

Министерство здравоохранения Украины
Национальный фармацевтический университет
Проблемная лаборатория морфофункциональных исследований

«УТВЕРЖДАЮ»

Проектор с НИР НФаУ проф.
Коваленко С.М.

_____ 2009 г.
«_____» _____

ОТЧЕТ
ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И
ТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ВОДНОГО РАСТВОРА
ГИДРАТИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ (ВРГФ).

Харьков-2009

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

- 1 Руководитель зав. ПЛМД, зав. каф.
биологии, физиологии и анатомии
человека, проф., д.биол. наук Малоштан Л.М.
- 2 Доц., к. биол. наук Шаповал О.М.
- 3 Доц., к. фарм. наук Должикова О.В.
- 4 Асист., к. мед.наук Шаталова О.М.
- 5 Асист., к. фарм.наук Мудрик И.М.
- 6 Ст. лаб. Степанова К.О.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
1. Определение токсичности водного раствора гидратированного фуллерена C₆₀ (ВРГФ)	4
1.1. Определение острой токсичности ВРГФ	4
1.2. Изучение хронической токсичности ВРГФ.	8
1.2.1. Влияние ВРГФ при продолжительном применении на динамику массы тела, весовые коэффициенты внутренних органов и биохимические показатели крови крыс.	9
3. Изучение кардиопротекторного действия ВРГФ на модели доксорубициновой миокардиомиопатии у крыс	17
4. Изучение адаптогенного действия ВРГФ на модели принудительного плавания у крыс.	27
5. Изучение мембраностабилизирующих свойств ВРГФ по методу JAGER F.C.	36
6. Изучение противовоспалительного действия ВРГФ.	39
6.1. Исследование антиэкссудативного действия ВРГФ на модели карагенинового отека у крыс	44
6.2. Исследование антиэкссудативного действия ВРГФ на модели зимозанового отека у крыс.	45
7. Изучение противоязвенного действия ВРГФ на модели ацетилсалициловой язвы желудка.	50
8. Изучение влияния ВРГФ на процессы цитолиза, ПОЛ и антиоксидантной защиты у крыс в условиях субхронического поражения печени этанолом и тетрахлорметаном	61

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОГО РАСТВОРА ГИДРАТИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ (ВРГФ)

1.1. Определение острой токсичности ВРГФ

Наряду с характеристикой фармакологических свойств является обязательной также оценка степени токсического влияния ВРГФ на организм экспериментальных животных. Проведенные исследования по изучению безопасности действующего вещества – фуллерена C₆₀ - позволило определить некоторые характеристики ВРГФ [1].

Материалы и методы

Острую токсичность концентрированного ВРГФ, предоставленного для исследования заказчиком (с концентрацией фуллерена C₆₀ 1 мг/л) изучали по методу Пастушенко Г. В. на нелинейных половозрелых белых крысах обоих полов массой 180-220г при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном путях введения [1, 3]. Оценку токсичности проводили по общепринятой классификацией К.К. Сидорова [2].

На первом этапе исследования токсикологических характеристик ВРГФ определяли острую токсичность на белых нелинейных крысах обоих полов массой 180-220 г при внутрижелудочном введении. Животные были разделены на 4 группы: 1 и 2 группы самки, которым вводили ВРГФ единовременно и на протяжении одних суток; 3 и 4 группы самцы, которым вводили ВРГФ единовременно и на протяжении суток. В связи с тем, что концентрированный ВРГФ, предоставленный для исследования является жидкостью, которая содержит 1 мг/л действующего вещества, вводили его крысам в дозе 4 мл на животное (максимально допустимое количество введения жидкого вещества внутрижелудочно крысам массой приблизительно 200 г [1]) однократно и на протяжении суток через каждый час, всего 6 раз [1, 3].

Наблюдение за общим состоянием и поведением животных проводили на протяжении 14 суток. Учитывали внешнее состояние исследуемых животных, особенности поведения, интенсивность и характер движений, состояние меха и другие показатели, которые можно использовать для оценки токсического эффекта.

Результаты исследования.

Результаты эксперимента приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1

Определение острой токсичности концентрированного ВРГФ на крысах при внутрижелудочном введении (n=5)

Группа животных (крысы) Самцы ♂ самки ♀	Доза, мл/1 животн ому	Выжило	Погибло	Смертность
		Внутрижелудоч но ♂/♀	внутрижелудоч но ♂/♀	внутрижелудочн о ♂/♀
1/3	4	5/5	0/0	0/0
2/4	24	5/5	0/0	0/0

Исследования, проведенные на крысах, показали, что у животных первой и третьей исследовательских групп, которым внутрижелудочно вводили концентрированный ВРГФ однократно, состояние животных, поведение, аппетит, двигательная активность, состояние меха находились в норме, т.е. признаков интоксикации выявлено не было.

У животных второй и четвертой исследовательских групп, которым внутрижелудочно вводили концентрированный ВРГФ, на 4-й час наблюдали признаки угнетения локомоции, у некоторых животных – взъеживание меха. Указанные явления исчезали на следующие сутки. Других признаков интоксикации не наблюдали. Все животных выжили.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсичности концентрированного ВРГФ, предоставленного для исследования (1 мг/л фуллерена C₆₀) при введении 4 мл однократно и 24 мл на протяжении суток при внутрижелудочном введении.

Таким образом, определить ЛД₅₀ исследуемой субстанции при внутрижелудочном введении не удалось.

Для дальнейшего изучения острой токсичности концентрированного ВРГФ было избрано парентеральный (внутрибрюшинный) путь введения.

При внутрибрюшинном введении крысы были разделены на 2 группы: 1 группа - самцы, 2 группа - самки, которым вводили концентрированный

ВРГФ в дозе 5 мл на животное (максимально допустимое количество введения жидкого вещества внутривентриально крысам массой приблизительно 200 г [1]) одновременно.

Наблюдение за общим состоянием и поведением животных проводили на протяжении 14 суток. Учитывали внешнее состояние исследуемых животных, особенности поведения, интенсивность и характер движений, состояние меха и другие показатели, которые можно использовать для оценки токсического эффекта.

Результаты эксперимента приведены в таблице 1.2.

Таблица 1.2

Определение острой токсичности концентрированного ВРГФ на крысах при внутривентриальном введении, (n=5)

Группа животных (крысы)	Доза, мл/ 1 животному	Выжило внутривентриально	Погибло внутривентриально	Смертность внутривентриально
1 ♂	5	5	0	0
2 ♀	5	5	0	0

Одноразовое внутривентриальное введение крысам концентрированного ВРГФ не вызвало изменений во внешнем виде и поведении крыс на протяжении срока наблюдения, состояние животных отвечало начальному физиологическому, гибели животных не наблюдали.

Исследование показали, что при введении концентрированного ВРГФ крысам не вызвало признаков интоксикации и снижения двигательной активности. Ни одно животное при внутривентриальном (одноразовому и на протяжении суток) и внутривентриальном введении концентрированного ВРГФ не погибло. В конце срока наблюдения все крысы оставались подвижными, бодрыми, с прекрасным аппетитом, с блестящим мехом.

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что исследуемый концентрированный ВРГФ не вызвал гибели животных при внутривентриальном и пероральном путях введения. LD₅₀ установить не

удалось. Таким образом, концентрированный ВРГФ, предоставленный для исследования, относится к относительно безвредных веществ в соответствии с классификацией К. К. Сидорова [2].

Литература.

1. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. рек. / Под. ред. О.В. Стефанов - К.: Авиценна, 2001. - 528 с.
2. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения / К.К. Сидоров // Токсикология новых промышленных химических веществ. - Г.: Медицина, 1973. - Вып. 13. - С. 47-57.
3. Экспресс-метод определения среднесмертельных доз химических веществ / Г.В. Пастушенко, Л.Б. Марушный, А.А. Жуков и др. // Гигиена и санитария. - 1995. - № 6. - С. 46-48.

1.2. Изучение хронической токсичности ВРГФ.

Основную информацию о взаимодействии организма и вещества для большинства лечебных средств, которые исследуются, возможно, выявить лишь в хроническом или субхроническом эксперименте.

Материалы и методы.

Минимальную продолжительность введения лечебного средства в хроническом токсикологическом эксперименте определяли в зависимости от назначения и продолжительности его использования в клинической практике. Избранный путь введения лечебного средства экспериментальным животным также отвечал возможному средству использования в клинике (перорально).

Изучение общего токсического влияния изучали в динамике на протяжении 30 дней в соответствии с Методическими рекомендациями [3].

Опыты проведены на половозрелых крысах обоих полов весом 190 – 220 г [5].

На протяжении всего эксперимента животных содержали в одинаковых условиях вивария на полноценном водно-пищевом рационе.

О влиянии ВРГФ (с концентрацией фуллерена C_{60} 2×10^{-3} мг/л) на органы и системы при продолжительном применении судили по общему состоянию животных, динамикой массы тела, показателями сердечно-сосудистой системы, картиной периферической крови (количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, лейкоцитарной формуле,) функциональным состоянием ЦНС, печени, почек, весовых коэффициентов внутренних органов.

Морфологический состав крови и лейкоцитарную формулу животных исследовали по общепринятым методам клинического исследования [7,10].

О влиянии продолжительного действия ВРГФ на состояние печени у животных судили по содержанию: общего белка, креатинина, активности трансаминаз и глюкозы в сыворотке крови [2]. Для выявления возможных нарушений целостности мембран клеток печени и миокарда под влиянием ВРГФ исследовали активность аланинаминотрансферазы (Алат) и аспартатаминотрансферазы (Асат).

Учитывая то, что синтез факторов, которые обеспечивают сворачивание крови, осуществляется в печени, нами учитывалось время сворачивания крови как интегральный показатель гемокоагуляции [2].

Функцию поджелудочной железы оценивали с помощью уровня глюкозы в крови, который определяли по цветной реакцией с ортотолуидином (7, 10).

Функциональное состояние почек исследовали с помощью комплекса методов, которые разрешают оценить фильтрационную, реабсорбционную и азотовыделительную функции. В хроническом эксперименте учитывали диурез, содержание мочевины в моче [7].

По окончании периода исследований животных выводили из эксперимента методом эвтаназии и определяли вес внутренних органов: печени, почек сердца, селезенки, надпочечных желез.

1.2.1. Влияние ВРГФ при продолжительном применении на динамику массы тела и внутренних органов и биохимические показатели крови крыс.

Для исследования были созданы экспериментальные группы крыс самок и самцов с целью, проследить возможное токсичное влияние ВРГФ в зависимости от пола. Крысы были разделены на группы: 2 контрольные группы (самки и самцы), 2 группы (самки и самцы), которым применяли на протяжении 30 суток ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг.

Результаты наблюдения за общим состоянием и поведением животных показали, что они удовлетворительно переносили ежедневное применение раствора ВРГФ на протяжении одного месяца. Подвижность, потребность в пище и воде, внешний вид, реакция на внешние раздражители крыс исследовательских групп не отличалась от контрольных. Гибели животных не наблюдалось ни в одной группе.

Для оценки возможного токсичного влияния ВРГФ на организм крыс при продолжительном применении исследовали динамику массы тела и весовые коэффициенты внутренних органов (табл. 1.3-1.4).

Анализ указанных показателей свидетельствовал, что в период эксперимента при одинаковых условиях питания в группе животных женского пола отмеченный более выразительный рост массы тела под действием ВРГФ, чем у самок контрольной группы. Под влиянием ВРГФ было зафиксировано возможное увеличение массы надпочечных желез у самок в сравнении с контрольной группой в среднем в 1,3 раза (табл. 1.3). (О положительном влиянии на надпочечные железы при длительном применении ВРГФ см. дальше в разделе 4 «Изучение адаптогенного действия ВРГФ на модели принудительного плавания у крыс»)

Таблица 1.3

Влияние ВРГФ при продолжительном применении на массу внутренних органов

(М (m, n=5))

Показатели	Пол животных	Группа опыта	
		Контроль	ВРГФ через 30 суток применения
Масса печени, г	самки	5,56±0,43	6,63±0,39
	самцы	7,17±0,22	6,58±0,29
Масса почки, г	самки	1,29±0,07	1,36±0,07
	самцы	1,69±0,05	1,64±0,08
Масса селезенки, г	самки	0,57±0,06	0,63±0,03
	самцы	0,84±0,08	0,77±0,05
Масса сердца, г	самки	0,65±0,05	0,74±0,05
	самцы	0,85±0,05	0,79±0,05
Масса надпочечных желез, мг	самки	70,6±7,82	91,4±5,63
	самцы	55,0±5,03	50,2±4,34

Примечание.

* - стандартное отклонение относительно интактного контроля (p<0,05).

Однако у самцов под действием ВРГФ колебание в динамике массы тела, внутренних органов и в частности массы надпочечных желез, существенным образом не отличались от аналогичных показателей в контрольной группе.

Полученные данные позволяют предположить, что действие ВРГФ зависит от пола, которое возможно обусловлено его влиянием на половые гормоны. Поэтому в дальнейшем важно изучить влияние исследуемого ВРГФ на уровень половых гормонов в частности у самок и самцов

Таблица 1.4

Влияние ВРГФ при продолжительном применении на динамику массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Показатели	Пол животных	Группа опыта			
		Исходные данные		Данные через 30 суток	
		Контроль	ВРГФ	Контроль	ВРГФ
Масса тела, г	самки	158,0±5,15	178,0±6,04	168,00±3,74	217,0±7,35*
	самцы	232,0±8,0	216,0±6,21	253,0±9,95	270,0±5,47
Прирост массы тела к данным в начале опыта, г			самки	10,0±2,45	39,0±2,45
			самцы	38,0±3,73*	37,0±3,74

Примечание.

* - стандартное отклонение относительно интактного контроля ($p < 0,05$).

