Исследовать влияние токсической дозы баклофена и его комбинации с этанолом на апоптотические процессы в эпителии альвеол посредством определения экспрессии протеинов Вах и Bcl-2.

5. Исследовать изменения мукоциллиарного клиренса эпителия альвеол, а также ранние признаки развития фибротических процессов в лёгких под влиянием баклофена в токсической дозе и его комбинации с этанолом.

6. Охарактеризовать особенности молекулярных механизмов инициации ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла в паренхиме лёгких при отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом.

7. Оценить активность репарации и пролиферации эпителия альвеол при отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом по степени экспрессии сурфактантного белка D в альвеолоцитах II типа.

8. Охарактеризовать комплекс ключевых молекулярных механизмов пато- и саногенеза токсического повреждения паренхимы лёгких, вызванной воздействием баклофена и его комбинации с этиловым спиртом.

Научная новизна. Впервые проведён анализ ключевых показателей, отражающих состояние сердечно-сосудистой и дыхательной систем в первые часы после отравления баклофеном и его комбинацией с этанолом.

Впервые в эксперименте на животных исследован комплекс гистоморфологических характеристик в лёгких после введения баклофена и его комбинации с этанолом; установлено, что патологические изменения, отмеченные у животных, получавших комбинацию баклофена и этанола, отличаются наибольшим разнообразием и развиваются более быстрыми темпами.

На основании иммуногистохимического исследования было установлено, что после введения баклофена и его комбинации с этанолом активируется процесс апоптоза, что подтверждается ростом соотношения Вах/Bcl-2 через 3 часа после совместного введения баклофена и этанола, через 4,5 часа после изолированного

введения баклофена и комбинированного введения баклофена и этанола и через 1 сутки после совместного введения баклофена и этанола.

Получены принципиально новые данные о влиянии интоксикации, вызванной введением баклофена и этилового спирта, на молекулярные механизмы инициации ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла в паренхиме лёгких.

Впервые показано, что введение баклофена и его сочетания с этиловым спиртом сопровождается инициацией механизмов, направленных на усиление мукоциллиарного клиренса и развитие воспалительного процесса в паренхиме лёгких уже в первые часы после отравления.

Получены новые данные о повышении активности репарации и пролиферации эпителия альвеол при указанном типе токсической альтерации лёгких.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведённых исследований позволили установить комплекс патогенетических и защитно-приспособительных механизмов, развивающихся в паренхиме лёгочной ткани при воздействии токсической дозы атипичного миорелаксанта баклофена в виде монопрепарата и при его сочетании с этиловым спиртом.

Данные, полученные в ходе проведённого исследования, наряду с результатами химико-токсикологического анализа, могут применяться в практике бюро СМЭ при проведении судебно-медицинской экспертизы отравлений баклофеном для более точной оценки механизма наступления смерти при введении баклофена и его комбинации с этанолом.

Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований патогенеза угрожающих жизни токсических поражений тканей и органов при отравлении психотропными веществами, в том числе в сочетании с алкоголем.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена в 2020 – 2025 гг. В рамках настоящего исследования была применена научная методология, базирующаяся на принципах системного анализа и включающая совокупность формально-логических, общенаучных и специализированных исследовательских методик. Для реализации поставленной цели и решения сформулированных задач было проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных (крысах-самцах линии Wistar). Работа с животными выполнялась в 2021 г. на базе НИИ общей реаниматологии ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии». Анализ гистологических препаратов проводился в 2021 – 2025 гг. на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (кафедра нормальной физиологии и кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института РУДН) и НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Все экспериментальные процедуры осуществлялись в строгом соответствии с нормами международного и Российского законодательства, регламентирующего юридические и этические аспекты исследований с применением лабораторных животных. В рамках настоящего исследования применялся комплекс современных лабораторных,

инструментальных и статистических методов. Все этапы лабораторных исследований были выполнены с использованием сертифицированного оборудования.

Внедрение результатов исследования. Результаты проведённой работы внедрены в учебный процесс кафедры судебной медицины и медицинского права ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» МЗ РФ, кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» МЗ РФ, кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера МЗ РФ, кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования, кафедры судебной медицины ИПО ФГБОУ ВО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Минздрава России, кафедры судебной медицины с курсом правоведения ФГБОУ ВО "Тверской государственный медицинский университет" МЗ РФ; в практику ГБУЗ Астраханской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ, ГБУЗ г. Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Департамента здравоохранения г. Москвы; КОГБСЭУЗ «Кировское бюро судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ.

Положения, выносимые на защиту:

Введение в организм баклофена и его комбинации с этанолом приводит к развитию ряда изменений функционального состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем, важнейшими из которых являются снижение сатурации крови кислородом, уменьшение ЧДД, повышение системного артериального давления, сопровождающееся положительным хронотропным эффектом, а также появление в лёгких комплекса гистологических изменений, глубина которых зависит от срока, прошедшего с момента введения препарата и от характера его поступления в организм: изолированно или в комбинации с этанолом.

При отравлении баклофеном и его сочетанием с этанолом отмечается усиление процесса накопления полисахаридов в лейкоцитах, что подтверждается при проведении ШИК-реакции и свидетельствует о росте их активности.

При введении баклофена и его комбинации с этанолом в бронхиальном эпителии, альвеолоцитах I типа и нейтрофилах отмечается повышение экспрессии как проапоптотического белка Вах, так и антиапоптотического белка Bcl-2 с увеличением соотношения Вах/Bcl-2 через 3 и 4,5 часа после изолированного поступления баклофена и 4,5 и 24 часа при комбинации баклофена и этанола, что свидетельствует об активации апоптотических процессов в данных структурах в указанные сроки.

Под воздействием баклофена и его комбинации с этанолом происходит усиление экспрессии в лёгочных структурах сосудистого эндотелиального фактора VEGF-A, способствующего инициации ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла и интенсификации мукоциллиарного клиренса, при этом максимальной степени проявления вышеуказанные процессы достигают через 1 сутки после применения комбинации баклофена и этанола.

Баклофен в виде монопрепарата и в сочетании с этанолом способствует усилению синтеза сурфактантного белка D, при этом данная реакция не зависит от времени, прошедшего с момента отравления и от характера введения: изолированно или в комбинации с этанолом.

Поступление в организм баклофена в токсической дозе как в виде монопрепарата, так и в сочетании с этиловым спиртом, характеризуется в остром периоде развитием комплекса глубоких патоморфологических изменений в паренхиме лёгких, сопровождающихся включением ряда внутриклеточных процессов, имеющих как саногенетический (Bcl-2, SP-D), так и патогенетический (Bax, MUC1) потенциал. Отдельные молекулярные процессы, более выраженные при сочетанном отравлении, такие как усиление экспрессии MUC1 и VEGF-A, могут создавать риск развития необратимых изменений в лёгких в отдалённом периоде.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций обусловлены достаточным объёмом выборки, применением актуальных методологических подходов и проведением корректного статистического анализа первичных данных, который осуществлялся с использованием программных средств «Microsoft Office» 2017 и «Statistica 12.0». Результаты проведённого исследования полностью согласуются с данными, содержащимися в первичной документации.

Апробация результатов работы. Результаты исследований были доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 55-летию кафедры судебной медицины медицинского института Российского университета дружбы народов «Декабрьские чтения по судебной медицине в РУДН: актуальные вопросы судебной медицины и общей патологии» (Москва, 2020), конференции «Вопросы установления тяжести вреда, причинённого здоровью человека в результате воздействия биологического фактора» (Москва, 2020), XXII всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2021), конференции «Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы» (Хабаровск, 2021), XIX симпозиуме с международным участием «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 2022), IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Агаджаняновские чтения» (Москва, 2023), научно-практической конференции, посвящённой 30-летию Межрегиональной общественной организации «Судебные медики Сибири» (Томск, 2023), XXIII Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2023), XXX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2024» (Санкт-Петербург, 2024), «Актуальные вопросы науки и практики при выполнении судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз», посвященный памяти профессора Е.М. Саломатина (Москва, 2025), Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы судебной медицины и судебной стоматологии», посвященной

55-летию кафедры судебной медицины и медицинского права Российского университета медицины (Москва, 2025), на совместном заседании кафедры нормальной физиологии и кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института РУДН, 2025 г.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 32 научные работы, из них: 16 работ в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (PubMed, WoS, Scopus, RSCI), 1 статья – в журнале из перечня, рекомендованного ВАК Минобрнауки РФ, 5 зарегистрированных баз данных.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, 3-х глав, в которых изложены результаты собственного исследования, главы с обсуждением полученных результатов, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 241 странице печатного текста, содержит 26 таблиц и 58 рисунков. Библиография включает в себя 382 источника российской и зарубежной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Wistar стока SD (Sprague Dawley) возрастом 20 недель, полученных из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо». В условиях эксперимента содержание животных и все манипуляции с ними проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Исследование одобрено Комитетом по этике медицинского института РУДН (протокол № 27 от 18 апреля 2024 года).

Животные были рандомизированы в следующие экспериментальные группы:

- 1-я (контрольная) группа (n=5) – интактные животные, не получавшие ни баклофен, ни этанол;
- 2-я группа (n=5) – животные, получавшие баклофен в дозе 85 мг/кг, длительность эксперимента 3 часа;
- 3-я группа (n=5) – животные, получавшие комбинацию баклофена в дозе 85 мг/кг и 40% этанола из расчёта 7 мл/кг, длительность эксперимента 3 часа;
- 4-я группа (n=5) – животные, получавшие баклофен в дозе 85 мг/кг, длительность эксперимента 4,5 часа;
- 5-я группа (n=5) – животные, получавшие комбинацию баклофена в дозе 85 мг/кг и 40% этанола из расчёта 7 мл/кг, длительность эксперимента 4,5 часа;
- 6-я группа (n=5) – животные, получавшие баклофен в дозе 85 мг/кг, длительность эксперимента 24 часа;
- 7-я группа (n=5) – животные, получавшие комбинацию баклофена в дозе 85 мг/кг и 40% этанола из расчёта 7 мл/кг, длительность эксперимента 24 часа;

Методика моделирования острого отравления баклофеном и его сочетанием с этанолом. В предварительном эксперименте определяли оптимальную дозу баклофена. С этой целью крысам, разделённым на группы по 5 особей, через назогастральный зонд вводили препарат в дозах 125, 115, 105 и 85 мг/кг. В группе животных, получавших баклофен в дозе 85 мг/кг, все животные оставались живы. В остальных группах часть животных погибала. Таким образом, доза 85 мг/кг, была определена как токсическая сублетальная и использовалась далее в основном эксперименте. Этанол вводили из расчёта 7 мл 40% раствора на кг массы тела животного. Как баклофен, так и этанол вводили животных экспериментальных групп в виде растворов через назогастральный зонд под общим наркозом.