Целью дальнейших исследований возможного отрицательного влияния ВРГФ при продолжительном интрагастральном введении было изучение его влияния на состав периферической крови. Для этого исследовали в динамике такие гематологические показатели, как: общий гемоглобин, количество эритроцитов, лейкоцитов, также проводился подсчет лейкоцитарной формы.

В результате проведенных исследований установлено, что ВРГФ не вызывает статистически отклонений в количестве лейкоцитов (табл. 1.5), а также количества базофилов, эозинофилов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов в контрольных и исследовательских группах на протяжении всего периода наблюдений, как у самцов, так и у самок.

В исследовательских группах, которые получали ВРГФ, не наблюдалось отклонений в количестве эритроцитов и гемоглобина в сравнении с контролем и исходными данными.

Таблица 1.5

**Влияние ВРГФ на показатели периферической крови крыс при
продолжительном применении ($M \pm m$, $n=5$)**

Показатели	Пол животных	Группа опыта		
		Исходные данные	Контроль	ВРГФ
Время свертывания, мин	самки	141,60±2,93	141,2±3,39	146,40±3,20
	самцы	141,60±2,66	149,8±7,64	140,80±2,13
Эритроциты, $10^{12}/л$	самки	3,45±0,37	3,66±0,28	3,91±0,21
	самцы	3,50±0,14	3,78±0,16	3,67±0,26
Гемоглобин, г/л	самки	98,31±4,32	152,26±15,43	162,65±14,64
	самцы	126,99±5,39	169,69±5,34	162,07±9,88
Лейкоциты, $10^9/л$	самки	10,80±0,80	10,40±0,93	11,00±1,05
	самцы	10,20±0,97	10,60±0,68	10,0±0,71
Базофилы, %	самки	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	самцы	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Эозинофилы, %	самки	0,60±0,25	0,40±0,25	0,40±0,25
	самцы	0,60±0,25	0,60±0,25	0,20±0,20
Нейтрофилы Палочкоядерные, %	самки	4,80±0,58	4,80±0,37	5,0±0,45
	самцы	4,40±0,51	4,40±0,51	5,4±0,40
Нейтрофилы	самки	12,40±1,21	10,00±0,78	12,6±1,08

Сегментоядерные, %	самцы	10,80±1,36	10,20±1,16	11,8±1,49
Лимфоциты, %	самки	78,80±1,02	81,20±1,43	76,6±0,75
	самцы	80,80±1,08	80,60±1,50	78,4±2,06
Моноциты, %	самки	3,60±0,51	3,60±0,60	4,4±0,51
	самцы	3,406±0,75	4,20±0,58	4,2±0,58

Примечание.

* - стандартное отклонение относительно интактного контроля ($p < 0,05$).

Функциональное состояние печени крыс, которым применяли продолжительно ВРГФ, определяли с помощью изучения показателей, которые характеризуют ферментсинтетическую и белоксинтетическую функции печени. О ферментсинтетической функции печени судили по активности аланин- и аспаратаминотрансфераз.

Результаты исследований приведены в таблице 1.6.

Таблица 1.6

Влияние ВРГФ на биохимические показатели крови крыс при продолжительном применении 30 дней (М (m, n=5))

Показатели	Группа опыта	Пол	
		самцы	самки
Общий белок, г/л	Контроль	67,78±2,19	74,62±2,93
Альбумин, г/л		32,70±2,21	29,9±1,54
Глюкоза, ммоль/л		5,61±0,33	5,84±0,52
АсАТ, ммоль/ч мл		0,74±0,03	0,68±0,02
АлАТ, ммоль/ч мл		0,59±0,06	0,591±0,05
Общий белок, ммоль/л	Исходные данные	71,76±2,73	75,86±3,15
Альбумин, ммоль/л		30,20±0,77	28,93±1,40
Глюкоза, ммоль/л		5,33±0,36	5,69±0,35
АсАТ, ммоль/ч мл		0,68±0,03	0,73±0,02
АлАТ, ммоль/ч мл		0,56±0,03	0,52±0,05

Общий белок, ммоль/л		68,0±3,28	73,1±3,45
Альбумин, ммоль/л	ВРГФ	28,74±1,29	30,65±0,61
Глюкоза, ммоль/л	через 30 суток	5,03±0,19	5,4±0,26
АсАТ, ммоль/ч мл		0,71±0,03	0,75±0,03
АлАТ, ммоль/ч мл		0,49±0,04	0,53±0,05

Примечание.

* - стандартное отклонение относительно интактного контроля ($p < 0,05$).

Установлено, что ВРГФ в исследуемой дозе при продолжительном ежедневном применении крысам не вызывает токсичного влияния на ферментсинтетическую функцию печени: активность индикаторных ферментов - АлАТ и АсАТ (табл. 1.6) не превышала по показателям контрольные группы крыс и отвечала норме [8]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что ВРГФ в указанных дозах не влияет на ферментсинтетическую функцию печени и не проявляет цитолитического действия.

Возможные изменения в составе общего белка и альбумина в сыворотке крови отвечают нарушениям белоксинтетической функции, связанные с поражением паренхимы печени. Оценку влияния ВРГФ при продолжительном применении на белоксинтетическую функцию печени проводили по количеству общего белка и альбумину сыворотки крови.

Анализируя количественное содержимое общего белка и альбумина, в исследовательских группах выявлено статистически недостоверные расхождения в сравнении с интактным контролем (табл.1.6), это свидетельствует об отсутствии токсического влияния фуллерена на белоксинтетическую функцию печени.

Важное значение при исследовании функций печени имеет также показатель содержания сахара в крови. При исследовании этого показателя не выявлено статистически значимых расхождений в показателях контрольной и исследовательских групп, который свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния на углеводный обмен животных.

Влияние ВРГФ на показатели функционального состояния почек у крыс при продолжительном применении 30 дней ($M \pm m$, $n=5$)

Группа, доза	Пол	Суточный диурез Мл	pH мочи	Относительная плотность, г/см ³
Контроль	самцы	3,7±0,5	6,7±0,12	1,005±0,001
	самки	3,1±0,23	6,8±0,17	1,006±0,001
Исходные данные	самцы	3,9±0,3	6,8±0,17	1,009±0,001
	самки	4,1±0,3	6,6±0,21	1,011±0,003
ВРГФ	самцы	1,35±0,20	7,1±0,14	1,005±0,001
	самки	4,30±0,38	6,9±0,12	1,007±0,001

Примечание.

* - стандартное отклонение относительно интактного контроля ($p < 0,05$).

Для оценки возможного неблагоприятного влияния ВРГФ при продолжительном применении на функциональное состояние почек была использована схема, которая предусматривает определение в динамике уровня диуреза, показателей, которые характеризуют функциональное состояние азотовыделительной функции почек (уровень мочевины в моче и сыворотке крови и креатинин). Данные показатели характеризуют фильтрационную способность почек и реабсорбцию канальцами почек жидкости. Результаты эксперимента приведены в таблицах 1.7-1.8.

Из приведенных результатов видно, что ВРГФ у самцов и самок не вызвал статистически значимых отклонений в исследуемых показателях. Сахара, кетонов и белка в моче исследовательских животных выявлено не было.

Показатели функционального состояния почек у крыс после продолжительного применения ВРГФ (M (m , $n=5$))

Группа,	Пол	Мочевина	Мочевина	Креатинин
---------	-----	----------	----------	-----------

доза		мочи, ммоль/л	сыворотки крови, ммоль/л	сыворотки крови, мкмоль/л
Контроль	самцы	256,0±15,4	6,72±0,34	63,0±5,2
	самки	237,4±12,7	7,50±0,54	69,4±3,1
Исходные данные	самцы	250,2±11,6	8,37±0,42	67,5±6,3
	самки	226,3±9,8	7,37±0,46	71,8±4,9
ВРГФ	самцы	240,6±14,7	7,74±0,57	68,9±4,1
	самки	232,9±8,7	7,66±0,54	77,3±5,4

Примечание.

* - стандартное отклонение относительно интактного контроля (p<0,05).

Таким образом, анализируя все вышеприведенное, можно сделать вывод, что фуллерен при продолжительном применении не совершает вызывает токсичного влияния на жизненно важные органы и ткани экспериментальных крыс.

Список литературы

1. Гацура В.В. Сернов Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии // М. Медицина. - 2000.-325 с.
2. Громашевская Л.М. Биохимические исследования при болезнях печени // Журнал практ. врача, 1999. - №1. - С.24-28.
3. Доклинические исследования лекарственных средств (методические рекомендации) / Под ред. О.В.Стефанова. - К.: Авицена, 2001. - С. 74-97, 292-306.
4. Доцицин В.Л. Клиническая электрокардиография. - Г.: Медицинское информационное агентство, 1999. - 373с.
5. Западнюк М.П., Западню В.И., Захария Э.А. Лабораторные животные. Использование в эксперименте.- К.: Высш. школа, 1983.-878 с.

6. Лапач С.М., Чубенко А.В., Бабич П.М. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с применением Excel // К.: Морион. 2001.-408 с.
7. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. - Г.: Медицина, 1987. - С. 106-125, 122, 179-180.
8. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) / Трахтенберг И.М., Сова Р.Э., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Под ред. И.М Трахтенберга. - Г.: Медицина, 1991. - 208 с.
9. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. - 1979. - Т. 247. - № 6. - С. 1513-1516.
10. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. - Минск: Беларусь, 1982. - 366 с.
11. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных химических веществ. - Г.: Медицина, 1973. - 47 с.

3. Изучение кардиопротекторного действия ВРГФ на модели доксорубициновой кардиомиопатии у крыс

Из многочисленных литературных источников известно, что термином «кардиопротекторы» обозначают лечебные средства, которые оптимизируют работу и функцию сердца, как в нормальных условиях, так и при разных патологических состояниях, предупреждая действие разных повреждающих агентов [9]. Кардиопротекторная активность - это интегральный показатель, который отображает функциональное состояние миокарда, клеточный метаболизм, ионный гомеостаз, возможные структурно-функциональные изменения мембран кардиомиоцитов.

Многолетний опыт свидетельствует, что при использовании противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда - доксорубицина, особенно при превышении его кумулятивной дозы больше чем 450 – 550 мг/кг, наблюдается развитие заболевания, идентичного по клинической и морфологической картине дилатационной кардиомиопатии [2].

В механизме специфического кардиотоксического действия доксорубицина отдельно выделяют угнетение синтеза нуклеиновых кислот и белка за счет способности ингибировать топоизомеразу II и взаимодействием с молекулой ДНК [3, 12]. Изучение патогенеза доксорубициновой кардиомиопатии указывает еще на две основных гипотезы относительно причин поражения миокарда. Основой первой гипотезы есть повышенное сродство доксорубицина к кардиолипину - одного из самых распространенных фосфолипидов мембран клеток сердечной мышцы, особенно ядра и митохондрий [13]. Основой второй - способность доксорубицина непосредственно вмешиваться в окислительный метаболизм миокарда с ускорением процесса генерации активных метаболитов кислорода и повреждениями мембран кардиомиоцитов [3, 5, 7]. Именно поэтому превентивная защита миокарда от разрушительного влияния токсичных соединений, предусматривает применение препаратов с протекторным действием на миокард.

Материалы и методы.

Доксорубициновую кардиомиопатию (ДКМП) вызвали у белых нелинейных крыс двукратным с интервалом 3 дня внутривенным (в хвостовую вену) введением доксорубицина производства КМП (Украина) в дозе 7 мг/кг. В эксперименте было использовано 36 белых нелинейных крыс. Кардиомиопатия развивалась на 4-те сутки. Исследуемый ВРГФ вводили в дозе 1,8 мл/кг внутривенно на протяжении 7 дней и 5 дней после введения доксорубицина [5].

Группа животных интактного контроля получала эквивалентный объем воды, который вводили внутривенно с помощью канюли. На 6-те сутки эксперимента в группах животных учитывали процент выживания,

регистрировали электрокардиограмму, для чего крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением 1% раствора барбамилла в дозе 0,8 мл/100 мг массы тела.

В качестве препарата сравнения был избраный кверцетин [4, 5]. Референс-препарат вводили внутривентрикулярно в дозе 5 мг/кг. В экспериментальных исследованиях использовали Кверцетин в виде гранул с пектином яблочным (БХФЗ, Киев). По химическому строению Кверцетин это-3',4',3,5, 7-пентаоксифлавонон. Это один из наиболее мощных антиоксидантов. Он обнаруживает мембраностабилизирующее действие, предупреждает сдвиг окислительного гомеостаза организма.

Дозы исследуемых веществ для крыс рассчитывались с использованием коэффициента видовой чувствительности по Ю.Р. Риболовлевой на основании среднесуточной дозы для человека [10].

Выявление метаболических и дистрофических нарушений в ткани миокарда осуществляли после эвтаназии по активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и креатинфосфокиназы (КФК) с использованием диагностических тест-наборов «Lachema». Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови, как показатель цитолиза кардиомиоцитов, определяли методом Райтмана [6] с помощью тест-наборов фирмы «Lachema» (Чехия).

Оценку интенсивности перекисных катаболических преобразований структурных липидов в организме белых крыс при доксорубициновой кардиомиопатии осуществляли на основании биохимического анализа крови и гомогената сердца. В крови и ткани сердца определяли содержащее диеновых конъюгатов (ДК), восстановленного глутатиона (ВГ) и малонового диальдегида (МДА) [11].

Статистическая обработка результатов проведенных исследований осуществлялась с использованием методов вариационной статистики с помощью коэффициента Стьюдента (t), X^2 и непараметрическими методами математической статистики по Уайту, Фишеру и Вилкоксоу-Манн-Уитни

(критерий U). Расчеты осуществляли с помощью специальной программы Statistica 5.0 for Windows на ПК Pentium 2000.

Результаты исследования.

Данные относительно изменения массы тела и внутренних органов приведенные в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Влияние ВРГФ на массу тела и внутренних органов крыс в условиях доксорубициновой кардиомиопатии ($M \pm m$), $n=8$.

Условия опытов	Потеря массы тела крыс, г	Масса внутренних органов, г			
		Печень	Сердце	Почки	Селезенка
Интактный контроль	+ 8,3±0,3	7,20±0,22	0,60±0,02	1,41±0,05	0,60±0,03
Нелеченная ДКМП	-56,5±2,4*	6,82±0,39	0,70±0,03*	1,50±0,09	0,19±0,02*
ДКМП, леченная ВРГФ	-38,7±1,9 */**/**	7,06±0,25	0,62±0,01 **/**	1,34±0,04	0,28±0,03 */**/**
ДКМП, Леченная Кверцетином	-53,6±2,6*	6,91±0,34	0,66±0,01*	1,59±0,06	0,18±0,014*

Примечание.

* - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю,

** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к нелеченной ДКМП,

*** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к данным животных, которых лечили Кверцетином.

Проведенное исследование показало, что после введения доксорубицина на 6-е сутки эксперимента в группе животных контрольной патологии (ДКМП без лечения) наблюдалась гибель 2 животных. Лечебно-профилактическое введение исследователями крысам ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг прежде всего повысило выживание крыс до 87,5%, в то время как использования Кверцетина не предотвращало высокую летальность животных в исследовательской группе (25%, как и в группе нелеченной ДКМП).

Изменения дистрофического характера, спровоцированные использованием доксорубина, сопровождались значительным снижением массы тела нелеченных крыс в сравнении с входными данными (см. таблицу 1). За тот же время крысы, которые получали ВРГФ, похудели менее выражено, а масса тела крыс, которые получали референс-препарат, уменьшалась аналогично изменениям группы нелеченных животных.

Поражение мембранного аппарата кардиомиоцитов вследствие нарушений клеточного метаболизма, структуры ДНК, инициации прооксидантных механизмов под влиянием доксорубина обуславливало нарушение сократительной функции миокарда, которое регистрировалось с помощью ЭКГ-обследования. (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Влияние ВРГФ на показатели ЭКГ крыс на фоне доксорубинового поражения сердечной мышцы.

Показатель	Условия опытов			
	Интактный контроль	Нелеченная ДКМП	ДКМП, леченная ВРГФ	ДКМП, леченная кверцетином
ЧСС, уд/мин	420,1±24,6	276±10,5*	398,3±14,9**	300,7±23,7*
PQ, с	0,040±0,002	0,053±0,004*	0,043±0,002**	0,048±0,004*
QRS, с	0,020±0,002	0,014±0,004*	0,016±0,002	0,018±0,002
Q-T, с	0,062±0,004	0,086±0,009*	0,064±0,006	0,076±0,004*
R, мВ	0,66±0,07	0,45±0,05*	0,64±0,06	0,49±0,05
P, мВ	0,10±0,02	0,15±0,02	0,10±0,02	0,10±0,02
T, мВ	0,15±0,01	0,21±0,02*	0,15±0,02	0,18±0,04
Смещение ST от изолинии, мм	0	2,0±0,6	0,4±0,1**	0,6±0,2**

Примечание.

* - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактного контроля,

** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к нелеченной ДКМП.

Кардиотоксичность доксорубина у крыс группы контрольной патологии оказалась уменьшением ЧСС сравнительно с аналогичным показателем интактного контроля, т.е. носила характер брадиаритмии.

Об истощении функциональной дееспособности сердечной мышцы свидетельствовали также возможное удлинение продолжительности интервала PQ, повышение амплитуды зубцов T и R, удлинение продолжительности желудочкового комплекса (Q-T), возможное уменьшение окончательного фрагмента желудочного комплекса - сегмента ST и низкоамплитудный комплекс QRS (низкий зубец R) (см. табл. 3.2).

Для выбранной модели выявлено, что исследуемый ВРГФ вызывает некоторые изменения функциональной активности сердца, которое зарегистрировано с помощью ЭКГ. Применение ВРГФ в лечебно-профилактическом режиме выражалась в нормализацией показателя ЧСС, значение которого почти достигло границ интактных животных. Достоверно к контрольной патологии снижались амплитуды зубцов P и T, сокращалась продолжительность интервала PQ (см. таблицу 3.2). Заметно, хотя и не достоверно, восстанавливались ЭКГ-показатели, которые характеризуют функциональное состояние желудочкового аппарата сердца - комплекс QRS и интервал Q-T, амплитуда зубца R.

При ЭКГ-обследовании крыс, которые получали кверцетин, регистрировался брадиаритмический характер ЧСС практически как у нелеченных животных и с достоверным отклонением от значения у интактных животных (табл. 3.2). Другие ЭКГ-показатели имели направленность к значениям интактного контроля с недостоверным отклонением от значений для контрольной патологии.

Переориентация окислительного метаболизма в миокарде на анаэробные пути вследствие интоксикации и поражения сердечной мышцы доксорубином отображается повышением активности КФК и гиперферментемией АсАТ в сыворотке крови крыс, которая наблюдается у животных группы контрольной патологии (табл. 3.3). Введение доксорубина вызывает кардиодистрофические изменения, которые

характеризуются резким увеличением активности креатинфосфокиназы (КФК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сравнении с показателями интактных животных. Гиперферментемию АсАТ можно расценивать как проявление кардиомиоцитолита, а также компенсаторного синтеза указанного ключевого фермента реакции переаминирования, необходимой для восстановления фонда заменимых аминокислот в условиях белковой дистрофии.

Применение ВРГФ способствует сохранению активности КФК и ЛДГ практически на уровне интактного контроля. Референс-препарат также способствует снижению активности АсАТ и КФК, хотя действие ВРГФ на указанные показатели более выраженное.

Таблица 3.3

Влияние ВРГФ на ферментативные показатели сыворотки крови крыс на модели доксорубициновой кардиомиопатии

Условия опытов	Активность ферментов		
	КФК, мккат/л	ЛДГ, мкмоль/л	Асат, Кмоль/л
Интактный контроль	0,42± 0,03	7,1±0,6	0,64±0,034
Нелеченная ДКМП	0,92±0,09*	11,2±1,2*	1,36±0,026*
ДКМП, леченная ВРГФ	0,54±0,04**/**	7,4±0,4**	0,96±0,03**/**
ДКМП, леченная кверцетином	0,61±0,05**/**	8,3±0,5	1,12±0,027*

Примечание. * - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю, ** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к нелеченная ДКМП, *** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к животным, которых лечили кверцетином.

Об интенсификации свободно радикального превращения мембранных липидов кардиомиоцитов в условиях модельной патологии свидетельствует достоверный рост содержания ДК и МДА как в сыворотке крови, так и в гомогенате миокарда (табл. 3.4). Об интенсификации свободно радикального

превращения мембранных липидов кардиомиоцитов свидетельствует высокое содержимое МДА и ДК, как в гомогенате миокарда, так и в сыворотке крови нелеченных крыс. На фоне применения ВРГФ было зарегистрировано снижение уровня МДА, ВГ и ДК в гомогенате сердечной мышце и в сыворотке крови.

Со стороны показателей антиоксидантной системы отмечался рост концентрации ВГ в крови, а в гомогенате миокарда содержание ВГ, наоборот, достоверно уменьшалось в сравнении со значениями интактных животных, что отображает истощенность глутатионовой защиты на уровне органа. Под действием ВРГФ содержание ВГ в контрольной патологии достоверно достигало значений в интактной группе: в крови и в гомогенате миокарда, при этом активность ВРГФ была на уровне референс-препарата.

Таблица 3.4

Влияние ВРГФ на состояние ПОЛ/АОС при доксорубициновой кардиомиопатии

Показатель	Интактный контроль	Нелеченная ДКМП	ДКМП, леченная ВРГФ	ДКМП, леченная кверцетином
	<i>Сыворотка крови</i>			
МДА, мкмоль/л	2,0±0,12	5,4±0,26*	3,13±0,23**	4,01±0,20*
ДК, мкмоль/л	1,4±0,01	2,0±0,02*	1,8±0,01	1,9±0,02
ВГ мг%	16,2±1,2*	36,9±2,3**	21,4±1,8**	27,7 ±2,2*
<i>Гомогенат сердца</i>				
МДА, мкмоль/г	34,7±1,25	160,4±4,4*	130,4±4,9**	120,2±7,0**
ДК, мкмоль/г	3,4±0,5	12,3±0,74*	44,4±1,7**	36,1±1,62**
ВГ мг%	70,41±12,8*	35,2±6,41*	74,2±10,5**	77,8±11,6

Примечание. * - p(0,05) отклонение достоверно по отношению к интактному контролю, ** p(0,05) отклонение достоверно по отношению к нелеченной ДКМП.

Таким образом, экспериментально было установлено, что исследуемый ВРГФ сдерживает формирование доксорубициновой интоксикации миокарда у белых крыс, оказывая выраженное нормализующее действие на

функциональное состояние сердечной мышцы, не уступая по эффекту действия кверцетину, а по некоторым показателям даже превышая его. При этом общая доза фуллерена C_{60} , данная в виде ВРГФ, была в $1,2 \times 10^5$ раз меньше, чем общая доза кверцетина. Корректирующее действие исследуемого средства проявилось в нормализации электрокардиографических и наиболее характерных для данной патологии биохимических показателей.

Описанные изменения свидетельствуют о кардиопротекторных свойствах ВРГФ. Учитывая механизмы доксорубицинового поражения миокарда и динамику изменений показателей системы пероксидного окисления липидов/антиокислительной системы (системы ПОЛ/АОС) под действием ВРГФ на фоне экспериментальной патологии, можно предположить, что терапевтическая эффективность исследуемого средства для выбранной модели предопределяется прямой зависимостью выраженности кардиопротекторного действия от силы антиоксидантного эффекта. Возможно, что благодаря именно указанным механизмам реализуется способность ВРГФ предупреждать сдвиг окислительного метаболизма и обеспечивать целостность и функциональную способность кардиомиоцитов.

Литература:

1. Балыкова Л.А. Экспериментально-клиническое исследование эффективности метаболической терапии нарушений ритма сердца: Автореф. дисс. докт. мед. наук.- Казань..- 1999.
2. Василенко В.Х., Фельдман С.Б., Хитров Н.В. Миокардиодистрофия. - Г.: Медицина. - 1989. -272 с.
3. Ватутин Н.Т., Калинкина Н.В., Кетинг Э.В. Антрациклиновая кардиомиопатия. Донецк: Донгиии, 2001
4. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН.- Г., 1998.- №7.- С.43-51.
5. Деримедведь Л.В. Антиоксиданты в кардиологии: характеристика наиболее применяемых средств // Провизор.-1998.-№13.-С.42.

6. Дощицин В.Л. Клиническая электрокардиография. - Г.: Медицинское информационное агентство, 1999. - 373с.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. - Г.: Медпресс-информ, 2004. - 920 с.
8. Капелька В.И., Попович М.И. Метаболические и функциональные основы экспериментальной кардиомиопатии. - Кишнев: «Штиинца», 1990. - 22с.
9. Капелька В.И. Функциональные и структурные изменения миокарда в ранней стадии действия адриамицина / В.И. Капелька, В.Л. Лакомкин, В.Г. Цыпленкова // Кардиологический вестник. - 2006. - Т.1, № 2. - С.182.
10. Кардиопротекторы - клинико-фармакологические аспекты / И.С. Чекман, Н.А. Горчакова, С.Б. Французова, В.О. Минцер // Украинская медицинская газета. - 2003 - № 6 (38). - С. 18-25.
11. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. - 1979. - Т. 247. - № 6. - С. 1513-1516.
12. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. - Г. : Медицина, 1977. - С.63-64, 66-68.
13. Dudnakova T.V. Alterations in myocardial cytoskeleton and regulatory protein expression following a single doxorubicin injection / T.V. Dudnakova, V.L. Lakomkin, V.G. Tsyplenkova // J. Cardiovasc. Pharmacol. - 2003. - Vol.41, №5. - P.789-794.
14. Wallace K.B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy / K.B. Wallace // Pharmacol. Toxicol. - 2003. - Vol.93, №3. - P.105-115.
15. Wold L.E. Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism / L.E. Wold, N.S. Aberle, J. Ren // Cancer Detect. Prev. - 2005. - Vol.29, №3. - P.294-299.

4. Изучение адаптогенного действия ВРГФ на модели принудительного плавания у крыс

Резкое снижение адаптационных возможностей и функциональных резервов - это реальность современного состояния организма человека. Экологический прессинг, чрезвычайно осложненный социум, психоэмоциональные перенапряжения являются главными в перечне факторов риска состояния здоровья.

Для большинства реально существующих комбинаций патогенетических факторов результат продолжительного влияния на организм неизвестный, и потому усложняется его профилактика. В связи с этим, одним из перспективных направлений профилактики заболеваний за счет повышения резистентности организма - использование адаптогенов, номенклатура которых в Украине довольно ограничена.

К группе адаптогенов относят фармакологические средства, которые ускоряют и улучшают адаптацию организма к разным факторам внешней среды [13]. Действуют они не специфично, но обеспечивают выраженные регуляторные свойства, которые оказывает содействие уменьшению утомляемости, повышению трудоспособности [3, 5, 14].

Материалы и методы.

Определение адаптогенного действия ВРГФ проводили на модели принудительного плавания с грузом [13]. Плавание животных используется в фармакологических исследованиях как модель мышечной работы. Под влиянием систематической мышечной деятельности в скелетных мышцах повышается чувствительность специфических белков-рецепторов органов-мишеней к метаболическому действию собственных гормонов, активируется синтез полиаминов, повышается уровень белков, которые связывают жирные кислоты для более эффективного энергообеспечения [4, 5, 12]. Таким образом, кратковременные, адекватные по интенсивности, физические нагрузки есть физиологическим анаболическим стимулом. В условиях мышечной работы при использовании анаболических средств быстрее

изменяется направленность метаболизма, повышается синтез протеинов, рост мышц, общая масса тела и внутренних органов [8].