Исследование параметров функциональной активности сердечно-сосудистой системы проводили при помощи системы мониторинга физиологических показателей RSM с программным обеспечением MouseMonitorS (Indus Instruments, США). Артериальное давление измеряли методом неинвазивной манжеточной тонометрии в хвостовой артерии животных. Оценивали следующие показатели: систолическое АД (АД сист.), диастолическое АД (АД диаст.) и ЧСС. Дополнительно рассчитывали пульсовое давление (АД пульс.) и среднее артериальное давление (АД средн.).

Определение сатурации кислородом крови проводили методом пульсоксиметрии с помощью анализатора i-STAT (Abbott Laboratories, США) и оригинальных картриджей (Abbott Laboratories, США).

Измерение температуры тела осуществляли ректальным методом.

Количество эритроцитов и содержание гемоглобина определяли в венозной крови с помощью ветеринарного автоматического гематологического анализатора Exigo (Boule Medical, Швеция), используя оригинальные реагенты.

Гистоморфологическое исследование паренхимы лёгких проводилось с использованием следующей методики. Животных выводили из эксперимента путём передозировки средства общего обезболивания. Извлекались лёгкие, из них иссекали фрагменты размером 5 x 5 мм и фиксировали в течение 72 часов в 10% нейтральном забуференном параформальдегиде. Затем материал обрабатывали и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме "Slidt 2003" (Германия) и наносили на предметные стёкла. Гистологические срезы исследовались с помощью светового микроскопа «Nikon Eclipse E400» при увеличении 200x и 400x и видеосистемы «TauVideo» с программой «Tau Морфология» на основе камеры «Watec 221s». При этом анализировали 30 полей зрения в каждом препарате лёгкого. Оценивали наличие следующих признаков: изменение кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла (полнокровие капилляров, венул, наличие кровоизлияний в межальвеолярных перегородках (МАП), кровоизлияния в альвеолы, наличие сладжа), формирование ателектазов и дистелектазов, эмфизематозные изменения, клеточная инфильтрация (увеличение числа лейкоцитов на территории МАП), десквамация эпителия внутри бронхиол, появление в них секрета.

Методика проведения ШИК-реакции. Срезы депарафинизировали с использованием ксилола (5 ёмкостей) в течение 5 минут при температуре 20-22° С,

дважды обрабатывали 96° этанолом по 2 минуты. Два раза по 2 минуты промывали стёкла в дистиллированной воде. Наносили 0,5% раствор йодной кислоты и выдерживали 7 минут, промывали в дистиллированной воде. В тёмном помещении наносили реактив Шиффа и выдерживали 15 минут. Промывали стёкла в дистиллированной воде, окисляли сернистой водой (100 мл дистиллированной воды, 5 мл 10% раствора метабисульфита натрия и 5 мл 1М серной кислоты.) в течение 3 минут, затем промывали стёкла в дистиллированной воде, наносили гематоксилин Майера и выдерживали 5 минут. Промывали водой трижды. Удаляли воду из срезов в одной порции 70° этанола, двух порциях 96° этанола. Экспозиция в каждой порции спирта составляла 2 минуты. Просветляли срезы в двух порциях карбол-ксилола в течение 1 минуты. Окончательно обезвоживали срезы в двух порциях толуола в течение 2 минут. Заключили срезы в синтетическую среду. Нейтральные мукополисахариды окрашивались в пурпурно-красный цвет, гликоген – в тёмно-фиолетовый. Считали долю ШИК-положительных лейкоцитов.

Иммуногистохимическое исследование. Используя парафиновые блоки препаратов лёгкого, изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм на микротоме «Slidt-2003» (Германия) и наносили на стекла с поли-L-лизиновым адгезивным покрытием Polysine («Thermo Fisher Scientific», Великобритания). Срезы депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации.

Далее оценивалась экспрессия в паренхиме лёгких следующих факторов: протеинов Вах и Bcl-2 (исследование апоптотических процессов), сосудистого эндотелиального фактора роста А – VEGF-A (оценка механизмов инициации ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла), муцина-1 – MUC-1 (анализ особенностей мукоциллиарного клиренса, а также инициальных воспалительных и фибробластических процессов), сурфактантного белка D – SP-D (оценка активности репарации и пролиферации эпителия альвеол). Для реализации указанных задач проводились реакции с первичными кроличьими поликлональными антителами («Cloud-Clone», КНР):

1. Вах Antibody produced in rabbit;
2. Bcl-2 Antibody produced in rabbit;
3. VEGF-A antibody produced in rabbit;
4. MUC-1 antibody produced in rabbit;
5. SP-D antibody produced in rabbit.

Результаты иммуногистохимической реакции визуализировали с использованием набора реагентов «Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit» («Abcam», Великобритания). Время инкубации с системой визуализации ДАБ составляло 5-10 минут. Препараты докрасивали гематоксилином Майера. Реакция считалась положительной при появлении коричневого окрашивания цитоплазмы клеток. Проводили световую микроскопию в 30 полях зрения в каждом препарате лёгкого при 400-кратном увеличении на микроскопе “Nikon Eclipse E-400” с видеосистемой на основе камеры “Watec 221S”. Количественный анализ позитивно окрашенных структур проводился с использованием сетки Г.Г. Автандилова: определяли отношение количества равноудалённых точек, приходящихся на

позитивно окрашенную цитоплазму клеточных структур, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой [Автандилов Г.Г., 1990].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы «STATISTICA 12.0» (StatSoftInc., США). Для каждого показателя вычисляли среднее значение и ошибку среднего. Для определения достоверности отличий полученных данных применяли *U*-критерий Манна-Уитни (за достоверную принималась разность средних значений при $p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки отдельных показателей деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем при остром отравлении баклофеном и его сочетанием с этанолом.

Введение баклофена и его комбинации с этанолом сопровождалось комплексом изменений функциональных показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем (Таблица 1). Так, снижалась сатурация крови кислородом, что свидетельствует о развитии дыхательной гипоксии [Franchini, K. et al, 2004]. При этом через 3 и 4,5 часа после начала эксперимента сатурация в группах животных, получавших комбинацию баклофена и этанола, была значимо ниже по сравнению с группами, которым вводили баклофен в виде монопрепарата, однако к 24-му часу разница нивелировалась. Снижалась ЧДД, что согласуется с данными литературы и вызвано, вероятно, непосредственным угнетающим действием баклофена на дыхательный центр [Veraha E. et al., 2017; Charifou Y. et al., 2016; Leung N.Y. et al., 2006].

Таблица 1 – Функциональные показатели деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем при остром отравлении баклофеном и его сочетанием с этанолом (M±m)

	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч)	Группа 4 баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч)	Группа 6 (баклофен, 24 ч)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч)
АД сист., мм рт.ст	106,0± 1,7	117,6± 2,9*	122,4± 2,7*	123,4± 1,2*	126,8± 1,1*	128,8± 1,3*	129,6± 0,8*
АД диаст., мм рт.ст	63,4± 1,0	57,6± 0,7*	57,0± 0,5*	59,4± 0,7*	63,4± 0,6 [#]	60,0± 0,8*	70,8± 2,1* ^{#&%}
АД пульс., мм рт.ст	42,6± 1,3	60,0± 1,3*	65,4± 3,0* [^]	64,0± 1,6* [^]	63,4± 1,0*	68,8± 1,2* [/]	58,8± 1,6* ^{#&%}
АД средн., мм рт.ст	77,4± 1,0	77,4± 0,7	78,8± 0,6	80,6± 0,4* [^]	84,6± 0,4* [#]	82,8± 0,5* ^{^/}	90,4± 1,8* ^{#&%}
ЧСС, уд/мин	376,6± 10,6	403,8± 4,2*	459,84± 9,6* [^]	493,8± 3,2* [^]	503± 1,6* [#]	450,2± 11,7* ^{^/}	499± 3,6* [#]
ЧДД, дых/мин	88,4± 0,8	66,8± 1,8*	66,0± 1,4*	64,2± 1,5*	59,2± 0,7* [#]	52,8± 1,0*	56,4± 1,6* ^{#&%}

Сатурация, %	97,6± 0,5	95,0± 0,3*	93,2± 0,9*^	95,6± 0,6*	90,6± 0,4*#/#	90,4± 0,2*^/	90,2± 0,6*#
Ректальная температура, °С	37,76± 0,08	37,14± 0,07*	37,26± 0,16*	36,56± 0,29*^	36,56± 0,28*#	36,08± 0,02*	36,06± 0,09*#&
Эритроциты крови 10 ¹² /л	7,50± 0,18	7,70± 0,08	7,88± 0,12*	7,82± 0,13	7,78± 0,12	7,78± 0,07*	7,44± 0,17*#&%
Гемоглобин, г/л	122± 2,17	119± 2,02	117,4± 2,66	114,4± 1,86*	121,8± 2,59/	115,4± 3,21*^	115,2± 1,07*#&

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Возрастало по сравнению с контрольным уровнем систолическое и пульсовое АД, при этом значимых различий между экспериментальными группами не отмечалось. Диастолическое АД достоверно снижалось в группах животных, получавших баклофен изолированно и в сочетании с этанолом при длительности эксперимента 3 часа, далее отмечался рост данного показателя. Через 24 часа после совместного введения баклофена и этанола диастолическое АД было уже статистически значимо выше по сравнению с контрольным.

ЧСС была достоверно выше во всех экспериментальных группах, что, по-видимому, следует рассматривать как компенсаторную реакцию на прогрессирующую гипоксию. На всех сроках исследования в группах, получавших баклофен и этанол, ЧСС была значимо выше по сравнению с животными, которым вводили баклофен как монопрепарат.

Гистоморфологические изменения в паренхиме лёгких при остром отравлении баклофеном и его сочетанием с этиловым спиртом.

После введения баклофена и его комбинации с этанолом в лёгких экспериментальных животных развивался комплекс гистологических изменений, включавший в себя увеличение кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла, утолщение МАП за счёт отёка (Рисунок 1), их инфильтрацию лейкоцитами, развитие ателектазов и дистелектазов, чередующихся с участками эмфиземы. Указанные нарушения имели определённую динамику и усугублялись с течением времени. Через 3 часа после начала эксперимента изменения в микрососудах ограничивались развитием капиллярного полнокровия (Рисунок 2), которое через 4,5 часа после начала эксперимента усиливалось. Как в группах животных, получавших баклофен изолированно, так и его комбинацию с этанолом, отмечали появление кровоизлияний в МАП. Через 4,5 часа после изолированного введения баклофена и его сочетания с этанолом развивался сладж. У всех животных, которым вводили комбинацию баклофена и этанола, гистологические изменения в лёгких были более разнообразны. Отмечалось слущивание эпителия в просвет бронхов (Рисунки 3 и 4), в бронхиолах регистрировалось наличие слизи, чего не наблюдали в группах,

получавших баклофен в качестве монопрепарата. У животных, получавших комбинацию баклофена и этанола, гистологические изменения развивались более быстрыми темпами по сравнению с группами баклофена. Так, при сочетанном отравлении баклофеном и этанолом, сладж развивался уже через 3 часа после начала эксперимента, а в группе, которой вводили баклофен изолированно, через 4,5 часа (Рисунок 5). Кровоизлияния в альвеолы у животных, которым вводили баклофен и этанол, отмечали через 4,5 часа после введения препаратов, а у животных, получавших баклофен в виде монопрепарата – через 1 сутки.