В эксперименте использовали половозрелых белых крыс самцов с исходной массой 150-170 г. Всех животных к началу эксперимента, а также каждый раз перед процедурой плавания взвешивали, с учетом этих данных рассчитывали вес груза (7,5 % от массы тела животных). Нагрузка плаванием осуществлялась в ванне с толщиной слоя воды не меньше 60 см, при термонеutralной температуре воды $+32^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Груз прикрепляли к хвосту животных с помощью эластичного резинового кольца. Наблюдение проводили до полного устания (критерием которого было 10-ти секундное пребывание крысы под водой). На этапе формирования групп проводили адаптацию животных к плаванию на протяжении 3-х суток и отбирали крыс, которые способны плавать с соответствующим грузом. По итогам отбора были сформированы 4 группы (по 8 крыс в каждой): 1-а группа – контроль (интактные животные, которых без тренировки принуждали плавать на 15, 30 и 45 день исследования), 2 – животные на фоне принужденной тренировки плаванием, 3 – животные на фоне тренировки плаванием, которым вводили исследуемый ВРГФ, 4 – животные, которым на фоне тренировки плаванием, вводили препарат сравнения – Апилак.

ВРГФ вводили внутрижелудочно в дозе 1,8 мл/кг каждый день однократно на протяжении 45 дней. Референс-препарат Апилак вводили по аналогичной схеме в дозе 1,8 мг/кг. Апилак относится к группе препаратов на основе продуктов пчеловодства, которые влияют на метаболические процессы. Его используют с целью повышения трудоспособности, для коррекции дистрофических изменений.

Оценку физической выносливости проводили в динамике по способности снижать время утомления. Данные регистрировали в начале исследования (исходные данные) и через 15, 30 и 45 дней.

На фоне использования ВРГФ оценивали массу тела, внутренних органов, содержимое общего белка в мышцах (сердечной и икроножной), содержимое мочевины в крови и моче исследуемых животных, а также

глюкозы в сыворотке крови. Биохимические показатели крови и мочи определяли с помощью диагностических наборов [6]. Изучение содержимого глюкозы осуществляли глюкозооксидантным методом.

Все исследуемые показатели сравнивали с аналогичными показателями интактных животных, которых содержали в стандартных условиях вивария.

Результаты исследования.

Данные по влиянию ВРГФ на массу тела крыс на фоне принудительной тренировки их плаванием приведенные в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Влияние 45-ти суточного внутрижелудочного введения ВРГФ на массу тела крыс на фоне принудительного плавания с грузом ($M \pm m$), $n=8$

Условия опытов	Масса тела, г		Прирост массы тела к данным в начале опыту, г
	в начале опыта	По окончанию	
Контроль	166,0±2,60	200,0±2,50	34,0
Тренировка плаванием	161,4±2,94	216,7±5,50*	55,3
Плавание + ВРГФ	163,4±2,20	221,0±3,40*	57,6
Плавание + апилак	157,8±3,2	209,0±4,20	51,2

*- $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю

Как видно из табл. 4.1, инициированное плавание у крыс приводит к достоверному увеличению массы тела. Это согласовывается с литературными данными, что адекватные физические нагрузки есть анаболическими стимулами, которые приводят к ускорению белоксинтетических процессов в организме, которые со временем выражаются в повышении трудоспособности и выносливости [9, 12, 14]. Интрагастральное введение ВРГФ на фоне принудительного плавания также оказывает содействие увеличению массы тела, но недостоверному в сравнении с данными животных, которые были тренированы только плаванием.

Анализ массы внутренних органов крыс на фоне принудительного плавания с грузом показал, что массы печени, сердца и почек во всех исследовательских группах достоверно не отличаются от данных контроля (таблица 4.2). Учитывая, что плавание приводит к более выраженному приросту массы тела, чем у интактных животных, а также приведенные данные со стороны массы внутренних органов, можно предположить, что рост организма происходит преимущественно за счет мышечной ткани. Именно мышцы в данной модели подвергаются действию напряжения со стороны нагрузки плаванием.

Следует отметить, что у крыс на 45-и дневной тренировки плаванием отмечен адаптивный рост массы надпочечных желез, который может свидетельствовать о стрессорном напряжении организма долгодействующими, возможно, неадекватными физическими нагрузками.

Таблица 4.2

Влияние 45-ми суточного внутрижелудочного введения ВРГФ на массу внутренних органов крыс на фоне принудительного плавания с грузом (M±m), n=8

Условия опытов	Абсолютная масса внутренних органов, г			
	Печень	Сердце	Нырки	Надпочечные железы
Контроль	5,36±0,09	0,522±0,011	0,615±0,009	0,702±0,003
Тренировка плаванием	5,40±0,15	0,524±0,012	0,608±0,019	0,730±0,004*
Плавание + ВРГФ	5,43±0,12	0,523±0,014	0,595±0,013	0,696±0,002
Плавание + апилак	5,42±0,08*	0,511±0,012*	0,620±0,014*	0,715±0,004*

*- $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю

Использование ВРГФ сдерживает стрессорное напряжение при физической нагрузке и предупреждает развитие гипертрофии надпочечных желез (их масса достоверно не отличается от данных интактного контроля). В

этот же время, применение референс–препарата апилак проявляется менее выраженный стресспротекторный эффект на надпочечные железы.

Постепенное повышение активности белоксинтетических процессов, которые выражаются в росте общего белка во внутренних органах, могут сопровождаться повышением физических возможностей организма [11].

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что физическая нагрузка приводит к активации метаболических процессов в организме. Использование исследуемого ВРГФ оказывает содействие повышению содержания общего белка в сердечной и икроножных мышцах, не уступая препарату сравнения апилак (таблица 4.3).

Вероятно, ВРГФ способен регулировать интенсивность внутриклеточного метаболизма мышц в период их функциональной активности, оптимизируя условия как для выполнения самой работы, так и для пластических процессов в восстановительном периоде [14].

Таблица 4.3

Влияние ВРГФ на содержание общего белка в тканях крыс на фоне принудительного плавания с грузом ($M \pm m$), $n=8$

Условия опытов	Содержимое общего белка, мг/100мг	
	Икроножная мышца	Сердечная мышца
Контроль	16,5 ± 0,40	16,2 ± 0,6
Тренировка плаванием	17,8 ± 0,40	17,7 ± 0,4
Плавание + ВРГФ	18,0 ± 1,10*/**	18,2 ± 0,8*/**
Плавание + апилак	18,1 ± 0,6*/**	18,1 ± 0,3*/**

Примечание.

* - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю

** - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению данных группы на фоне плавания.

Изменения со стороны показателей общего белка в мышцах свидетельствует в пользу формирования структурного следа, который может обеспечивать стойкую адаптацию к возможному стрессорному фактору.

Результаты полученных данных (таблица 4.4) свидетельствуют, что на фоне тренировки плаванием физическая выносливость крыс увеличивалась: на 15-е сутки в 1,78 раза, на 30-е сутки в 2,84 раза и на 45-е сутки в 2,9 раза.

Использование ВРГФ оказывало содействие более выраженному увеличению физической выносливости животных на фоне принудительного плавания. Так на 15-е сутки эксперимента исследуемый показатель превышал данные животных на фоне лишь тренировки плаванием на 15-й день эксперимента на 20,2 %, на 30-й день на 21,0% и 45-й день на 31,4 %.

Таблица 4.4

Влияние ВРГФ на физическую выносливость крыс на модели принудительного плавания с грузом ($M \pm m$) $n=8$

Условия опытов	Входные данные, мин.	Физическая выносливость, мин.		
		15-й день	30-й день	45-й день
Контроль	5,1±0,2	4,7± 0,3	4,5±0,5	4,8 ± 0,7
Тренировка плаванием	4,4±0,1	8,4±0,4*	12,8±1,3*	14,0±0,5*
Плавание + ВРГФ	4,6±0,3	10,1±0,7*	15,5 ± 0,9	18,4 ± 2,6*
Плавание + апилак	5,0±0,3	9,8 ± 0,5*	14,7± 2,1*	16,5 ± 1,8*

Примечание.

* - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю,

** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению данных группы с препаратом сравнения.

Следует отметить, что исследуемый ВРГФ по влиянию на физическую выносливость крыс не уступал препарату сравнения апилак, превышая его действие приблизительно на 13,5 % лишь на 45-й день исследования.

Таким образом, можно указать, что ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг достоверно увеличивая время физической выносливости, проявляет адаптогенную активность.

Известно, что азот, который образовывается в результате дезамирования аминокислот, выводится из организма, благодаря циклу

мочевины. Адаптогенное действие препаратов может реализоваться благодаря формированию «структурного следа» со стороны показателей белкового обмена и, в частности, отображаться изменениями со стороны функционального состояния почек.

Возможное повышение белоксинтетических процессов проявляется уменьшением содержащего мочевины в крови и моче, которая свидетельствует о ретенции азота в тканях. Дистрофические процессы, которые имеют место под влиянием повреждающих агентов, наоборот, сопровождаются увеличением содержания мочевины в моче и в сыворотке крови исследуемых животных.

Таблица 4.5

Влияние ВРГФ на содержание мочевины в крови и моче крыс на модели принудительного плавания с грузом ($M \pm m$), $n=8$

Условия опытов	Содержимое мочевины в сыворотке крови, ммоль/л	Содержимое мочевины в моче, ммоль/л
Интактный контроль	3,96±0,19	45,8±6,3
Тренировка плаванием	4,14±0,20	51,8±5,9
Плавание + ВРГФ	3,87±0,21	43,6±6,1
Плавание + апилак	4,28±0,25	50,0±4,3

Примечание.

*- $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к интактному контролю,

** $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению данных группы на фоне плавания.

Дополнительное определение содержащего мочевины в моче и крови на фоне инициированного плавания у крыс не показало достоверных изменений со стороны данного показателя.

Таблица 4.6

Содержание глюкозы в крови здоровых крыс под влиянием исследуемых веществ после нагрузки плаванием ($M \pm m$) $n=8$

Условия опыта	Уровень глюкозы в крови, ммоль/л			
	Начало исследования	15-й день	30-й день	45-й день
Интактный контроль	5,53±0,12	5,64±0,21	5,42±0,19	5,21±0,14
Тренировка плаванием	5,40±0,13	4,39±0,19	5,69±0,20	6,09±0,20*
Плавание + ВРГФ	5,50±0,15	5,82±0,15	5,37±0,16	5,30±0,14
Плавание + апилак	5,2±0,11	5,35±0,11	5,94±0,15*	6,12±0,12*

Примечание. * - $p \leq 0,05$ отклонение достоверно по отношению к контролю.

Основным источником энергии в организме при мышечной деятельности являются углеводы, а гипогликемия, как и низкий уровень стероидных гормонов, значительно снижает интенсивность сокращения скелетных мышц. В связи с этим нами определялся уровень глюкозы крови у экспериментальных животных.

Приведенные в таблице 4.6 данные свидетельствуют, что в процессе нагрузки плаванием у крыс экспериментальных групп изменялось содержание глюкозы крови. В то же время у животных из группы интактного контроля достоверных изменений этого показателя не было зарегистрировано. Следует отметить, что повышение содержания глюкозы в крови в условиях физических нагрузок не выходило за пределы физиологической нормы.

По результатам экспериментальных данных выявлено, что период интенсивных мышечных нагрузок у крыс под влиянием плавания проявляется поначалу снижением, а после постепенным увеличением уровня глюкозы (от $5,40 \pm 0,13$ до $6,09 \pm 0,20$ на 45 день эксперимента).

Нагрузка плаванием на фоне введения ВРГФ способствовала сохранению содержания глюкозы на уровне интактного контроля на протяжении всего опыта. В сравнении с данными группы животных, которых лишь тренировали плаванием, отмечено некоторое снижение содержания уровня глюкозы крови особенно на 30-й и 45 день эксперимента. Препарат

сравнения апилак не влиял на уровень глюкозы, о чем свидетельствуют данные, которые не отличаются от данных на фоне нагрузки лишь плаванием. Указанные изменения со стороны содержания глюкозы крови могут объясняться активацией захвата глюкозы тканями (в том числе и работающими мышцами) в присутствии веществ с адаптогенным действием.

В заключение, следует отметить, что общая доза фуллерена C_{60} , предоставленная в виде ВРГФ, была в $4,5 \times 10^4$ раз меньше, чем общая доза Апилака.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что в использованной модели исследуемый ВРГФ проявляет адаптогенное действие. Спектр приведенных результатов свидетельствует о многовекторности действия изучаемого средства благодаря чему реализуется его мягкое нормализующее, возможно протекторное, действие на функции организма.

Литература:

1. Алексеева С.Н. Влияние адаптогенов на иммунную и кроветворную системы в условиях рационального и цитостатического воздействия: автореф. дисс. канд. - Новосибирск, 1996. - 1996. - 16 с.
2. Борисова И.Г., Сейфулла Р.Д., Журавлев А.И. Действие антиоксидантов на физическую работоспособность и перекисное окисление липидов в организме // Фармакология и токсикология, 1989. - № 4. - С. 89-92.
3. Брехман И.И. Человек и биологически активные вещества. - Л.: Наука, 1980. - 120 с.
4. Водоворот А.А., Кырге П.К. Гормоны и спортивная работоспособность. - Г.: Фис, 1983. - 158 с.
5. Денисенко П.П. Повышение работоспособности фармакологическими средствами медиаторного и немедиаторного действия в обычных и экспериментальных условиях // Фармакологическая регуляция физической и психической работоспособности. - Г., 1980. С. 5.

6. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. - Г. : Медпресс-информ, 2004. - 920 с.
 7. Меерсон М.Г. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим перегрузкам / М.Г.Меерсон, П.И. Пшенникова. - Г.: Медицина, 1988. - 254 с.
 8. Мохан Р, Глессон М., Гринхафф П.Л. Биохимия мышечной деятельности. К.: олимпийская литература, 2001. - 295 с.
 9. Пчеленко Л.Д. Адаптогенный эффект экистероидсодержащей фракции *Serratula coronata* L. / Л.Д. Пчеленко, Л.Г. Метелкина, С.О. Володина // Химия растительного сырья. - 2002. - № 1. - С. 69-80.
 10. Растительные адаптогены: физиологическое значение аналогов нейротрансмиттеров и гормонов растительного происхождения, их роль в профилактике болезней старения / Кол. Авторы. - Одесса: Астропринт, 2000. - 52 с.
 11. Сейфулла Р.Д. Адаптогены и физическая работоспособность. - Г.: ОК РФ, 1997. - 62 с.
 12. Турханова Л.В. Синтез полиаминов в скелетных мышцах крыс при физических нагрузках и введении 17 - метилтестостерона: автореф. дис. канд. биол. наук. / Л.В. Турханова. - Спб., 1998.- 24 с.
 13. Фармакологическая коррекция утомления / Ю.Г. Бобков, В.М. Виноградов, В.Ф. Катков и др. - М.: Медицина, 1984. - 207 с.
 14. Яременко К.В. Адаптогены как средства профилактической медицины. - Томск: изд-во Томск. университета, 1990. - 90 с.
-

5. Изучение мембраностабилизирующих свойств ВРГФ по методу JAGER F.C.

Известно, что восстановление проницаемости сосудистой стенки, которое зависит от состояния клеточных мембран, является одним из ведущих факторов при лечении воспалительных патологий [1, 3].

Нарушение целостности мембраны клеток, вызванное активацией процессов липопероксидации, ведет к изменению функциональной активности клеток, и как следствие, органа в целом [1, 2, 3]. От глубины поражения мембранного аппарата клеток зависит выраженность деструктивно-воспалительных изменений [4, 5].

Для подтверждения мембраностабилизирующего действия ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг изучалось его влияние на процесс спонтанной перекисной деструкции мембран эритроцитов на модели спонтанного гемолиза за Jager F.C. [6].

Материалы и методы.

Метод Jager F.C. основанный на определении степени спонтанной перекисной деструкции мембран эритроцитов. Для этого спектрофотометрично на СФ-46 при длине волны 540 нм определяли экстинкцию позаэритроцитарного гемоглобина, который поступает в кровь вследствие спонтанного лизиса мембран эритроцитов, вызванного пероксидным окислением липидов кислородом воздуха [6].

Исследование проводили на белых беспородных крысах обоих полов, массой 200 - 220 г. Животным исследовательской группы на протяжении трех суток, 1 раз в сутки, вводили ВРГФ внутривенно в дозе 1,8 мл/кг. Препаратом сравнения был выбран витамин Е, который по данным литературы [7] владеет антиоксидантными свойствами. Его вводили животным в дозе ЕД₅₀ 50 мг/кг внутривенно в виде эмульсии по такой же схеме, как и ВРГФ. Контрольные крысы получали воду [4, 5].

На четвертые сутки у животных из хвостовой вены брали кровь и определяли степень гемолиза эритроцитов в исследовательских и контрольной группах по формуле:

$$X = \frac{(E_1 + E_2)}{2 E_3} \times 100 \%, \text{ где}$$

X - степень гемолиза, %;

E₁, E₂ – экстинкция первой и второй проб с рабочим раствором;

E₃ – экстинкция пробы с дистиллированной водой.

Статистическая обработка результатов проведенных исследований осуществлялась с использованием методов вариационной статистики с помощью коэффициента Стьюдента (t).

Результаты проведенных исследований приведены в таблице 5.1.

Таблица 5.1

Изучение мембраностабилизирующего действия ВРГФ (n=5)

Условия опыта	Доза,	Степень гемолиза эритроцитов, %	Мембраностабилизирующая активность, %
Интактный контроль	-	33,80±1,49	-
ВРГФ	1,8 мл/кг	18,20±2,99*	46
Витамин Е	50 мг/кг	18,60±2,62*	45

Примечания:

* - отклонение достоверно относительно интактного контроля, $p \leq 0,05$;

Установлено, что ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг проявил выраженное мембраностабилизирующее действие, о чем свидетельствует достоверное подавление степени гемолиза эритроцитов в 1,9 раза в сравнении с интактным контролем. Анализ мембраностабилизирующего влияния ВРГФ в сравнении с референс-препаратом витамином Е доказал, что по активности ВРГФ (46 %) не уступает витамину Е (45%). При этом общая доза фуллерена C_{60} , данная в виде ВРГФ, была в $1,25 \times 10^6$ раз меньше, чем общая доза витамина Е.

Таким образом, проведенные исследования установили выраженные мембраностабилизирующие свойства ВРГФ, что проявились уменьшением степени спонтанного гемолиза вследствие перекисной деструкции мембран эритроцитов, а также доказали его антицитолитическое действие. Выявленные свойства могут быть реализованы за счет антиоксидантных свойств ВРГФ, что подтверждены данными литературы [8].

Литература

1. Белоцкий С.М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты / С.М. Белоцкий, Р.Р. Авталион. - Г.: Изд-во БИНОМ, 2008. - 240 с.

2. Дегтярева И.И. Заболевания органов пищеварения / И.И. Дегтярева - К.: Демос, 2000. - 321 с.
 3. Лекарственная терапия воспалительного процесса. Экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / А.Я. Сигидин, Г.Я. Шварц, А.П. Арзамасцев и др. - М.: Медицина, 1988. - 240 с.
 4. Карбушева И.В. Исследование мембранопротекторных свойств альтана / И.В. Карбушева // Вестник фармации. - 2001. - № 3 (27). - С. 174.
 5. Карбушева И.В. Экспериментальное изучение фармакологической эффективности нового полифенольного препарата альтану при язвенных колитах: автореф. дис. на получ. науч. степени канд. биолог.наук: спец. 14.03.05. / И.В. Карбушева. - О., 2003. - 18 с.
 6. Пособие к лабораторным и семинарским занятиям из биологической химии: науч.-метод. пособ. для вузов / Л.М. Воронина, В.Ф. Десенко, В.М. Кравченко и др. - Х.: Основа, 1996. - 432 с.
 7. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. 14-е изд., перераб., испр. и доп. - Г.: ООО «Издательство Новая Волна», 2000. - Т. 2. - С. 90-91.
 8. Росляков А. Д., Андриевский Г. В., Петренко А. Ю., Малая Л. Т. Исследование цитотоксических и антиоксидантных свойств водных растворов нативных фуллеренов в системах *in vitro*. // Ж. Акад. Мед. Наук Украины - 1999.- ; №5 (2). - С.338-346.
-

6. Изучение противовоспалительного действия ВРГФ

Фуллерены - третья после алмаза и графита аллотропная форма углерода, которая обычно существует в природе и растворяется только в органических растворителях. Для того чтобы понять биологические и медицинские возможности фуллерена в 1994 г. Андреевским Г.А. был получен водный раствор фуллеренов, за счет «встраивания» их в

естественную структуру воды. А именно, был разработан раствор, который одновременно объединяет в себе свойства и истинных растворов, и коллоидных систем.

Принимая во внимание отсутствие генно- и цитотоксических свойств ВРГФ и одновременно наличие у него мощного антиоксидантного, антиатеросклеротического, противоопухолевого и нейропротекторного (анти-амилоидного) действия, целесообразным есть дальнейшее изучение фармакологических свойств ВРГФ.

В связи с тем, что воспалительные процессы сопровождают развитие большинства патологий, оценка противовоспалительной активности ВРГФ есть одной из главных задач фармакологических исследований.

В последние годы наблюдается существенное повышение численности людей с разными воспалительными заболеваниями, поэтому воспаление - одна из важнейших проблем в общей патологии и клинике [1, 2, 5, 9, 11].

Воспаление - это процесс, который развивается в любых тканях и органах как реакция живых тканей на местное повреждение, которая возникла в ходе эволюции; она состоит из сложных поэтапных изменений микроциркуляторного русла, системы крови и соединительной ткани, которые направлены на изоляцию и устранение повреждающего агента, и восстановление (или замещение) поврежденных тканей [2, 5, 11, 15, 16, 17, 19].

Повреждение тканей при развитии воспалительного процесса сопровождается структурным изменением мембран и вызывает выход в очаге воспаления его медиаторов - гистамина и серотонина, увеличение интенсивности свободнорадикального окисления, а также активацию протеаз и кининовой системы [1, 2, 15, 16, 18, 19].

Повышается активность фосфолипазы А и преобразование арахидоновой кислоты с образованием простагландинов (ПГ) и тромбоксанов, которые действуют как медулярная система, которая тесно связана с функцией циклических нуклеотидов. Происходит активация других

эйкозаноидов, которая в дальнейшем приводит к появлению антител [10, 11, 16, 19]. Возникает реакция антиген-антитело, которая активирует систему комплемента. В результате комплекса реакций возникают сосудистые и клеточные реакции, эти процессы сопровождают острое воспаление [2, 9, 11, 15].

Нарушение микроциркуляции обусловлено повышением проницаемости капиллярной сетки, которая приводит к развитию тканевого отека и гиперемии [1, 2, 10]. В дальнейшем происходит повреждение стенок капилляров, капиллярный и веноулярный стазы, повышение внутрисосудистой концентрации разных клеток с агрегацией эритроцитов и тромбоцитов, а также факторов свертывания в плазме. Эксудативное звено воспаления связано с активной миграцией лейкоцитов и макрофагов из кровяного русла в очаг воспаления, накоплением в нем клеточных элементов крови, а также местных тучных клеток и фибробластов [1, 2, 10, 19]. В результате этого в очаге воспаления активируется фагоцитоз с высвобождением в межклеточное основное вещество соединительной ткани лизосомальных ферментов, которые осуществляют деградацию продуктов тканевого распада, а при избыточной их активации вызывают тканевую деструкцию. При ликвидации патогенетического агента возникает завершающая фаза воспалительного процесса - репарация, которая заканчивается заживлением дефектов ткани и прекращением реакций. Если же в организме продолжает находиться источник раздражения, то острое воспаление переходит в хроническое [2, 11].

Любой воспалительный процесс, независимо от фактора, который его вызвал, протекает по типу цепной реакции, которая состоит из стереотипных звеньев и специфических элементов, характерных для данного воспаления. Он начинается как воспалительная реакция на повреждение клеток с последующей сосудистой реакцией [1, 2, 5, 8]. При этом происходит увеличенное выделение в межклеточное пространство биологически активных веществ - гистамина, серотонина, дофамина и протеолитических энзимов, которые вызывают активацию процессов пероксидного окисления

липидов (ПОЛ) [10]. Распад лизосом и выход их ферментов в цитоплазму при разнообразных повреждениях активирует гидролитические процессы, продукты которых оказывают содействие накоплению ионов водорода и повышению кислой реакции цитоплазмы. Развивается ацидоз, который является важным общим признаком повреждения клетки [1, 2, 9, 10, 11, 19].

Повреждение липидных компонентов клеточных и субклеточных мембран при воспалении возникает иначе. Одним из них есть перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот и фосфолипидов (процесс активируется соединениями железа) [1, 11, 18].

Важнейшими клеточными реакциями при воспалении есть реакции иммунной системы [1, 2, 5, 11].

Считают, что в регуляции иммунного воспаления ведущая роль принадлежит ПГ, циклическим нуклеотидам, адренергическим, холиноэргическим веществам и нарушению гликолитических процессов [1, 2, 5, 9, 1, 14, 15, 16, 18, 19].

В комплексном изучении разработанного ВРГФ – важное место занимают экспериментальные исследования, которые включают в себя определение его противовоспалительной активности. Обоснованием проведенных исследований служило наличие в ВРГФ мощного антиоксидантного эффекта. В свою очередь, угнетение процессов перекисного окисления биологических молекул, как известно, коррелирует с торможением воспалительных процессов, а противовоспалительная терапия довольно актуальна при лечении широкого спектра патологических состояний.

Материалы и методы

Определение противовоспалительной активности препарата осуществляли по его антиэкссудативному действию, которое было изучено на модели карагенинового и зимозанового отеков стопы крыс (3, 4, 6).

На первом этапе исследования противовоспалительную активность ВРГФ изучали на модели карагенинового отека [4, 6, 14, 19] в дозе 1,8 мл/кг

(доза рассчитана в перерасчете из терапевтической дозы для человека с помощью коэффициента перерасчета доз по Ю. В. Рыболовлеву) [12].

Опыты проводили на 18 белых нелинейных крысах массой 200-220 г разного пола. Животные распределяли на 3 группы (по 6 крыс в каждой). За час до введения карагенина животным первой группы внутривенно вводили ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг; животных второй группы получали препарат сравнения «Вольтарен» («Novartis», Швейцария), который вводили в дозе 8 мг/кг; животных третьей группы не лечили (контрольная группа), они получали эквивалентное количество воды. Противовоспалительную активность оценивали по степени угнетения отека стопы у животных на третьей сутки исследования в сравнении с контрольными, и выражали в процентах [6, 3, 4, 18, 19].

Один из наиболее современных подходов при проведении фармакологического скрининга - поиск веществ-ингибиторов липооксигеназного пути преобразования арахидоновой кислоты. В связи с тем, что одним из факторов воспаления есть лейкотриены (ЛТ), целесообразным было исследование антиэкссудативной активности ВРГФ при воспалении, которое вызвано зимозаном [6, 3, 19, 20].

Зимозан - структурный полисахарид, который содержится в клетках оболочки дрожжей, специфично оказывает содействие образованию и выделению ЛТ и провоцирует локальную острую воспалительную реакцию [6]. На ранней стадии ингибиторы липоксигеназы предупреждают зимозан-индуцированный отек [7, 20].