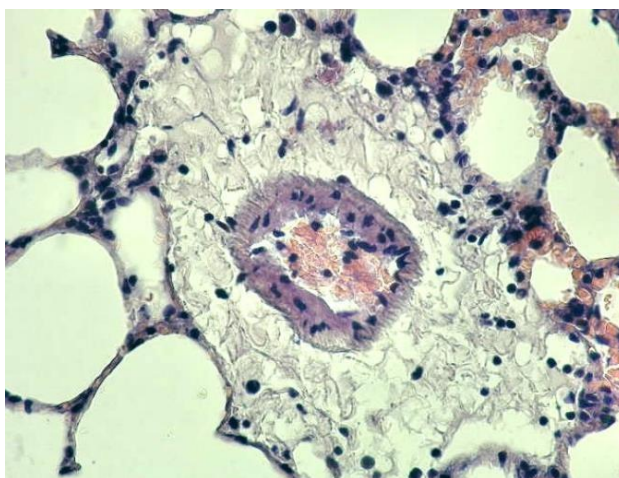


Рисунок 1 – Лёгкое крысы группы 2 (баклофен 85 мг/кг). Утолщение МАП. Отёк. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

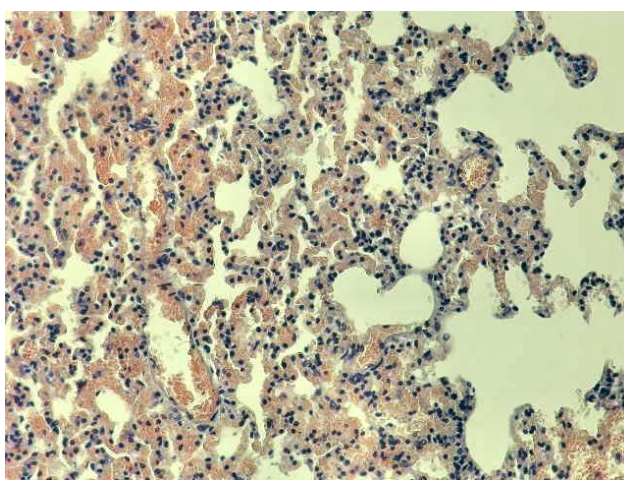


Рисунок 2 – Лёгкое крысы группы 2 (баклофен 85 мг/кг, 3 ч.). Полнокровие капилляров, венул, кровоизлияния в МАП. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

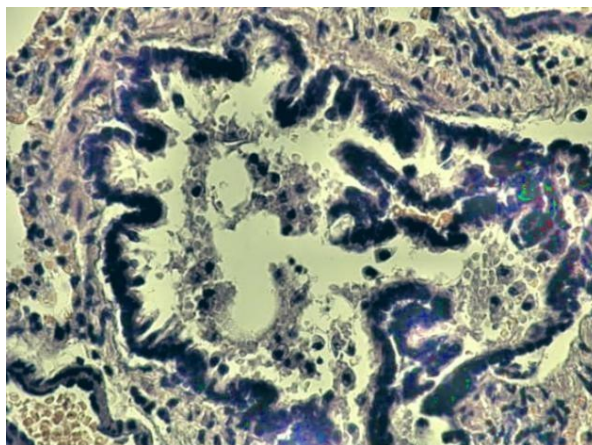


Рисунок 3 – Лёгкое крысы группы 3 (баклофен 85 мг/кг + этанол, 3 часа). Слущенный эпителий в просвете бронхов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

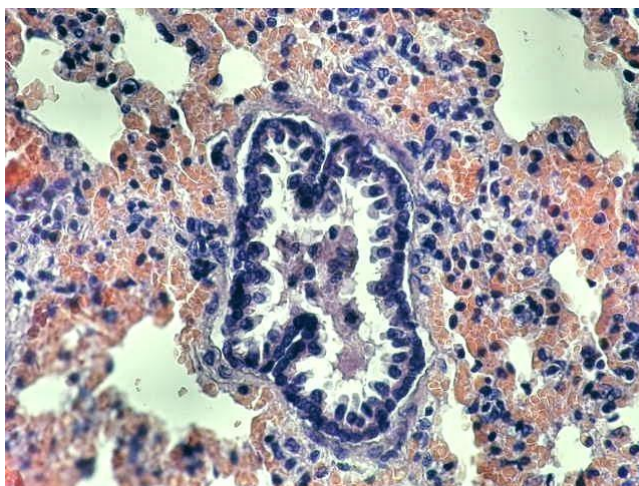


Рисунок 4 – Лёгкое крысы группы 5 (баклофен+ этанол, 4,5 часа). Слущенный эпителий и секрет в просвете бронхиолы, множественные кровоизлияния в МАП. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

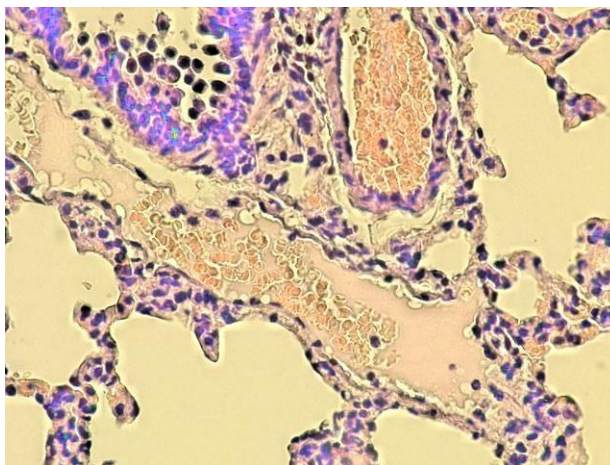


Рисунок 5 – Лёгкое крысы группы 5 (баклофен 85 мг/кг + этанол, 4,5 часа). Сладж. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

При проведении морфометрического исследования оценивались следующие показатели: толщина МАП, диаметр альвеол, ширина альвеолярных ходов, диаметр венул и артериол.

Данные о толщине МАП после введения баклофена и его комбинации с этанолом представлены в Таблице 2.

Как при изолированном введении баклофена, так и его комбинации с этанолом, толщина МАП достоверно отличалась от контроля. Она значимо возрастала от 3-го к 4,5-му, а далее от 4,5 к 24-му часу после введения как баклофена в виде монопрепарата, так и его комбинации с этанолом, при этом во все сроки данный показатель был выше в группах, получавших сочетание баклофена и этанола, по сравнению с группами животных, которым вводили баклофен в качестве монопрепарата. Увеличение толщины МАП происходит за счёт отёка и их инфильтрации лейкоцитами, что подтверждается в последующих исследованиях с применением сетки Г.Г. Автандилова.

Таблица 2 – Толщина МАП после введения баклофена и его комбинации с этанолом ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Толщина МАП, мкм	7,96± 0,19	4,59± 0,12*	12,23± 0,22*^	15,77± 0,25*^	17,29± 0,28*#"	16,00± 0,27*^"	19,42± 0,42*# / %

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен + этанол, 3 ч.); " $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4; / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.), % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч.)

Данные о диаметре альвеол после введения баклофена и его комбинации с этанолом представлены в Таблице 3.

При введении баклофена и его комбинации с этанолом диаметр альвеол был достоверно больше по сравнению с контрольной группой. К 3-му часу после начала эксперимента в группе баклофена отмечался резкий рост диаметра альвеол. В случае сочетанного введения баклофена и этанола также отмечали рост данного показателя. Через 4,5 часа он был увеличен по сравнению с 3-м часом, а через 24 часа – по сравнению с 4,5-м часом. При этом на всех сроках исследования диаметр альвеол был значимо больше в группах баклофена по сравнению с группами баклофена и этанола.

Таблица 3 – Диаметр альвеол после введения баклофена и его комбинации с этанолом ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Диаметр альвеол, мкм	43,27± 0,84	71,95± 1,76*	49,33± 1,27*^	66,33± 1,39*^	53,83± 0,94*#"	66,36± 1,01*^	60,98± 1,18*#/%

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен + этанол, 3 ч.); " $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4; / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.), % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч.)

Таблица 4 – Диаметр артериол после введения баклофена и его комбинации с этанолом ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Диаметр артериол, мкм	33,29± 1,15	45,19± 1,52*	52,91± 1,78*^	32,98± 0,52	30,70± 0,64#	35,32± 1,28	33,99± 0,85*#&%

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч.); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч.); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч.); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч.).

После введения баклофена и его сочетания с этанолом к третьему часу после начала эксперимента отмечается значимый рост диаметра артериол с последующим постепенным уменьшением до исходного значения.

Полученные данные представлены в Таблице 4.

Через 3 часа после введения баклофена как монопрепарата диаметр венул был достоверно меньше по сравнению с контролем. На сроке 4,5 часа после начала эксперимента в группе баклофена и этанола отмечался значимый рост диаметра венул, а затем, к 24-му часу, уменьшение.

Результаты измерения диаметра венул представлены в Таблице 5.

Данные о ширине альвеолярных ходов после введения баклофена и его комбинации с этанолом представлены в Таблице 6.

Таблица 5 – Диаметр венул после введения баклофена и его комбинации с этанолом ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Диаметр венул, мкм	48,47± 2,38	37,34± 2,41*	50,98± 2,46^	47,64± 1,10^	56,39± 1,45*##/	48,77± 1,60^	40,17± 0,82*##%

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Таблица 6 – Ширина альвеолярных ходов после введения баклофена и его комбинации с этанолом ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Ширина альвеолярных ходов, мкм	57,20± 1,57	62,04± 2,29	52,12± 1,25^	95,39± 1,68*^	95,82± 1,79*#	117,56± 2,85*^/	128,63± 1,84*##&%

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Данные, представленные в таблице 6, свидетельствуют о том, что после изолированного введения баклофена и его сочетания с этанолом наблюдается увеличение ширины альвеолярных ходов. Тенденция к их расширению отмечается уже через 3 часа после начала эксперимента, через 4,5 часа после введения баклофена и его комбинации с этанолом ширина альвеолярных ходов становится достоверно больше по сравнению с контролем и с 3-м часом после начала эксперимента. Через 1 сутки отмечается значимое расширение альвеолярных ходов по сравнению с 4,5-м часом, при этом данный показатель у животных группы баклофена и этанола, оказался достоверно увеличенным по сравнению с группой баклофена.

Данные, полученные в результате морфометрического исследования

гистологических препаратов паренхимы лёгких, представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Результаты морфометрического исследования срезов паренхимы лёгких на различных сроках после введения баклофена и его комбинации с этанолом (M±m)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч)	Группа 6 (баклофен, 24 ч)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч)
Просвет альвеол, об. %	37,1± 1,17	42,36± 1,33*	40,88± 2,19*	38,64± 1,44^	36,9± 1,1 #	38,4± 1,61^	39,8± 1,96&
Паренхима, об. %	62,9± 1,16	57,64± 1,14*	59,12± 2,1*	61,36± 1,29	63,1± 1,01 #	61,6± 1,44	60,2± 1,95&
в том числе:							
МАП, об. %	44,96± 1,2	36,88± 1,29*	35,02± 1,59*	32,2± 1,24*^	29,74± 1,11* #	33,42± 1,42*	29,96± 1,52*% ^o
Лейкоциты, об. %	9,22± 0,47	8,52± 0,31	8,42± 0,46	12,32± 0,53*^	13,68± 0,51*#/ ^o	8,96± 0,63	10,82± 0,47*#&% ^o
Отёк, об. %	6,18± 0,35	7,72± 0,51*	10,4± 0,63*^	9,98± 0,64*^	11,36± 0,51*	11,22± 0,6*^	11,86± 0,65*#
Сосуды, об. %	2,78± 0,18	4,36± 0,25*	5,52± 0,29*^	6,64± 0,34*^	7,82± 0,36*#/ ^o	7,56± 0,34*^ /	7,32± 0,32*
Соотношение лейкоциты/МАП	0,15± 0,01	0,15± 0,01	0,15± 0,01	0,21± 0,01*^	0,22± 0,01*#	0,15± 0,01/	0,18± 0,01*#% ^o

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

При проведении морфометрического исследования было обнаружено значимое снижение объёмной доли альвеол и МАП, но при этом возрастала площадь отёка. Через 4,5 часа после начала эксперимента нарастала лейкоцитарная инфильтрация (значимо возрастала площадь, занятая лейкоцитами), а к 24-му часу после начала эксперимента она снижалась. Объёмная доля гистологического препарата, занятая лейкоцитами, была достоверно больше в группах, получавших комбинацию баклофена и этанола, по сравнению с группами животных, которым вводили баклофен в качестве монопрепарата.

Результаты оценки ШИК-реакции. После введения баклофена и его комбинации с этанолом отмечался рост доли ШИК-положительных лейкоцитов (Рисунок 6).

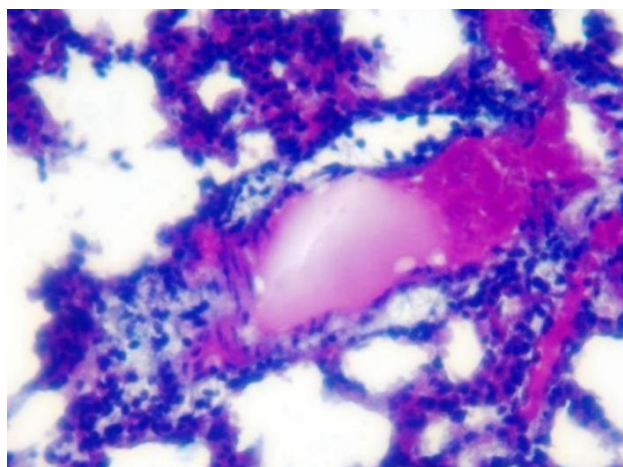


Рисунок 6 – Лёгкое крысы группы 3 (баклофен, 3 часа). Сладж. ШИК-положительные лейкоциты. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. $\times 400$.

Данные, отражающие динамику доли ШИК-положительных лейкоцитов, представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Доля ШИК-положительных лейкоцитов при введении баклофена и его комбинации с этанолом в разные сроки ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Доля ШИК-положительных лейкоцитов, %	28,68 \pm 0,31	60,32 \pm 0,59*	67,06 \pm 0,79*^	62,58 \pm 0,85*^	73,18 \pm 0,56*#/'	60,1 \pm 1,1*	61,34 \pm 0,73*#&

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Доля ШИК-положительных лейкоцитов возрастала во всех экспериментальных группах, что свидетельствует о росте их фагоцитарной активности. При этом как при введении баклофена в качестве монопрепарата, так и его комбинации с этанолом, максимальной степени проявления данная реакция достигала через 4,5 часа после начала эксперимента.

ШИК-реакция применяется для определения содержания гликогена и других полисахаридов в клетках, что, в частности, позволяет применять данную методику в качестве инструмента оценки функционального состояния лейкоцитов. Одним из важных аспектов патологических изменений при интоксикации баклофеном является увеличение доли ШИК-положительных лейкоцитов. Рост содержания гликогена

объясняется повышением метаболической активности при любом виде лимфоидной пролиферации. Лейкоциты, активированные в условиях интоксикации, поглощают повреждённые клетки и продукты их распада, что приводит к накоплению гликогена и других полисахаридов в их цитоплазме и, как следствие, к увеличению интенсивности ШИК-реакции [Пирс Э. и др., 1962; Овсянников В.Г. и др., 2012].

После введения баклофена и его комбинации с этанолом в лёгких развивается комплекс глубоких гистоморфологических изменений, включающий в себя нарушения кровообращения на всех уровнях микроциркуляторного русла, утолщение МАП за счёт отёка, их инфильтрацию лейкоцитами, появление ателектазов и дистелектазов, чередующихся с участками эмфиземы. Морфологические изменения в лёгочной ткани при этом имеют чёткую стадийность. При введении комбинации баклофена и этанола гистологические изменения отличаются бóльшим разнообразием (отмечается наличие слизи и слущенного эпителия в бронхах) и развиваются более быстрыми темпами (так, при изолированном введении баклофена сладж отмечается через 4,5 часа после введения препаратов, а при совместном введении баклофена и этанола – уже через 3 часа). Воспалительные изменения проявляются в максимальной степени на сроке 4,5 ч в группе животных, которым вводили баклофен в сочетании с этанолом, что подтверждается результатами морфометрического исследования (максимальная объёмная доля препарата, занятая отёком, лейкоцитами). В это же время достигает максимума фагоцитарная активность лейкоцитов, что было обнаружено в ходе проведённой ШИК-реакции.

Результаты исследования влияния токсической дозы баклофена и его комбинации с этанолом на апоптотические процессы в эпителии альвеол посредством определения экспрессии протеинов Вах и Bcl-2.

В ходе иммуногистохимического исследования было установлено, что при введении баклофена и его сочетания с этанолом отмечается усиление экспрессии проапоптотического белка Вах (Рисунок 7).

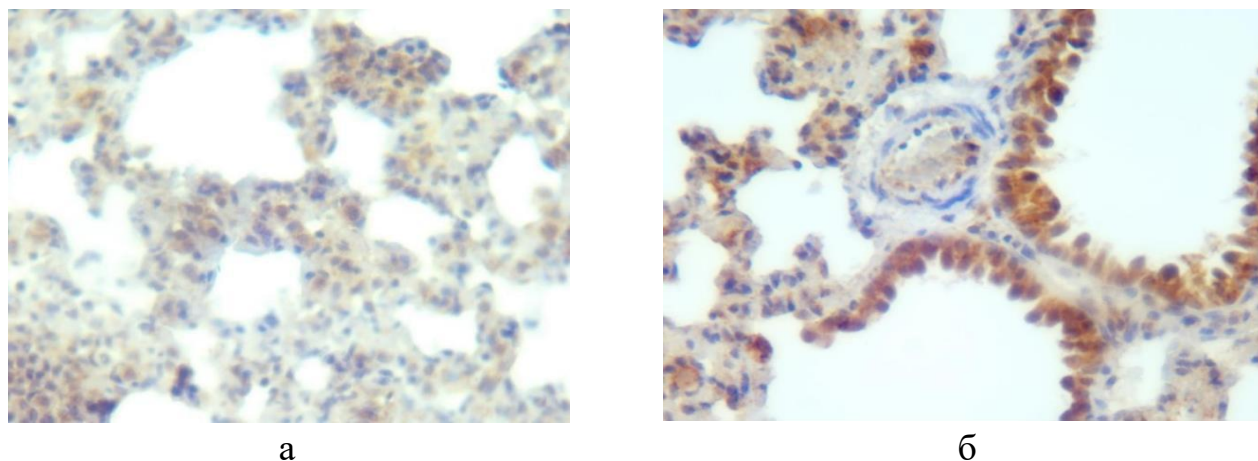


Рисунок 7 – Оценка экспрессии Вах в бронхиальном эпителии лёгких крыс. Иммуногистохимическая окраска. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. ×400. Слабая экспрессия Вах в группе 1 (контроль) (а); выраженная экспрессия Вах в группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч.) (б).

Отмечается также рост доли структур, экспрессирующих данный белок (Таблица 9).

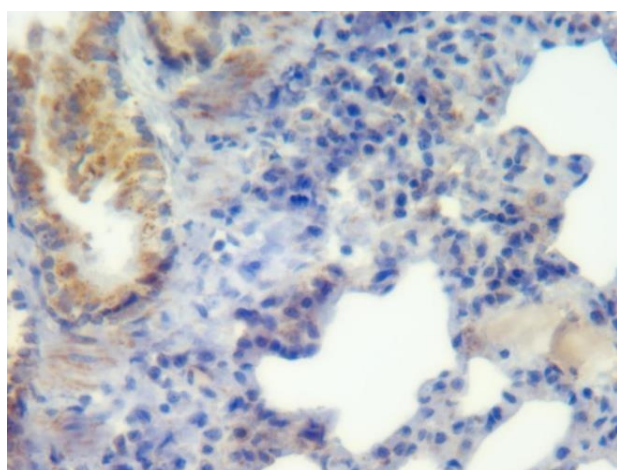
Таблица 9 – Результаты полуколичественного анализа данных о доле структур, экспрессирующих Вах ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Вах, об. %	10,13± 0,48	22,97± 1,01*	16,66± 0,93*^	19,74± 0,69*^	28,85± 1,33*#	11,39± 0,73^/	19,43± 1,07*#&%

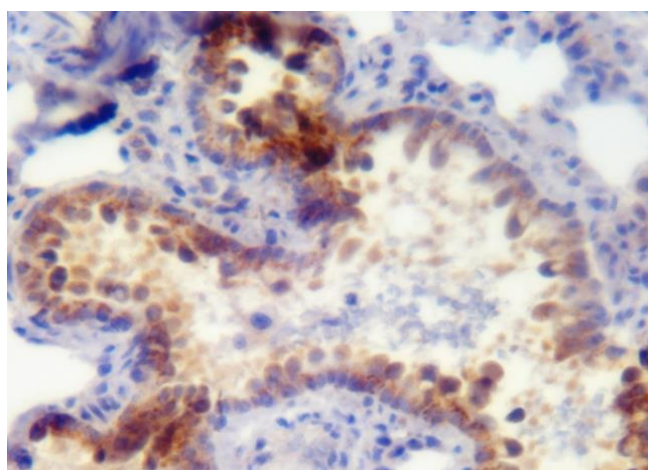
Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Максимальная экспрессия Вах при изолированном введении баклофена отмечалась через 3 часа после начала эксперимента, а при введении комбинации баклофена и этанола – через 4,5 часа. На сроках 4,5 и 24 часа в лёгких животных, группы баклофена и этанола, экспрессия Вах была значимо выше, чем в группах баклофена, что свидетельствует о росте апоптопической активности.