Зимозан вводили крысам субплантарно из расчета 0,1 мл на животное в виде 2 % суспензии. Максимальный отек развивался через 30 минут после введения флогогена [6].

На модели зимозанового отека у крыс в качестве препарата сравнения использовали растительный противовоспалительный препарат - ингибитор липооксигеназы - гранулы Кверцетина (НВЦ «Борщаговский ХФЗ», г. Киев) в условно-терапевтической дозе 5 мг/кг.

Разделение животных на экспериментальные группы и введение исследуемых веществ происходило по такой же схеме, как на модели карагенинового отека.

Противовоспалительную активность (на моделях карагенинового и зимозанового отеков) рассчитывали по формуле:

$$A = 100\% - \frac{(M_{\text{осо}} - M_{\text{зо}}) \times 100}{M_{\text{оск}} - M_{\text{зк}}}, \text{ где}$$

A - антиэкссудативная активность, %;

$M_{\text{осо}}$ – масса отекающей стопы в опыте;

$M_{\text{зо}}$ – масса здоровой стопы в опыте;

$M_{\text{оск}}$ – масса отекающей стопы в контроле;

$M_{\text{зк}}$ – масса здоровой стопы в контроле.

Во всех случаях масса стопы выражалась в мг [6].

Результаты экспериментов подвергали обработке методами математической параметрической и непараметрической статистики. Статистически значимыми считали данные при равных достоверностях $P \leq 0,05$. Для получения статистических выводов при сравнении выборок соответствующих переменных, после того, как однофакторный дисперсионный анализ (или критерий Крускала-Уоллиса для данных, которые не подлежат нормальному закону распределения) показал разность между экспериментальными группами, применяли критерий Ньюмена-Кейлса для численных сравнений (или критерий Манна-Уитни). Использовали стандартный пакет программ «Statistica 6.0».

6.1. Исследование антиэкссудативного действия ВРГФ на модели карагенинового отека у крыс

Результаты исследований

На первом этапе исследований проводили изучение противовоспалительного (антиэкссудативного) действия ВРГФ на модели

острого воспалительного отека, который вызвали субплантарным введением в заднюю лапу крысы – 0,1 мл 1 % водного раствора карагенина [5, 6, 15, 16]. Известно, что в патогенезе карагенинового воспаления через 1,5-5,5 часа после введения флогогена ведущую роль сыграют ПГ, что позволяет сделать вывод о влиянии исследуемого экстракта на циклооксигеназную систему [1, 16].

Результаты эксперимента приведены в таблице 6.1.

Таблица 6.1

Результаты определения антиэкссудативной активности ВРГФ на модели карагенинового отека стопы у крыс (n=6)

Условия опыта	Прирост объема стопы после введения карагенина (ус.ед.)	Антиэкссудативная активность (%)
ВРГФ 1,8 мл/кг	16,83±0,40	19,2*/**
Вольтарен 8 мг/кг	11,00±0,52	47,2*
Контрольная патология	20,83±0,60	—

Примечания:

1. * - отклонение достоверно относительно контрольной патологии, $p \leq 0,05$;
2. ** - отклонение достоверно относительно референс-препарата Вольтарен, $p \leq 0,05$.

Полученные данные свидетельствуют, что ВРГФ проявляет противовоспалительную (антиэкссудативную) активность через три часа после введения флогогена (это время отвечает максимуму развития карагенинового отека).

Вольтарен - классический синтетический препарат группы НПЗЗ, который, по данным литературы, есть мощным неспецифичным ингибитором циклооксигеназы (ЦОГ), что ведет к снижению продукции ПГ и уменьшает выразительность воспаления.

Антиэкссудативное действие раствора ВРГФ составляла 19,2% (в сравнении с 47,2% для Вольтарена), что указывает на умеренное влияние выбранной дозы этого препарата на угнетение активности (ЦОГ).

Противовоспалительный эффект ВРГФ был в 2,5 раза меньшим, чем для Вольтарена, но следует отметить, что общая доза фуллерена C_{60} , данная в виде ВРГФ, была в 2×10^5 раз меньше, чем общая доза Вольтарена.

Таким образом, экспериментально установлено, наличие умеренной антиэкссудативной активности ВРГФ в выбранной дозе 1,8 мл/кг на модели карагенинового отека у крыс. Полученные данные свидетельствуют о возможности исследуемого средства влиять на простагландиную фазу карагенинового воспаления и подавлять ЦОГ.

6.2. Исследование антиэкссудативного действия ВРГФ на модели зимозанового отека у крыс

В развитии экссудации ведущую роль играют биологически активные производные арахидоновой кислоты. Существует два альтернативных пути преобразования арахидоновой кислоты из фосфолипидов клеточных мембран на биологически активные соединения: циклооксигеназный путь - образование ПГ при участии ЦОГ и липооксигеназный путь - образование ЛТ при участии липооксигеназы (ЛОГ) [6, 20]. Активация обеих путей имеет большое значение для развития воспалительной реакции, поэтому эффективность противовоспалительного действия препарата будет зависеть от его способности ингибировать активность как ЦОГ, так и ЛОГ [6].

С целью установления способности ВРГФ подавлять активность ключевых ферментов преобразования арахидоновой кислоты мы использовали модель зимозанового отека, в механизме развития которого лежит образование ЛТ (на 0,5 час).

В качестве препарата сравнения был выбран Кверцетин - препарат полифенольной природы, который способен подавлять активность ЛОГ.

Введение зимозана приводило к развитию отека в контрольной группе животных через 0,5 часа. Установленная динамика развития отека

характерна для данной модели. Резкое увеличение его через 0,5 часа, очевидно, связанное с интенсивным образованием ЛТ в очаге воспаления.

Предварительное введение животным ВРГФ подавляло развитие зимозанового отека на 27,8 % (табл. 6.2). Так, через 0,5 часа после введения животным зимозана, у крыс, которых лечили ВРГФ, отек был достоверно ниже в 1,4 раза, чем в группе контрольной патологии. Итак, можно утверждать, что ВРГФ подавляет действие ЛТ. Однако по уровню антиэкссудативной активности ВРГФ несколько уступил противовоспалительному действию Кверцетину.

Таблица 6.2

Результаты определения антиэкссудативной активности ВРГФ на модели зимозанового отека стопы у крыс (n=6)

Условия опыта	Прирост объема стопы после введения карагенина (ус.ед.)	Антиэкссудативная активность (%)
ВРГФ 1,8 мл/кг	15,7±0,49	27,8*/**
Кверцетин 5 мг/кг	12,3±0,42	43,9*
Контрольная патология	22,0±0,68	—

Примечания:

1 * - отклонение достоверно относительно контрольной патологии, $p \leq 0,05$;

2 ** - отклонение достоверно относительно референс-препарата Кверцетин, $p \leq 0,05$;

Предварительное введение животным Кверцетина также подавляло развитие зимозанового отека. Как видно из приведенных в таблице 1.2 данных, через 0,5 часа после введения зимозана размер отека был в 1,8 раза меньшим, чем в группе контрольной патологии. Антиэкссудативная активность Кверцетина в этот период равна 43,9 %. Последнее можно объяснить тем, что Кверцетин существенно влияет на активность ЛТ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об антиэкссудативной активности ВРГФ. Способность ВРГФ подавлять развитие

зимозанового отека в ранние сроки, возможно, связано со способностью подавлять активность ЛОГ [9]. На основании полученных данных можно сделать вывод о наличии у ВРГФ антилипооксигеназной активности, которая лишь на 3,4% уступила действию Кверцетина. При этом общая доза фуллерена C₆₀, данная в виде ВРГФ, была в $1,25 \times 10^5$ раз меньше, чем общая доза Кверцетина. Способность ВРГФ в выбранной дозе подавлять развитие зимозанового отека через 0,5 часа после индукции воспаления позволяет сделать также вывод о наличии у него умеренной антилипооксигеназной активности.

Таким образом, проведенные исследования показали, что на модели зимозанового отека у крыс ВРГФ проявил достаточный уровень антиэкссудативной активности (27,8 %), а на модели карагенинового отека его противовоспалительное действие составляло 19,2 %. Это позволяет предположить, что на ранних этапах развития воспалительной реакции ВРГФ более активно подавляет образование ЛТ, а через 3 часа – умеренно ПГ.

Литература:

1. Белоцкий С.М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты / С.М. Белоцкий, Р.Р. Авталион. - Г.: Изд-во БИНОМ, 2008. - 240 с.
2. Воспаление: рук. для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. - Г.: Медицина, 1995. - 640 с.
3. Галузинска Л.В. Экспериментальное изучение противовоспалительной активности полифенольного экстракта из надземной части лядвенцю рогатого: автореф. дис. на пол. науч. степени канд. фармац. наук: спец. 14.03.05./Л.В. Галузинска. -Х., 2008. -21 с.
4. Джахад Ибрахим. Противовоспалительные свойства комбинации доксициклина с глюкозамином гидрохлоридом / Джахад Ибрахим, Е.Ф. Гринцов, И.А. Зупанец // Клинич. фармация. - 2004. - Т. 8, № 1. - С. 52-55.
5. Джон Хопкинс. Большая энциклопедия медицинской диагностики / Джон Хопкинс; под ред. С. Марголиса. - Г.: АСТ Астрель, 2007. - 325 с.

6. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. рек. / Под. ред. О.В. Стефанов - К.: Авиценна, 2001. - 528 с.
7. Карбушева И.В. Экспериментальное изучение фармакологической эффективности нового полифенольного препарата альтана при язвенных колитах: автореф. дис. на получ. науч. степени канд. биолог. наук: спец. 14.03.05. / И.В. Карбушева. - О., 2003. - 18 с.
9. Клименко Н.А. Клинические аспекты исследования проблем общей патологии воспаления / Н.А. Клименко // *Врачебная практика*. - 1999. - № 6. - С. 5-10.
10. Клименко Н.А. Медиаторы воспаления и принципы противовоспалительной терапии / Н.А. Клименко // *Врачебная практика*. - 1997. - № 5-6. - С. 3-9.
11. Лекарственная терапия воспалительного процесса. Экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / А.Я. Сигидин, Г.Я. Шварц, А.П. Арзамасцев и др. - М.: Медицина, 1988.-240 с.
12. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // *Доклады АН СССР*. - 1979. - Т. 247, № 6. - С. 1513-1516.
13. Чернов Ю.Н. Физиологическая роль и фармакологическая коррекция эффектов простаноидов и лейкотриенов / Ю.Н. Чернов, Г.А. Батищева, М.В. Васин // *Фармакология и токсикология*. - 1990. - Т. 53, № 6. - С. 71.
14. Шубич М.Г. Медиаторные аспекты воспалительного процесса / М.Г. Шубич, М.Г. Авдеева // *Архив патологии*. - 1997. - Т. 59, № 2. - С. 3-8.
15. Adorini L. Pathogenesis and immunotherapy of autoimmune disease / L. Adorini, F. Sinigaglia // *Trends Immunol.* - 1997. - Vol. 18, № 4. - P. 209-211.
16. Babak Mohajer. Eicosanoids and the small intestine / Babak Mohajer, Y. M. Thomas // *Prostaglandins and Lipid Mediators*. - 2000. - Vol. 61, № 2. - P. 125-143.
17. Brune K. In *Pharmacology of inflammation* / K. Brune, R. Zauz. - Amsterdam; New York; Oxford: Mosby, 1985. - P. 413-419.

- 18.Brune K. Modulation by drugs of leukotriene and prostaglandin production from mouse peritoneal macrophages / K. Brune, B.A. Peskar // Int. Tissue React. - 1985. - Vol. 7, № 2. - P. 97-103.
- 19.Di Rosa M. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine / M. Di Rosa, J.P. Giroud, D.A. Willoughby // J.Pathol. - 1971. - Vol.104, № 15. - P. 29.
- 20.Gado K. Zymosan inflammation. A new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs / K. Gado, G. Gigler // Agents and Actions. - 1991. - Vol. 32, № 1-2. - P. 119-121.
-

7. Изучение противовоспалительного действия ВРГФ на модели ацетилсалициловой язвы желудка

Язвенная болезнь желудка (ЯБЖ) - это хроническое заболевание, которое имеет полициклический ход и характеризуется появлением дефекта в слизистой оболочке желудка [1, 10, 11].

Кроме нейрогенных, алиментарных и эндокринных факторов, согласно современным представлениям, процессы свободнорадикального окисления являются одним из важнейших звеньев патогенеза ЯБЖ [2, 9, 10, 11, 12, 13]. Доказано, что активация свободнорадикального окисления в покровно-эпителиальном слое слизистой оболочки желудка одним из факторов, который подавляет резистентность слизистой оболочки желудка (СОШ) гастродуоденальной зоны. Доказано, что одной из возможных причин снижения регенеративных возможностей при ЯБЖ - накопление в тканях промежуточных продуктов свободнорадикального окисления (СРО) липидов клеточных мембран, которые тормозят пролиферативные и секреторные процессы в СОШ и выступают в роли ингибиторов клеточного распределения [4, 8, 9, 12, 15, 16, 17]. Существуют данные о достоверной активизации процессов СРО в плазме крови и мембранах эритроцитов, а также непосредственно в СОШ у больных с ЯБЖ [4, 10, 11, 12, 15, 16, 17]. В

некоторых роботах отмечена важная роль свободных радикалов в патогенезе экспериментальных язв [4, 15, 16, 20, 24, 26].

Одним из факторов активации СРО может служить антиоксидантная недостаточность СОШ. [4, 15, 16, 27, 28].

Деструкция СОШ, как следствие активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), связана также с резким снижением антиоксидантной активности, наличием гипоксии, ишемии, нарушением микроциркуляции, изменениями реологических свойств слизи, которая защищает клетки СОШ от повреждений агрессивного уровня гидроперекисей жирных кислот [4, 15, 16, 17]

Таким образом, ЯБ развивается на фоне активации ПОЛ и истощения резервов эндогенной антиоксидантной системы (АОС). Цепной рост ПОЛ и выход этого процесса из-под контроля АОС вызывают нарушение тканевого метаболизма, (дизинтеграцию мембран, вторичное повреждающее действие лизосомальных гидролаз, мутации ДНК, дезорганизацию деятельности ферментов, угнетение образования регуляторов клеточного деления и прочие), что служит причиной трофические изменений. В СОШ суть деструктивного влияния процессов ВРО сводится к разным макроскопическим и гистологическим изменениям: повреждение сосудов, кровотечений, кровоизлияний, слущивания эпителия, развития стаза в микрососудах, который приводит к некрозам и развитию язв гастродуоденальной области [2, 4, 8, 9, 15, 16].

Главная задача при лечении ЯБЖ - быстрое устранение обострения и уменьшение количества рецидивов заболевания. С учетом интенсификации процессов ПОЛ и снижения обеспеченности организма антиоксидантами многие исследователи признают целесообразность использования в лечении ЯБЖ антиоксидантных препаратов. Установлено, что введение антиоксидантов патогенетически обоснованно и улучшает результаты терапии, содействуя более качественному заживлению язвенного дефекта [4, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 26].

Целью нашего исследования стало фармакологическое изучение противоязвенного действия ВРГФ на модели ацетилсалициловой язвы желудка у крыс. Обоснованием проведенных исследований служила доказанное ранее наличие в ВРГФ мощного антиоксидантного эффекта. В свою очередь, интенсификация процессов ПОЛ - одна из важнейших причин язвеногенеза. Угнетение процессов перекисного окисления биологических молекул, как известно, коррелирует с торможением воспалительных процессов, что является актуальным в терапии ЯБЖ.

Материалы и методы

Исследование противоязвенного действия ВРГФ проводили на модели ацетилсалициловой язвы желудка у крыс, которую воссоздавали согласно Методическим рекомендациям Фармакологического Центра МОЗ Украины [3].

В процессе моделирования этой патологии животным вводили внутрижелудочно ацетилсалициловую кислоту (АСК) в дозе 150 мг/кг 5-тикратно на протяжении 3-х суток [3, 15, 22, 25]

В качестве препарата сравнения использовали известный противоязвенный препарат Альтан в его условно-терапевтической дозе 1 мг/кг [6, 7, 17, 18, 19].

Исследование проводили на 24 половозрелых белых нелинейных крысах с массой тела 200 – 220 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 группа – интактные животные; 2 группа - животных с нелеченной патологией СОШ; 3 группа – животных, которые получали ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг (доза рассчитана в перерасчете на терапевтическую дозу для человека с помощью коэффициента перерасчета доз по Ю. В. Риболовлеву [14]); 4 группа – животных, которые получали препарат сравнения Альтан.

ВРГФ и референтный противоязвенный препарат Альтан вводили исследуемым группам животных внутрижелудочно в профилактически-лечебном режиме (параллельно с формированием патологии) [3, 15].

Контрольная группа животных получала эквивалентное количество воды.

На третьи сутки опыта животных выводили из эксперимента и проводили оценку макроскопических изменений с целью установления степени протекторного действия исследуемых средств в условиях экспериментальной ЯБЖ.

Лечебно-профилактическое действие ВРГФ и препарата сравнения оценивали по их влиянию на ход заболевания у крыс в сравнении с группой животных контрольной патологии [3].

Показателем тяжести поражения было наличие гиперемии, отека, нарушение складчатости, геморрагий СОШ. Кроме этого, оценивали степень изъязвления СОШ в каждой группе животных в соответствие с такими общепринятыми показателями, как средняя площадь язв в группе (выраженная в баллах [5]), процент животных с язвами в группе и язвенный индекс (ЯИ).

Градацию язвенной поверхности проводили по 5-ти балльной шкале в зависимости от площади каждого язвенного дефекта [5].

Значение ЯИ рассчитывали по формуле [3]:

$$\text{ЯИ} = \frac{S_{\text{я}} \times T_{\text{я}}}{100}, \text{ где:}$$

$S_{\text{я}}$ – площадь язв, гг

$T_{\text{я}}$ – процент животных с язвами в группе.

Все экспериментальные исследования проводили соответственно «Общим этическим принципам экспериментов на животных» (Украина, 2001), что согласовываются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985), а также «Методических рекомендаций по выводу лабораторных животных из эксперимента» [3].

Результаты экспериментов подвергали обработке методами математической параметрической и непараметрической статистики.

Статистически значимыми считали данные при уровне достоверности $P \leq 0,05$. Для получения статистических выводов использовали стандартный пакет программ «Statistica 6.0».

Результаты исследований

Модель поражения СОШ АСК характеризуется субхроническим ходом и эрозивно-геморагическими повреждениями СОШ желудка. Считают, что механизм повреждающего влияния АСК на слизистую оболочку желудка осуществляется за счет прямого местнораздражающего влияния на СОШ и сопровождается фокальным некрозом, который способствует потере защитно-барьерных свойств слизистой, слущиванию эпителия и возникновению массивных участков геморагичных эрозий и язв [3, 4, 15, 16].

Результаты моделирования ацетилсалициловой язвы приведены в таблице 7.1.

Анализ результатов эксперимента показал, что все группы животных интактного контроля в общем состоянии были в норме, а при макроскопическом исследовании их желудков изменений в СОШ и язвенных дефектов не наблюдалось (рис.7.1).



Рис. 7.1. Состояние слизистой оболочки желудка крыс группы интактного контроля.

Противоязвенная активность ВРГФ на модели ацетилсалициловых язв у крыс (n=6)

Условия опыта	Количество животных с язвами в группе, %	Средняя площадь язв, баллы	Язвенный индекс (ЯИ), ус.ед.	Противоязвенная активность, %
Контрольная патология	100%	18,67±0,88	1,12	–
ВРГФ, 1,8 мл/кг	83%	5,33±1,15*	0,27	76,3
Альтан, 1 мг/кг	67%	3,67±1,23*	0,15	86,7

Примечание:

* - отклонение показателя достоверно относительно контрольной патологии, $p \leq 0,05$.

По результатам исследования установлено, что внутрижелудочное введение животным АСК на протяжении 3-х суток приводило к ухудшению общего состояния животных и развития поражения СОШ. В группе контрольной патологии общее состояние животных было плохим сравнительно с группой интактного контроля: наблюдалось отсутствие аппетита, снижение двигательной активности, слабая реакция на внешние раздражители, животные пили много воды.

При обзоре желудков в группе контрольной патологии отмечено, что введение АСК привело к образованию многочисленных глубоких, как точечных, так и массивных язв СОШ. Наблюдался отек, значительную гиперемии, большое количество кровоизлияний в СОШ, нарушение ее складчатости (рис.7.2).



Рис. 7.2. Состояние слизистой оболочки желудка крыс группы контрольной патологии (гиперемия, нарушение складчатости, многочисленные кровоизлияния, язвенные дефекты).

У всех животных наблюдали вздутие ЖКТ. Наличие язвенных дефектов отмечали у всех животных данной группы (100%), степень язв СОШ составляла $18,67 \pm 0,88$ балла, значения ЯИ - 1,12 (табл. 7.1).

Введение ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг и препарата сравнения Альтан в дозе 1 мг/кг привело к значительному улучшению состояния животных. Внешний вид животных был удовлетворительным. Отсутствовали беспокойства, не наблюдали признаков вздутия ЖКТ, отсутствия аппетита и снижения двигательной активности. При макроскопическом обзоре желудков крыс этих групп складчатость и цвет слизистой оболочки желудка почти не отличались от таких характеристик в группе интактных животных (рис.7.3 и рис.7.4).

Под влиянием ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг, при макроскопическом осмотре СОШ крыс, наблюдали значительно меньшее количество язв, кровоизлияния были немногочисленным и точечными, цвет и складчатость СОШ приближались к характеристикам группы интактного контроля (рис.7.3). Количество животных с язвами в группе снизилось до 83 %. В сравнении с группой контрольной патологии наблюдали достоверное снижение средней

площади язв и ЯИ при действии ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг – в 3,5 и 4,1 раза соответственно (табл. 7.1). Анализируя полученные результаты, можно говорить, что введение ВРГФ в лечебно-профилактическом режиме приводило к угнетению хода язвенного процесса.



Рис. 7.3. Состояние слизистой оболочки желудка крыс под влиянием ВРГФ.

Введение препарата сравнения - Альтан - также обусловило уменьшение выраженности хода язвенного процесса в СОШ крыс (рис.7.4). Язвы наблюдались в 67% животных исследовательской группы. Под влиянием референс-препарата Альтан, средняя площадь язв снизилась в 5 раз, а значение ЯИ в 7,5 раза относительно группы контрольной патологии (табл.7.1).



Рис. 7.4. Состояние слизистой оболочки желудка крыс под влиянием Альтана.

В результате эксперимент установлен, что на модели субхронического поражения СОШ крыс, вызванного АСК, установленное выраженное противоязвенное действие ВРГФ, которое составляло 76,3% и достоверно не уступало по выраженности эффекту препарата сравнения Альтана (86,7%), что свидетельствует о выоажнном лечебно-профилактическом влиянии ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг и указывает на его способность восстанавливать поврежденные ткани слизистой оболочки желудка крыс. При этом следует отметить, что общая доза фуллерена C_{60} , предоставленная в виде ВРГФ, была в $2,5 \times 10^4$ раз меньше, чем общая доза Альтана.

Таким образом, на модели субхронического поражения СОШ, вызванного АСК, была установленная выраженная противоязвенная активность ВРГФ на уровне 76,3%, что свидетельствует о его выраженном лечебно-профилактическом влиянии на СОШ. В условиях экспериментальной ацетилсалициловой язвы желудка у белых крыс доказано, что за выраженность противоязвенного эффекта ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг не уступает референс-препарата Альтан в дозе 1 мг/кг. Полученные

экспериментальные данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейшего более глубокого изучения фармакологических свойств ВРГФ.

Литература:

1. Березнякова А.И. Патологическая физиология / А.И. Березнякова. - Х.: Изд-во НФАУ, 2000. - С. 129-154.
2. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. - Г.: Наука, 1972. - 252 с.
3. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. рек. / Под. ред. О.В. Стефанов - К.: Авиценна, 2001. - 528 с.
4. Дроговоз С.М. Сравнительное изучение разных антиоксидантов на функциональные показатели работы желудочно-кишечного тракта / С.М. Дроговоз, Т.О. Куценко, И.М. Карташевська, Н.Д. Бунятян // Лекарство. - 2007. - № 1-2. - С. 46-49.
5. Зупанец И.А. Обоснование использования комбинации этанол-производных в скрининге гастропротекторов / И.А. Зупанец, Л.В. Яковлева, В.В. Предписание новое // Клиническая фармация. - 1998. - Т. 2, № 3. - С. 29-33.
6. Карбушева И.В. Изучение влияния Альтана и салазопиридазина на функциональную активность желудочно-кишечного тракта / И.В. Карбушева, Е.В. Гладух // Клиническая фармация. - 2002. - Т. 6, № 2. - С. 66-69.
7. Карбушева И.В. Экспериментальное изучение фармакологической эффективности нового полифенольного препарата альтана при язвенных колитах: автореф. дис. на получ. науч. степени канд. биолог. наук: спец. 14.03.05. / И.В. Карбушева. - О., 2003. - 18 с.
8. Малоштан Л.М. Изучение регенерирующей и противоязвенной активности ореха валахского / Л.М. Малоштан, О.Г. Башура, Т.М. Ковальова // Клиническая фармация. - Т. 3, № 2. - С. 153 - 156.
9. Меньшикова Э.Б. Окислительный стресс при воспалении / Э.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков // Успехи современной биологии. - 1997. - № 2. - С. 155-171.

10. Моксимова О.Г. Заболевания органов пищеварения в детей: учеб. пособие / О.Г. Моксимова, И.И. Петрухина. - Ростова н/Д.: Феникс, 2006. - 144 с.
11. Носков Н.А. Гастроэнтерология. Актуальная лекарственная терапия: учебн.-дел. пособие / Н.А. Носков. - Ростова н/Д.: Феникс, 2008. - 395 с.
12. Питер Р. Мак Нели Секреты гастроэнтерологии // Питер Р. Мак Нели; под ред. проф. З.А. Апросиной. - Г.: Изд-во Бином, 2005. - 928 с.
13. Полушкина Н.Н. Диагностический справочник гастроэнтеролога / Н.Н. Полушкина. - Г.: АСТ, 2007. - 670 с.
14. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. - 1979. - Т. 247, № 6. - С. 1513-1516.
15. Сейфеддин М.С. Сравнение активности современных и перспективных антиоксидантов на модели аспириновой язвы / М.С. Сейфеддин, Т.О. Куценко, К.Г. Щокина // Вестник фармации. - 2004. - № 3 (39). - С. 72-75.
16. Сейфеддин М.С. Патогенетическое обоснование необходимости применения антиоксидантных препаратов при язвенной болезни и их характеристика / М.С. Сейфеддин, С.М. Дроговоз, Т.О. Куценко, К.Г. Щокина // Клиническая фармация. - 2004. - Т. 8, № 2. - С. 27-30.
17. Сопоставление антиоксидантных свойств новых препаратов, производных биофлавоноидов и дубильных веществ / Л.В. Яковлева, О.А. Герасимова, И.В. Карбушева, Н.Д. Бунятян, Т.С. Сахарова // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2001. - Т. 64, № 2. - С. 55-59.
18. Яковлева Л.В. Анализ результатов клинических испытаний врачебных препаратов, разработанных в НФаУ / Л.В. Яковлева // Клиническая фармация. - 2000. - Т. 4, № 2. - С. 63-65.
19. Яковлева Л.В. Альтан - новый препарат для лечения язвенной болезни желудочно-кишечного тракта / Л.В. Яковлева, О.С. Евдокимова // Вестник фармации. - 1993. - № 1-2. - С. 96 - 103.