Однако после введения баклофена увеличивалось также количество клеток с положительной иммуногистохимической реакцией на антиапоптопический белок Bcl-2 (Рисунок 8).



а



б

Рисунок 8 – Оценка экспрессии Bcl-2 в бронхиальном эпителии лёгких крыс. Иммуногистохимическая окраска. Докрашивание гематоксилином. Майера. Ув. $\times 400$. Слабая экспрессия Bcl-2 в группе 1 (контроль) (а); выраженная экспрессия Вах в группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч.) (б).

Значимый рост доли структур, экспрессирующих Vcl-2, отмечали у животных, получавших как баклофен в виде монопрепарата, так и его комбинацию с этанолом, через 3 и 4,5 часа после начала эксперимента (Таблица 10), что свидетельствует об усилении в них также и антиапоптотической активности. При этом в группах баклофена и этанола, доля структур, экспрессирующих Vcl-2, была достоверно выше по сравнению с группами животных, которым вводили баклофен как монопрепарат.

Таблица 10 – Результаты полуколичественного анализа данных о доле структур, экспрессирующих Vcl-2 (M±m)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Vcl-2, об.%	10,23± 0,44	14,36± 0,58*	17,44± 1,15*^	12,85± 0,59*^	18,44± 0,80*'	12,30± 0,81^	10,80± 0,82#&

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч.); ' $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч.); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч.); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч.).

Для оценки результирующей направленности апоптотических процессов нами было рассчитано соотношение Вах/Vcl-2 (Таблица 11).

Таблица 11 – Соотношение Вах/Vcl-2 в эпителии альвеол после введения баклофена и его комбинации с этанолом (M±m)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
Вах/ Vcl-2	1,07± 0,06	1,68± 0,12*	1,07± 0,08^	1,70± 0,13*	1,69± 0,13*#	1,12± 0,18^	2,19± 0,24*#&%

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч.); ' $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч.); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч.); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч.).

В контрольной группе соотношение белков Вах и Vcl-2, составляло 1,07, что свидетельствует о балансе между про-апоптотическими и антиапоптотическими процессами. Через три часа от начала эксперимента в группе, подвергшейся изолированному воздействию баклофена, отмечен значимый рост данного

соотношения (1,68), что указывает на существенное усиление апоптотической активности по сравнению с антиапоптотической, в то время как в группе животных, получавшей баклофен изолированно, данный показатель оставался без изменений. Через 4,5 часа после начала эксперимента в обеих группах (баклофен в виде монопрепарата и комбинация баклофена и этанола) наблюдалось преобладание апоптоза, о чем свидетельствует соотношение Вах и Vcl-2, составляющее 1,70 и 1,69, соответственно, при этом различий между группой животных, которым вводили баклофен изолированно, и группой баклофена и этанола, не отмечалось. Спустя 24 часа после начала эксперимента в группе, изолированно получавшей баклофен, соотношение Вах/Vcl-2 уже значительно не отличалось от контроля (1,12). В группе баклофена и этанола преобладали апоптотические процессы, что подтверждается соотношением Вах и Vcl-2, равном 2,19.

Представленные данные свидетельствуют о том, что апоптоз может играть определённую роль в патогенезе повреждения лёгких при отравлении баклофеном и его комбинации с этиловым спиртом. В частности, усиление апоптоза эпителиальных и эндотелиальных клеток лёгких способно приводить к нарушению альвеолярно-капиллярного барьера и нарушению газообмена, и, как следствие, к усугублению дыхательной недостаточности.

Результаты исследования мукоциллиарного клиренса эпителия альвеол под влиянием баклофена в токсической дозе и его комбинации с этанолом.

Как при изолированном введении баклофена, так и его сочетания с этанолом отмечается рост интенсивности экспрессии MUC1 (Рисунок 9).

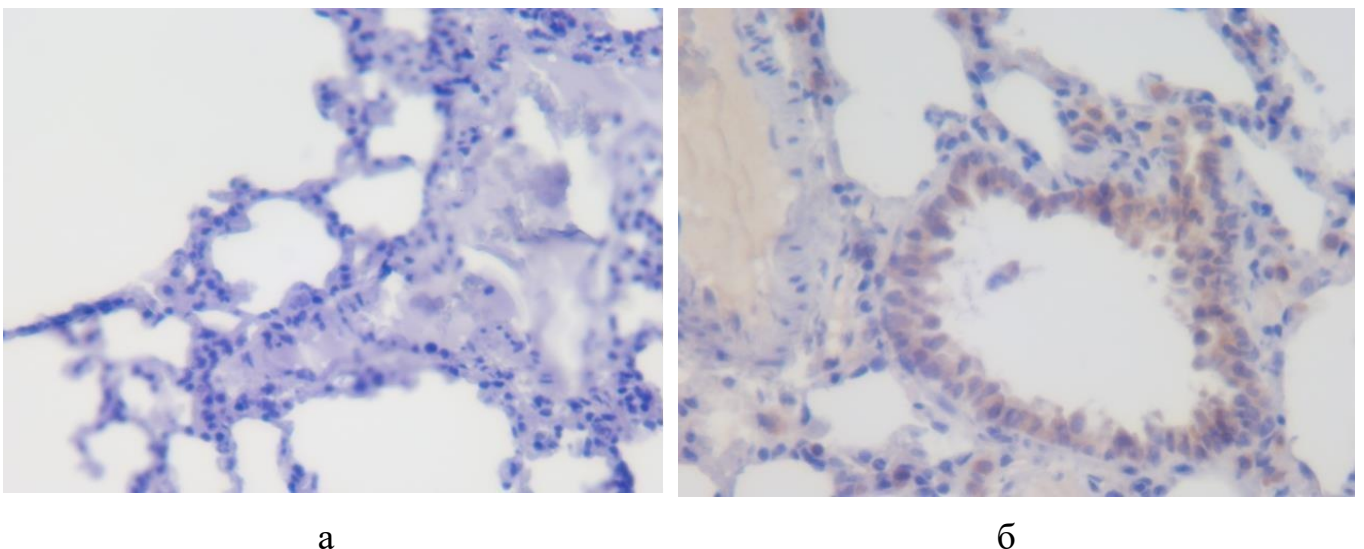


Рисунок 9 – Оценка экспрессии MUC1 в бронхиальном эпителии лёгких крыс. Иммуногистохимическая окраска. Докрашивание гематоксилином. Майера. Ув. $\times 400$. Отсутствие экспрессии MUC1 в группе 1 (контроль) (а); умеренная экспрессия MUC1 в группе 6 (баклофен, 24 ч.) (б).

Доля структур, экспрессирующих MUC1, также возрастала и во всех экспериментальных группах была выше по сравнению с контролем (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты полуколичественного анализа данных о доле структур, экспрессирующих MUC1 ($M \pm m$)

	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
MUC1, об.%	0,85± 0,14	15,87± 0,42*	27,46± 0,85*^	22,76± 0,60*^	18,01± 0,48*#	17,34± 0,37*^	43,31± 1,44*#&%

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч.); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч.); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч.); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч.).

Через 3 часа после начала эксперимента экспрессия MUC1 в лёгких животных, которым вводили сочетание баклофена и этанола, была значимо выше по сравнению с группой баклофена. Через 4,5 часа данный показатель в группе баклофена в виде монопрепарата был, напротив, выше по сравнению с группой баклофена и этанола. Через 1 сутки после введения препаратов экспрессия MUC1 в группе баклофена и этанола, резко возрастала и примерно в 2,5 раза превышала аналогичный показатель у крыс, изолированно получавших баклофен.

Рост экспрессии белка MUC1, отмечаемый во всех экспериментальных группах, свидетельствует об усилении мукоциллиарного клиренса, с одной стороны, и развитии в лёгких воспалительного процесса, а также возможном начале фибротических изменений, с другой. Так, MUC1 может способствовать привлечению и активации иммунокомпетентных клеток, усиливая воспалительный ответ в лёгких, и стимулировать фиброгенез [Thannickal V.J. et al., 2006], что приведёт к отложению коллагена и ремоделированию лёгочной ткани.

Усиление экспрессии MUC1 происходило, предположительно, под воздействием воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IFN- γ , а также посредством активации сигнальных путей NF- κ B [Gray T.E. et al., 2001; Li Y. et al., 2001].

Анализ влияния интоксикации, вызванной баклофеном и его комбинацией с этанолом, на механизмы инициации ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла в паренхиме лёгких.

При введении баклофена и его комбинации с этанолом отмечали усиление экспрессии VEGF-A (Рисунок 10).

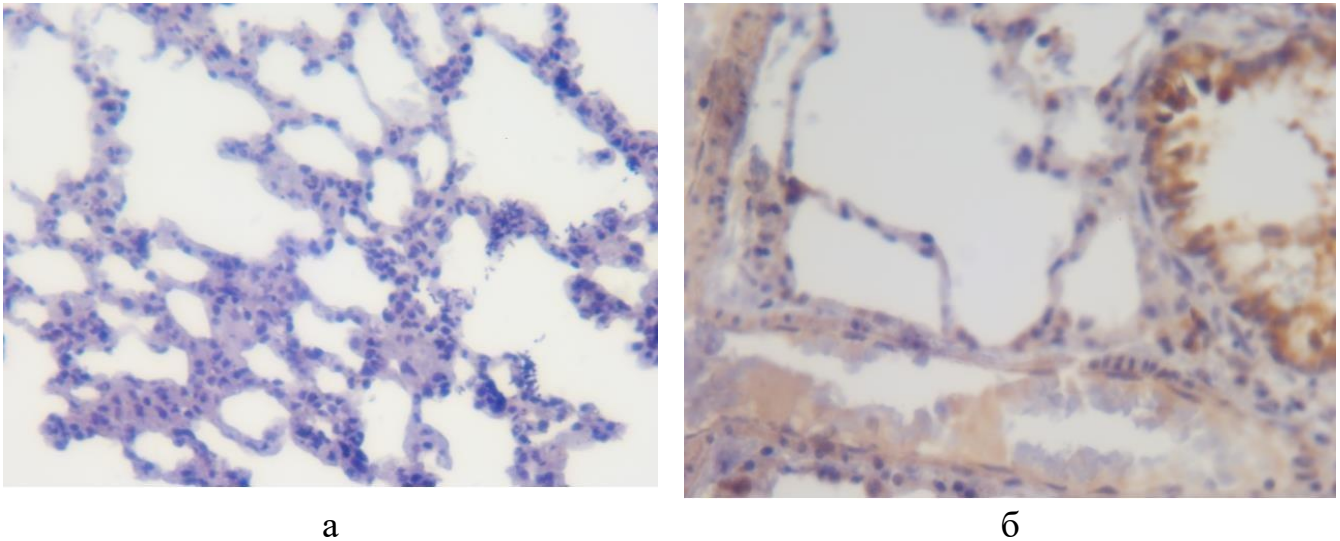


Рисунок 10 – Оценка экспрессии VEGF-A в лёгких крыс. Иммуногистохимическая окраска. Докрашивание гематоксилином. Майера. Ув. $\times 400$. Отсутствие экспрессии VEGF-A в группе 1 (контроль) (а); умеренная экспрессия VEGF-A в группе 4 (баклофен, 4,5 ч.) (б).

Во всех экспериментальных группах достоверно возростала по сравнению с контролем доля структур, в которых наблюдается экспрессия VEGF-A (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты полуколичественного анализа данных о доле структур лёгочной паренхимы, экспрессирующих VEGF-A ($M \pm m$)

	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен +этанол, 24 ч.)
VEGF-A, об.%	0,73 \pm 0,16	17,01 \pm 0,52*	23,65 \pm 0,81*^	13,59 \pm 0,48*^	22,76 \pm 0,37*#	14,57 \pm 0,37*^	33,68 \pm 0,76*#

Примечание: * $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч.); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Экспрессия VEGF-A возростала через 3 часа после введения баклофена как монопрепарата, так и его сочетания с этанолом, затем отмечалось снижение данного показателя, а затем снова рост. При этом на всех сроках исследования экспрессия VEGF-A была значимо выше в лёгких животных, которым вводили сочетание баклофена и этанола по сравнению с животными, получавшими баклофен изолированно.

Усиление экспрессии VEGF-A в лёгких, наблюдаемое во всех

экспериментальных группах, свидетельствует об инициации ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла. Данное явление может реализовываться под воздействием различных механизмов. Гипоксия, возникающая при повреждении лёгких в результате воздействия баклофена и его комбинации с этанолом, способствует повышению экспрессии VEGF-A посредством активации фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), транскрипционного фактора, который связывается с промотором гена VEGF-A. Другим возможным стимулом увеличения продукции VEGF-A могут быть воспалительные цитокины, такие как TNF- α и IL-1 β , стимулирующие экспрессию VEGF-A в эпителиальных и эндотелиальных клетках лёгких [Shibuya M. et al., 2006]. Механическое перерастяжение альвеол также может быть причиной интенсификации синтеза VEGF-A в эпителиоцитах [Risau W. et al., 1997].

VEGF-A стимулирует ангиогенез, способствуя репарации ткани, доставке кислорода и питательных веществ к повреждённым клеткам [Shibuya M. et al., 2006], поэтому увеличение его содержания в клетках можно рассматривать как саногенетический механизм.

В то же время VEGF-A увеличивает проницаемость сосудистой стенки, что может приводить к экссудации паренхимы лёгких и усугублению нарушения газообмена. Кроме того, VEGF-A способствует фиброзу, стимулируя пролиферацию фибробластов и отложение коллагена [Thannickal V.J. et al, 2006].

Результаты оценки активности репарации и пролиферации эпителия альвеол при отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом.

Введение баклофена и его комбинации с этанолом экспериментальным животным приводило к усилению экспрессии сурфактантного белка SP-D (Рисунок 11).

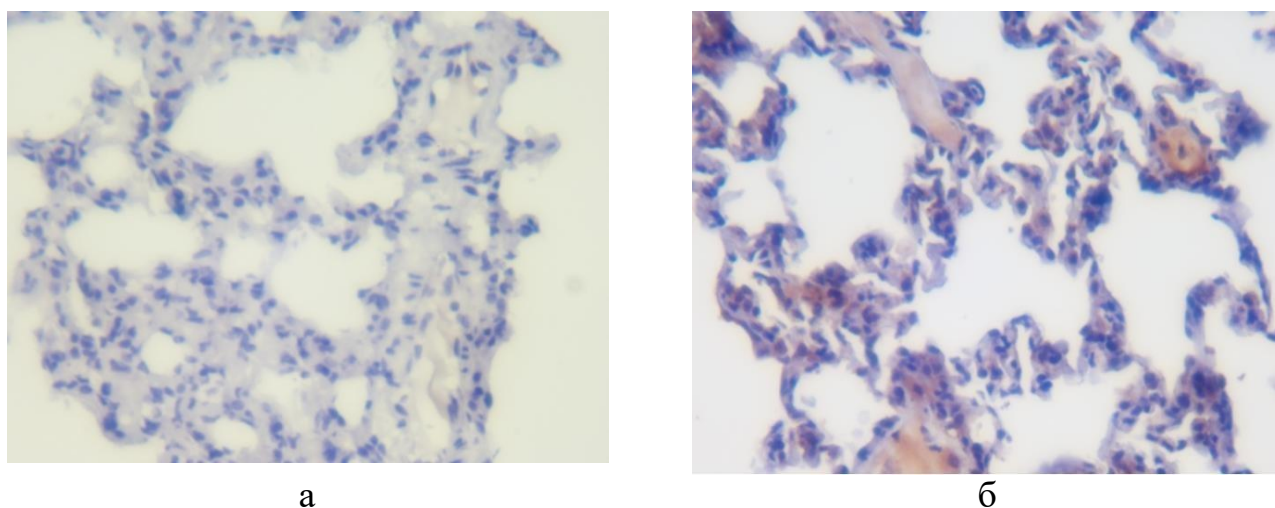


Рисунок 11 – Оценка экспрессии SP-D в лёгких крыс. Иммуногистохимическая окраска. Докрашивание гематоксилином. Майера. Ув. $\times 400$. Отсутствие экспрессии SP-D в группе 1 (контроль) (а); умеренная экспрессия SP-D в группе 7 (баклофен + этанол, 24 ч.) (б).

Возрастала по сравнению с контролем доля структур, экспрессирующих SP-D (Таблица 14).

Таблица 14 – Результаты полуколичественного анализа данных о доле структур, экспрессирующих SP-D ($M \pm m$)

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (баклофен, 3 ч.)	Группа 3 (баклофен + этанол, 3 ч.)	Группа 4 (баклофен, 4,5 ч.)	Группа 5 (баклофен + этанол, 4,5 ч.)	Группа 6 (баклофен, 24 ч.)	Группа 7 (баклофен + этанол, 24 ч.)
SP-D, об. %	0,69± 0,17	21,28± 0,63*	20,32± 0,44*	20,89± 0,59*	18,83± 0,58*#	18,72± 0,44*^	20,05± 0,65*%

Примечание: * - $p \leq 0,01$ – по отношению к группе 1 (контролю); ^ - $p \leq 0,01$ по отношению к группе 2 (баклофен, 3 ч); # $p \leq 0,01$ по отношению к группе 3 (баклофен+этанол, 3 ч); / $p \leq 0,01$ по отношению к группе 4 (баклофен, 4,5 ч); & $p \leq 0,01$ по отношению к группе 5 (баклофен+этанол, 4,5 ч.); % $p \leq 0,01$ по отношению к группе 6 (баклофен, 24 ч).

Возможным механизмом усиления экспрессии SP-D является воздействие провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IFN- γ , которые могут стимулировать экспрессию SP-D посредством активации сигнальных путей NF- κ B и MAPK. Повреждение альвеолярных клеток II типа, основных источников SP-D, также может стимулировать оставшиеся клетки к увеличению синтеза SP-D в качестве компенсаторного механизма [Kishore U. et al., 2006].

SP-D способен снижать избыточное воспаление, предотвращая повреждение тканей, кроме того, SP-D участвует в удалении клеточного дебриса и повреждённого сурфактанта [Kishore U. et al., 2006], тем самым улучшая функцию лёгких, что можно рассматривать как саногенетический механизм. Вместе с тем, избыточное количество SP-D может нарушать структуру и функцию лёгочного сурфактанта, ухудшая газообмен.

В ответ на введение баклофена и его комбинации с этанолом в лёгких развивается комплекс процессов, которые могут иметь как патогенетический, так и саногенетический потенциал (Рисунок 12). Повышение экспрессии Вах можно рассматривать в качестве патогенетического механизма, поскольку усиление апоптоза альвеолоцитов способно приводить к изменению физиологических свойств альвеолярного эпителия и усугублению дыхательной недостаточности. С другой стороны, рост экспрессии Vcl-2 свидетельствует об усилении антиапоптотической активности, а значит, о сохранении целостности альвеолярного эпителия. Патогенетический потенциал имеет и рост экспрессии MUC1. Данный процесс связан с усилением мукоциллиарного клиренса и воспалительного ответа. Кроме того, в результате усиления экспрессии данного фактора происходит активация фибробластов, что в последствии может привести к развитию необратимых изменений лёгочной паренхимы – фиброзу и пневмосклерозу в отдалённом периоде.

Роль усиления экспрессии VEGF-A неоднозначна. С одной стороны, повышение его продукции свидетельствует об инициации ангиогенеза в тканевых структурах, способствующего поддержанию адекватного кровообращения. С другой стороны, известно, что усиление экспрессии данного белка ассоциировано с повышением активности фибробластов [Ricciardolo F.L.M., 2007]. Таким образом, уже в первые часы после введения баклофена и его комбинации с этанолом возникают предпосылки к развитию необратимых изменений лёгочной паренхимы, в частности, фиброза и пневмосклероза. Увеличение содержания SP-D в клетках паренхимы лёгких свидетельствует о повышении интенсивности пролиферации альвеолоцитов, что можно рассматривать как саногенетический механизм.