20. Bandyopadhyay S.K., Pakrashi S.C., Pakrashi A.J. // *Ethnopharmacol.* 2000. - Vol. 70, №2. - P. 171-176.
21. Bast A. Oxidants and antioxidants: State of the art / A. Bast, R. M. M. Guido, C. I. A. Doclam // *Americ. T. Med.* - 1991. - Vol. 91, № 3. - P. 12-13.
22. Bigby M. Cutaneous reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review / M. Bigby, R. Stern // *J. Amer. Acad. of Dermatol.* - 1985. - Vol. 12, № 5. - P. 866-876.
23. Brune K. In *Pharmacology of inflammation* / K. Brune, R. Zauz. - Amsterdam; New York; Oxford: Mosby, 1985. - P. 413-419.
24. Klein H., Cremer G. // *Rheumamediz.* - 1991. - Vol. 4. - P. 136-141.
25. Loeb D.S. Management of gastroduo-denopathy associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs / D.S. Loeb, D.A. Ahlquist, N.J. Talley // *Mayo Clin. Proc.* - 1992. - Vol. 29, № 67. - P. 354-364.
26. Martin M., La-Cosa C., Alarkon-de-la Lastra C. et al. // *Z. Naturforsch. [C]* - 1998. - Vol. 53, №1-2. - P.82-88.
27. Suzuki Y., Ishihara M., Segami T., Ito M. // *Jpn. J. Pharmacol.* - 1998. Vol. 78, №4. - P. 435-441.
28. Yamaguchi F., Saito M., Ariga T. et al. // *Fgric. Food Cytm.* 2000. - Vol.48, №6. - p. 2320-2325.
-

8. Изучение влияния ВРГФ на процессы цитолиза, ПОЛ и антиоксидантной защиты у крыс в условиях субхронического поражения печени этанолом и тетрахлорметаном

В соответствии с современными представлениями о патогенезе развития патологий, одним из пусковых механизмов есть инициация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран, которая сопровождается их разрушением, образованием свободных радикалов, перекисей липидов и активацией факторов воспаления –

биогенных аминов, кининов, простагландинов, лейкотриенов. Излишек перекисей липидов нарушает физико-химическую структуру мембран клеток и ингибирует их ферментные системы, инактивирует цитоплазматические ферменты, деполяризует нити ДНК, расщепляет АТФ и аминокислоты, снижает активность тиоловых ферментов, что приводит к развитию альтеративных и эксудативных процессов в тканях. Учитывая это, для коррекции таких патологий применяют антиоксиданты, которые за счет антиоксидантных, мембраностабилизирующих, сосудокрепляющих и противовоспалительных свойств нормализуют активность процессов ПОЛ и восстанавливают функции антиоксидантной системы. Антиоксидантами являются БАВ синтетического, природного и растительного происхождения. Опираясь на то, что по данным литературы ВРГФ проявляет антиоксидантные свойства, целесообразно изучение влияния ВРГФ на процессы цитолиза, ПОЛ и антиоксидантной защиты у крыс в условиях субхронического поражения печени, вызванного этанолом и тетрахлорметаном (CCl_4). Последние ингибируют микросомальные ферменты печени, активируют ПОЛ в гепатоцитах и являются классическими мембранотоксинами. Также, интоксикация тетрахлорметаном является классической моделью поражения субклеточных мембран гепатоцитов, а применение этанола усиливает патологию за счет ингибирования микросомальных ферментов печени, которая приводит к интоксикации организма продуктами распада мембран гепатоцитов. При этом вследствие метаболизма тетрахлоретана в организме образуются продукты свободнорадикальной природы, которые являются индукторами ПОЛ, в результате которых нарушается структура клеток печени и их основные функции.

В качестве препарата сравнения был выбран классический растительный гепатопротектор „Карсил”, действующим веществом которого является комплекс флавоноидов под общим названием „Силимарин”, полученный из плодов розторопши пятнистой и который обуславливает антицитолитические, антиоксидантные и противовоспалительные свойства,

которые, в свою очередь, обуславливают гепатопротекторное действие Карсила.

Материалы и методы

Исследование проводили на белых беспородных крысах массой 180-200 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 – интактный контроль; 2 – контрольная патология; 3 – леченная ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг; 4 – леченная Карсилом в дозе 25,2 мг/кг [1]. Согласно методическим рекомендациям [1] субхронический гепатит вызвали внутрижелудочным введением этанола и тетрахлоретана крысам по определенной схеме на протяжении 6 суток: сначала вводили 50 % масляный раствор тетрахлоретана в дозе 0,4 мл/100 г массы тела, через 2 часа – вводили 40 % водный раствор этанола в дозе 1,3 мл/100 г массы тела. Объекты исследования ВРГФ и Карсил вводили животным в лечебном режиме ежедневно на протяжении 6 суток через 2 часа после введения этанола [1]. ВРГФ вводили в условнотерапевтической дозе 1,8 мл/кг, которая была определена в предыдущих исследованиях. Препарат сравнения Карсил использовали в дозе 25,2 мг/кг, значение которой для крыс рассчитывали по Ю. Р. Рыболовлеву и соавторам. [2] с использованием коэффициента перерасчета из суточной дозы Карсила для человека, который составляет 210 мг (по 2 драже 3 раза на день). На 7-е сутки крыс взвешивали и выводили из опыта методом декапитации в условиях барбитурового наркоза. Функциональное состояние печени крыс оценивали с помощью таких показателей: выживаемость животных, динамика массы тела, массовый коэффициент печени (МКП), биохимические показатели, которые определяли в гомогенате печени и в сыворотке крови [1]. В сыворотке крови определяли активность цитолитических ферментов аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) [1]. Интенсивность процессов ПОЛ и состояние антиоксидантной защиты оценивали по содержанию диеновых конъюгатов (ДК), ТБК-реактантов и восстановленного глутатиона (G-SH) в гомогенате печени [1]. Результаты исследования статистически обработаны с помощью методов математической статистики [3,4] и представлены в таблицах 8.1-8.3.

Результаты исследования

Таблица 8.1

Динамика массы тела, выживаемость и масса печени в условиях субхронического гепатита, вызванного тетрахлорметаном и этанолом

Показатель	Условия опыта			
	Итактный контроль	Контрольная патология	ВРГФ, 1,8 мл/кг	Карсил, 25,2 мг/кг
Исходная масса тела, г	193,13±2,66	210,00±1,29*	208,33±3,80*	186,88±2,66
Масса тела в конце опыта, г	207,50±5,17	200,00±2,89	205,83±6,25	182,50±3,54*
Динамика массы тела, %	+7,5%	-5,0%	0	0
Выживаемость, %	100	75	75	100
Масса печени, г	6,48±0,12	10,16±0,48*	9,73±0,24*	7,74±0,29 ^{*/**}
МКП,	3,13±0,08	5,08±0,21*	4,74±0,15*	4,25±0,18 ^{*/**}

Примечания:

* - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, $P \leq 0,05$;

** - отклонение показателя достоверно по отношению к группе контрольной патологии, $P \leq 0,05$.

Таблица 8.2

Показатели активности цитолитических ферментов в сыворотке крови крыс в условиях субхронического гепатита, вызванного тетрахлорметаном и этанолом

Показатель	Условия опыта			
	Итактный контроль	Контрольная патология	ВРГФ, 1,8 мл/кг	Карсил, 25,2 мг/кг
АлАТ, ммоль/гхл	0,37±0,02	1,05±0,06*	0,82±0,04 ^{*/**}	0,80±0,04 ^{*/**}
АсАТ, ммоль/гхл	0,38±0,02	0,82±0,06*	0,54±0,06 ^{*/**}	0,54±0,04 ^{**}

Примечания:

* - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, $P \leq 0,05$;

** - отклонение показателя достоверно по отношению к группе контрольной патологии, $P \leq 0,05$.

Показатели системы ПОЛ-АОС в гомогенате печени крыс в условиях субхронического гепатита, вызванного тетрахлорметаном и этанолом

Показатель	Условия опыта			
	Итактный контроль	Контрольная патология	ВРГФ, 1,8 мл/кг	Карсил, 25,2 мг/кг
ДК, мкмоль/г	3,93±0,84	7,92±0,0,62*	5,34±1,17	5,79±0,88
ТБК-реактанты, мкмоль/г	92,96±10,49	181,63±36,91*	119,66±21,11**	201,94±29,24*
G-SH, у.е.	26,97±1,06	12,93±1,45*	44,49±9,00 ^{*/**/*} **	18,14±5,09

Примечания:

* - стандартное отклонение показателя по отношению к группе интактного контроля, $P \leq 0,05$;

** - стандартное отклонение показателя по отношению к группе контрольной патологии, $P \leq 0,05$;

*** - стандартное отклонение показателя по отношению к группе Карсила, $P \leq 0,05$.

Приведенные в таблицах 8.1-8.3 результаты исследования свидетельствуют о том, что формирование у животных группы контрольной патологии токсичного поражения печени, обусловленного прооксидантным и мембраноповреждающим действием тетрахлоретана и этанола, проявляется достоверным по отношению к группе интактного контроля нарушением геодинамики и трофических процессов в печени (летальность крыс в группе равна 25%, снижение массы тела на 5%, достоверное в сравнении с группой интактного контроля, рост массы печени и МКП) (табл. 8.1), развитием цитолиза (в сыворотке крови достоверное повышение по отношению к группе интактного контроля активности АЛат и АсАТ в 2,9 и 2,2 раза соответственно) (табл. 8.2), активацией процессов перекисного окисления липидов (в гомогенате печени достоверный в сравнении с интактным контролем рост уровней ДК в 2,02 раза и ТБК-реактантов в 1,96 раза), с которыми связано истощение функций антиоксидантной системы организма животных (достоверное в сравнении с интактной группой истощения запасов G-SH в гомогенате печени в 2,1 раза) (табл. 8.3).

ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг и препарат сравнения Карсил в дозе 25,2 мг/кг способствуют восстановлению геодинамики и трофических процессов в печени крыс на фоне субхронического гепатита, вызванного тетрахлорметаном и этанолом. Так, значение массы тела животных на 7-е сутки опыта отвечало исходному уровню, в то время как масса тела крыс группы контрольной патологии снизилась на 5%. ВРГФ в отличие от Карсила незначительно снижал массу печени, которое отображалось на показателе МКП (табл. 8.1) и свидетельствует о незначительных противовоспалительных свойствах ВРГФ, который был применен в выбранной дозировке и схеме введения в данной модельной патологии.

Выраженные аналогичные антицитолитические свойства ВРГФ и Карсила отображаются в достоверном в сравнении с группой контрольной патологии одинаковом снижении уровней АлАТ – в 1,3 раза и АсАТ – в 1,5 раза (табл. 8.2).

На этой модели в отличие от Карсила, который не проявил возможного антиоксидантного эффекта, ВРГФ достоверно в сравнении с группой контрольной патологии снижал в 1,5 раза уровень конечных продуктов ПОЛ, ТБК-реактантов, в гомогенате печени к интактным значениям, которые указывает на его выраженные антиоксидантные свойства и на преимущество над препаратом сравнения Карсилом (табл. 8.3). Под влиянием ВРГФ и Карсила наблюдали также недостоверное в сравнении с группой контрольной патологии снижения концентрации в гомогенате печени крыс промежуточных продуктов ПОЛ, ДК, - в 1,5 и 1,3 раза соответственно (табл. 8.3).

В отличие от Карсила под влиянием ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг наблюдали стимуляцию функции антиоксидантной защиты организма животных, о чем свидетельствует достоверный рост в гомогенате печени уровня главного фермента этой системы восстановленного глутатиона (G-SH) в сравнении с интактным контролем – в 1,65 раза, а с контрольной патологией – в 3,44 раза. Описанные изменения свидетельствуют о способности ВРГФ ограничивать на разных уровнях процессы ПОЛ и таким образом

лимитировать не только процессы свободно радикального окисления, но и замедлять каскад цитолитических процессов.

Вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что в условиях субхронического токсичного гепатита ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг и препарат сравнения Карсил в дозе 25,2 мг/кг проявляют цитопротекторное действие, которое обусловлено антицитолитическими, антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами. Но полученные результаты отображают преимущество ВРГФ над Карсилом, которое проявляется значительно более выраженными антиоксидантными свойствами, и позволяет допускать прямое антиоксидантное действие ВРГФ, в то время как Карсил, действующим веществом которого является сумма полифенолов силимарин, является косвенным антиоксидантом. При этом следует отметить, что суммарная доза фуллерена C_{60} , данная в виде ВРГФ, была в $6,3 \times 10^5$ раз меньше, чем суммарная доза Карсила.

Таким образом, на фоне экспериментального субхронического токсичного гепатита, вызванного тетрахлорметаном и этанолом, ВРГФ в дозе 1,8 мл/кг оказывает выраженную антиоксидантное, антицитолитическое и мембраностабилизирующее действие, улучшая функциональную активность гепатоцитов, уменьшая выраженность цитодеструктивных процессов, тормозя процессы перекисного окисления липидов и восстанавливая антиоксидантную защиту организма подопытных животных.

Литература

1. Доклинические исследования лекарственных средств (методические рекомендации) / Под редакцией: член-кор. АМН Украины О.В. Стефанова - К.: Авицена, 2001 г. - С.334-349.
2. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. (1979) Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. Доклады АН СССР. - Т. 247.- № 6.- С. 1513-1516.
3. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - Г.: Ремедиум. - 2000. - С. 349-454.
4. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медикобиологических исследованиях с использованием Excel. - 2001. - 320с.