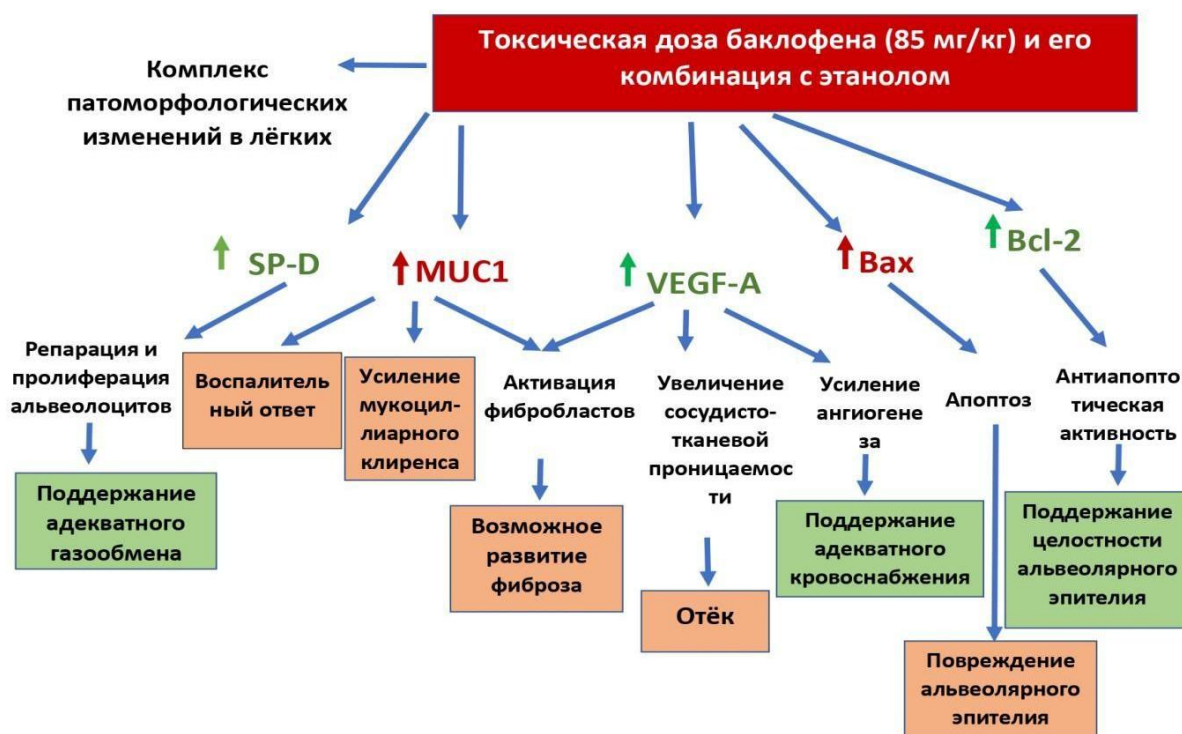


Рисунок 12 - Схема патогенетических и саногенетических процессов в лёгких в ответ на введение баклофена и его комбинации с этанолом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги проведённого исследования

1. При поступлении в организм баклофена в токсической сублетальной дозе, как в изолированном виде, так и при его комбинации с этиловым спиртом отмечаются выраженные функциональные изменения со стороны сердечно-сосудистой и дыхательной систем: снижение сатурации крови кислородом и частоты дыхательных движений, что обусловлено непосредственным угнетающим действием баклофена на дыхательный центр и чрезмерным расслаблением дыхательной мускулатуры вследствие стимуляции ГАМК_A-рецепторов высокими дозами препарата; повышение системного артериального давления, сопровождающееся развитием положительного хронотропного эффекта.

2. Острое отравление баклофеном и его комбинацией с этанолом характеризуется развитием комплекса глубоких патологических изменений в структуре лёгочной паренхимы, включающих в себя расширение альвеол и альвеолярных ходов, утолщение МАП, появление многочисленных ателектазов, чередующихся с участками эмфиземы, клеточной реакции – инфильтрации МАП лейкоцитами, нарушений микроциркуляции – венозного и капиллярного полнокровия, сладжа. При сочетанном воздействии баклофена и этанола гистологические изменения более полиморфны (они также включают в себя появление секрета в просвете бронхов и слущивание эпителия в просвет альвеол) и развиваются более быстрыми темпами.

3. При совместном введении баклофена и этанола возрастает доля ШИК-положительных лейкоцитов, что свидетельствует о накоплении в них полисахаридов и о повышении их функциональной активности. Данный механизм можно рассматривать как саногентический, поскольку в условиях интоксикации активированные лейкоциты участвуют в фагоцитозе повреждённых клеток и продуктов их распада.

4. Поступление в организм баклофена в токсической дозе и его сочетания с этанолом сопровождается ростом экспрессии проапоптотического белка Вах и антиапоптотического фактора Bcl-2. При этом соотношение Вах/Bcl-2 через 3 и 4,5 часа после изолированного введения баклофена и 4,5 и 24 часа после введения комбинации баклофена и этанола достоверно превышает контрольный уровень, что свидетельствует об усилении апоптоза клеток эпителия альвеол в указанных группах.

5. После введения баклофена как монопрепарата и его комбинации с этанолом отмечается рост экспрессии MUC1, что указывает на усиление мукоциллиарного клиренса, развитие в лёгком воспалительного процесса, а также на формирование предпосылок для развития фибротических изменений, поскольку MUC1 может участвовать в регуляции фиброгенеза, способствуя отложению коллагена и ремоделированию лёгочной паренхимы.

6. При остром отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом отмечается повышение экспрессии сосудистого эндотелиального фактора VEGF-A, что отражает активацию процессов ангиогенеза на уровне микроциркуляторного русла. Однако данный механизм может носить и патогенетический характер, обусловленный способностью VEGF-A увеличивать проницаемость стенки микрососудов и стимулировать пролиферацию фибробластов.

7. При введении баклофена в токсической дозе и его комбинации с этанолом наблюдается рост экспрессии SP-D в альвеолоцитах, что может свидетельствовать о включении репарационных процессов, поскольку данный протеин снижает интенсивность воспалительного ответа, а также способствует удалению клеточного дебриса и повреждённого сурфактанта.

8. Воздействие на организм токсической дозы баклофена при его изолированном введении и совместно с этанолом характеризуется в остром периоде развитием комплекса глубоких патоморфологических изменений в паренхиме лёгких, сопровождающихся включением ряда внутриклеточных процессов, имеющих

как саногенетический, так и патогенетический потенциал. Отдельные молекулярные механизмы, проявляющиеся более активно при сочетанном отравлении, такие как повышенная экспрессия MUC1 и VEGF-A, могут создавать риск развития необратимых изменений в дыхательной системе в отдалённом периоде.

Практические рекомендации

Результаты проведённого исследования могут быть использованы для разработки новых терапевтических методов, направленных на восстановление морфофункционального состояния дыхательной системы при отравлении баклофеном и его комбинацией с этиловым спиртом.

Полученные данные будут полезны в работе бюро судебно-медицинской экспертизы при проведении судебно-медицинских экспертиз отравления баклофеном. В случаях, подозрительных на отравление данным препаратом, возможно применение ИГХ-исследования как дополнительного диагностического метода.

Результаты работы могут стать основой дальнейших исследований механизмов токсического повреждения внутренних органов лекарственными веществами.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Исследование особенностей и механизмов повреждения лёгких при воздействии баклофена и его сочетания с этиловым спиртом открывает новые возможности для поиска и разработки терапевтических методов, направленных на полноценное восстановление морфофункционального состояния дыхательной системы при данных интоксикациях.

В дальнейшем возможно установление природы развивающихся под влиянием баклофена и его сочетания с этиловым спиртом явлений в различных органах с использованием молекулярно-биологических и иммунологических методик, в частности, для описания механизмов патологических изменений в лёгких после соответствующих отравлений.

Представляется перспективным выяснение характера распределения препарата и его основного метаболита по тканям и органам как при изолированном введении, так и при сочетании с этиловым спиртом с применением химико-токсикологического исследования.

С целью анализа долгосрочных последствий отравления баклофеном и его сочетанием с этанолом необходимо исследование лёгочной паренхимы в более поздние сроки.

Для наиболее полной оценки последствий воздействия баклофена на организм требуется дальнейшее уточнение его влияния на органы-мишени: головной мозг, сердце, печень и почки с установлением молекулярных механизмов, опосредующих патогенез их токсического повреждения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Романова, О. Л.** Баклофен: механизмы терапевтического и токсического действия (обзор) / О. Л. Романова, М. Л. Благодравов, М. А. Кислов // **Общая реаниматология.** – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 60-71. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-4-60-71.
2. **Романова, О. Л.** Гистоморфологические изменения в лёгких при отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом (экспериментальное исследование) / О. Л. Романова, Д. В. Сундуков, А. М. Голубев, М. Л. Благодравов, А. В. Ершов // **Судебная медицина.** – 2020. – Т. 6. – № 3 – С. 47-52. DOI: 10.19048/fm325.
3. **Romanova, O.** Histomorphological alterations in the lungs in acute combined baclofen and ethanol poisoning / O. Romanova, D. Sundukov, A. Golubev, M. Blagonravov, E. Barinov, A. Churilov, A. Ershov // **Archiv Euromedica.** – 2020. – Vol. 10. – N 4. – P. 66-68. DOI: 10.35630/2199-885X/2020/10/4.14.
4. **Romanova, O.** Histomorphological changes in the lungs in acute baclofen poisoning / O. Romanova, D. Sundukov, A. Golubev, M. Blagonravov, E. Barinov, A. Ershov // **Archiv Euromedica.** – 2020. – Vol. 10. – N 2. – P. 38-40. DOI: 10.35630/2199-885X/2020/10/2.11.
5. **Romanova, O.** The dynamics of lung histopathology in acute baclofen poisoning / O. Romanova, A. Golubev, A. Churilov, E. Barinov, T. Chochlova // **Archiv Euromedica.** – 2021. – Vol. 11. – N 4. – P. 65-67. DOI: 10.35630/2199-885X/2021/11/4.17.
6. **Романова, О.Л.** Характеристика общепатологических процессов в легких при отравлении баклофеном / О. Л. Романова, Д. В. Сундуков, М. А. Голубев, М. Л. Благодравов, А. В. Ершов // **Общая реаниматология.** – 2021. – Т. 17. – № 2. – С. 37-44. DOI: 10.15360/1813-9779-2021-2-37-44.
7. **Romanova, O.** The effects of baclofen on the respiratory system / O. Romanova, P. Dzhuvalyakov, E. Barinov, M. Kislov, A. Ershov // **Archiv EuroMedica.** – 2022. – Vol. 12. – N 3. DOI: 10.35630/2199-885X/2022/12/3.12.
8. **Romanova, O.** The quantitative characteristics of histopathological changes in lungs in acute baclofen poisoning / O. Romanova, M. Blagonravov, P. Dzhuvalyakov, E. Barinov, M. Kislov, A. Ershov // **Archiv Euromedica.** – 2022. – Vol. 12. – N 6. DOI: 10.35630/2022/12/6.11.
9. **Romanova, O.** Baclofen (fun drug) and ethanol combined poisoning in humans: A histopathology and morphometry model / O. L. Romanova, M. Chauhan, M. L. Blagonravov, M. A. Kislov, A. V. Ershov, K. N. Krupin // **Journal of Forensic and Legal Medicine.** – 2022. – Vol. 90. – P. 102373. DOI: 10.1016/j.jflm.2022.102373.
10. **Romanova, O. L.** The effect of the toxic dose of baclofen on selected parameters of the cardiovascular and respiratory systems / O. L. Romanova, M. L. Blagonravov, V. I. Torshin, P. G. Dzhuvalyakov, A. V. Ershov, M A Kislov, A. M. Magulaev // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2023. – Vol. 175. – N 6. – P. 777-780. DOI: 10.1007/s10517-023-05945-5.
11. **Романова, О. Л.** Динамика гистологических изменений в лёгких при отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом (экспериментальное исследование) / О. Л. Романова, М. Л. Благодравов, П. Г. Джувалыков, В. И. Торшин,

- А. В. Ершов, Е. Х. Баринов // **Общая реаниматология**. – 2023. – Т. 19. – № 5. – С. 53-58. DOI:10.15360/1813-9779-2023-5-2337.
12. Kalinicheva, M. A. Expression of BAX and BCL-2 in bronchial epithelium in rat lungs in baclofen and baclofen ethanol poisoning / M. A. Kalinicheva, **O. L. Romanova**, M. L. Blagonravov, V. I. Torshin, E. K. Barinov, S. P. Syatkin, G. I. Myandina, S. M. Chibisov, I. Z. Eremina, E. A. Demurov, T. Y. Zotova // **FEBS Open Bio**. – 2024. – Vol. 14. – Suppl. 2. – P. 437. DOI: 10.1002/2211-5463.13837.
13. **Романова, О. Л.** Оценка динамики некоторых показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем и гистологических изменений в лёгких при введении баклофена и его комбинации с этанолом / О. Л. Романова, М. Л. Благонравов, В. И. Торшин, П. Г. Джувалыков, Е. Х. Баринов, А. В. Ершов // **Судебная медицина**. – 2024. – Т. 10. – № 4. – С. 474-485. DOI: 10.17816/fm16139.
14. **Романова, О. Л.** Особенности повреждения лёгких при отравлении баклофеном / О. Л. Романова, М. Л. Благонравов, П. Г. Джувалыков, Е. Х. Баринов, А. В. Ершов, М. А. Кислов // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2024. – Т. 67. – № 1. – С. 29-33. DOI: 10.17116/sudmed20246701129.
15. **Романова, О. Л.** Оценка гистологических изменений легких и экспрессии Вах и Вcl-2 в бронхиальном эпителии, альвеолоцитах 1-го типа и нейтрофилах крыс при отравлении баклофеном / О. Л. Романова, М. Л. Благонравов, П. Г. Джувалыков, В. И. Торшин, Е. Х. Баринов, А. В. Ершов, М. А. Кислов // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2024. – Т. 67. – № 5. – С. 36-41. DOI: 10.17116/sudmed20246705136.
16. **Романова, О. Л.** Оценка выраженности экспрессии VEGF-A, SP-D и MUC-1 при отравлении баклофеном и его сочетанием с этанолом / О. Л. Романова, М. Л. Благонравов, П. Г. Джувалыков, В. И. Торшин, Е. Х. Баринов, Е. А. Лукьянова, М. А. Кислов // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2025. – Т. 68. – № 2. – С. 45-49. DOI: 10.17116/sudmed20256802145.
17. Zemtseva, Z. D. Evaluation of vegf-a, sp-d and muc-1 expression in baclofen poisoning and its combination with ethyl alcohol / Z. D. Zemtseva, S. Mosallanejad, **O. L. Romanova**, M. L. Blagonravov, V. I. Torshin, P. G. Dzhuvalyakov, E. K. Barinov, S. P. Syatkin, I. Z. Yeremina, E. M. Zheludova, G. I. Myandina // **FEBS Open Bio**. – 2025. – Vol. 15. – Suppl. 2. – P. 499-500. DOI: 10.1002/2211-5463.70071.

Список баз данных, зарегистрированных по результатам работы

18. **Романова О.Л.** Морфометрическая характеристика лёгких при отравлении баклофеном и его сочетанием с этиловым спиртом [Электронный ресурс] / О.Л. Романова, М.Л. Благонравов, В.И. Торшин, А.Е. Северин // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024623639; правообладатель: РУДН. – Оpubл. 20.08.2024, Бюл. № 8.
19. **Романова О.Л.** Экспрессия MUC-1, VEGF-A, SP-D в лёгких крыс после введения баклофена и его комбинации с этанолом [Электронный ресурс] / О.Л. Романова, М.Л. Благонравов, В.И. Торшин, А.Е. Северин // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024624142; правообладатель: РУДН. – Оpubл. 18.09.2024, Бюл. № 9.

20. **Романова О.Л.** Экспрессия Вах и Vcl-2 в лёгких крыс после введения баклофена и его комбинации с этанолом [Электронный ресурс] / О.Л. Романова, М.Л. Благодоров, В.И. Торшин, А.Е. Северин // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024624132; правообладатель: РУДН. – Оpubл. 17.09.2024, Бюл. № 9.
21. **Романова О.Л.** Динамика некоторых показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем при введении баклофена и его комбинации с этиловым спиртом [Электронный ресурс] / О.Л. Романова, М.Л. Благодоров, В.И. Торшин, А.Е. Северин // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025620966; правообладатель: РУДН. – Оpubл. 03.03.2025, Бюл. № 3.
22. **Романова О.Л.** Динамика доли ШИК-положительных лейкоцитов при введении баклофена и его комбинации с этанолом [Электронный ресурс] / О.Л. Романова, М.Л. Благодоров, В.И. Торшин, А.Е. Северин // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025620870; правообладатель: РУДН. – Оpubл. 24.02.2025, Бюл. № 3.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД диаст. – диастолическое артериальное давление
 АД пульс. – пульсовое артериальное давление
 АД сист. – систолическое артериальное давление
 АД ср. – среднее артериальное давление
 БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина II
 ГАГ –гликозаминогликаны
 ГАМК – гамма аминomásляная кислота
 иАПФ– ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
 ИВЛ – искусственная вентиляция лёгких
 ИГХ – иммуногистохимия
 ИГХ–исследование – иммуногистохимическое исследование ИЛ–
 интерлейкины
 ЖКТ – желудочно–кишечный тракт
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа
 ЛПС – липополисахариды
 МАП – межальвеолярные перегородки
 СМЭ – судебно-медицинская экспертиза
 ТЦА– трициклические антидепрессанты
 ФНО – фактор некроза опухоли
 ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких
 ЧДД – частота дыхательных движений
 ЧСС – частота сердечных сокращений
 ЦНС – центральная нервная система
 ЭР – эндоплазматический ретикулум
 AP-1 – activating protein-1 (активаторный белок-1)
 HIF – hypoxia induced factor (фактор, индуцированный гипоксией)

MUC – mucin (муцин)

SP-D – surfactant protein D (сурфактантный белок D)

TLR – Toll-like receptors (Toll-like рецепторы)

VEGF-A – vascular endothelial growth factor A (фактор роста эндотелия сосудов A)

БЛАГОДАРНОСТИ

- Торшину В.И. (д.б.н.) – за содействие в проведении исследований и поддержку в период написания диссертации;
- Джужалякову П.Г. (д.м.н.) – за содействие в проведении исследований и поддержку в период проведения морфометрического исследования;
- Бабиченко И.И. (д.м.н.) – за содействие в проведении иммуногистохимического исследования;
- Баринову Е.Х. (д.м.н.) – за помощь в подготовке публикаций и обмен опытом;
- Богомолу Д.В. (д.м.н.) – за помощь в проведении иммуногистохимического исследования и обмен опытом;
- Сундукову Д.В. (д.м.н.) – за помощь в подготовке дизайна исследования;
- Голубеву А.М. (д.м.н.) – за содействие в проведении исследований и поддержку в период проведения первой части гистологического исследования;
- Северину А.Е. (д.м.н.) – за обмен опытом и помощь в подготовке данных для регистрации в виде РИД;
- Сяткину С.П. (д.б.н.) – за помощь в подготовке публикаций;
- Ершову А.В. (д.м.н.) – за содействие в проведении исследования и помощь в статистической обработке полученных данных.

АННОТАЦИЯ

докторской диссертации О.Л. Романовой «Особенности и механизмы повреждения лёгких при отравлении баклофеном и его комбинацией с этанолом»

Диссертация посвящена исследованию закономерностей и механизмов развития морфофункциональных изменений в лёгких при отравлении атипичным миорелаксантом баклофеном и его комбинацией с этанолом. В ходе исследования было показано, что при введении баклофена и его комбинации с этанолом выявлены определённые изменения со стороны сердечно-сосудистой и дыхательной систем - снижалась сатурация, частота дыхательных движений. В лёгких экспериментальных крыс отмечался комплекс гистологических изменений, включавший в себя утолщение МАП, расширение альвеол, ателектазы и дистелектазы, чередующиеся с участками эмфиземы, а также изменения кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла. В группах, получавших сочетание баклофена и этанола, гистологические изменения более разнообразны и развиваются более быстрыми темпами. Наиболее выраженными эти изменения были через 4,5 часа после совместного введения баклофена и этанола. Большую роль в повреждении лёгочных

структур играет апоптоз, что подтверждается ростом экспрессии Bax и соотношения Bax/Bcl-2. В ходе эксперимента отмечался рост экспрессии MUC1, что свидетельствует об усилении мукоциллиарного клиренса, развитии воспалительного ответа и возможном начале фиброза. После введения баклофена и его комбинации с этанолом в лёгких крыс выявлен рост экспрессии VEGF-A, что говорит об усилении в них ангиогенеза. При введении баклофена и его комбинации с этанолом отмечается рост экспрессии SP-D, что может свидетельствовать о протекании репарационных процессов.

ABSTRACT

of the doctoral thesis by O.L. Romanova “Features and mechanisms of lung damage caused by poisoning with baclofen and its combination with ethanol”

The thesis is devoted to the study of patterns and mechanisms of morphofunctional changes development in the lungs during poisoning with the atypical muscle relaxant baclofen and its combination with ethanol. The study revealed that the administration of baclofen and its combination with ethanol causes certain changes in the cardiovascular and respiratory systems - decreased saturation and respiratory rate. A complex of histological changes was observed in the lungs of experimental rats, including thickening of the intraalveolar septi, dilation of the alveoli, atelectasis and distelectase, alternating with areas of emphysema, as well as changes in blood filling of the vessels of the microcirculatory bed. In the groups treated with a combination of baclofen and ethanol, the histological changes are more diverse and develop at a faster rate. These changes were most pronounced 4,5 hours after the combined administration of baclofen and ethanol. Apoptosis plays an important role in damage to lung structures, which is confirmed by an increase in Bax expression and the Bax/Bcl-2 ratio. During the experiment, an increase in MUC1 expression was found, indicating increased mucociliary clearance, the development of an inflammatory response, and the possible onset of fibrosis. After administration of baclofen and its combination with ethanol, an increase in VEGF-A expression was detected in rat lungs, indicating increased angiogenesis. When baclofen and its combination with ethanol are administered, there is an increase in SP-D expression, which may indicate the course of repair processes.