

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СУБСТАНЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ

А. В. Бузлама¹, А. И. Сливкин¹, Ю. Н. Чернов², И. В. Фролова¹

¹ Воронежский государственный университет,

² Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Поступила в редакцию 01.02.2009 г.

Аннотация. Исследование посвящено экспериментальному доклиническому исследованию регенераторной и противовоспалительной активности растительных полифенольных соединений — солей гуминовых кислот, получаемых из леонардита. На модели термической ожоговой раны установлено, что раствор гумата леонардита обладает регенераторной активностью, что послужило обоснованием для создания на его основе 5,0 % липофильной мази. Установлено, что мазь гумата леонардита ускоряет заживление, препятствует развитию воспалительного процесса на ожоговых участках, нормализует поведенческую активность животных, предотвращает характерные патологические изменения внутренних органов. Доказано, что мазь гумата леонардита обладает регенераторной и противовоспалительной активностью, превосходящей таковую для препарата сравнения — облепихового масла.

Ключевые слова: растительные полифенолы, гуминовые вещества, экспериментальная фармакология, ожоги, противоожоговое действие, противовоспалительная активность.

Abstract. The article concerns the experimental preclinical studies of plant polyphenol's — leonardit's humic substance — regenerative and anti-inflammatory activity. On the experimental third-degree flash-burn it was determined, that the leonardit's humic substance solution and humic substance contained 5,0 % burn ointment can normalize animal's behaviour, prevent organ's pathological overpatching, significantly decrease the burn's area and revealed anti-inflammatory activity. Consequently, it was proved leonardit's humic substance antipyrotic and anti-inflammatory activity.

Keywords: plant polyphenols, humic substance, experimental pharmacology, flash-burn, antipyrotic activity, anti-inflammatory activity.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение свойств полифенольных соединений природного происхождения является актуальной задачей медицины, так как данные вещества обладают широким спектром биологической активности. В частности представляют интерес и практически не изученные гуминовые вещества и их соли — гуматы, получаемые из различных природных объектов [3]. В связи с вышеизложенным, цель исследований — изучение регенераторных и противовоспалительных свойств гуматов, получаемых из леонардита, на модели экспериментальной ожоговой раны.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проведены на белых беспородных крысах самцах общим количеством 75 голов массой тела 310 ± 10 г. Эксперименты осуществ-

влены в 2 этапа. На первом этапе проводили предварительную оценку регенераторной активности раствора солей гуминовых кислот леонардита. В данной серии опытов использовали 20 животных — 2 группы контрольная и опытная по 10 крыс в каждой. На втором этапе проведена комплексная оценка эффективности разработанной нами мази, содержащей гумат леонардита. В качестве препарата сравнения использовали масло облепиховое производства ЗАО «Алтайвитамины». Эксперименты во второй серии опытов были проведены на 55 животных из 4 групп: интактная (10 крыс), контрольная и 2 опытных группы для мази гумата и масла облепихового (по 15 крыс в каждой). Контрольной группе животных никакие препараты на поверхность ожога не наносили, т.е. заживление ожоговых ран проходило самостоятельно.

В соответствии с требованиями Хельсинской декларации по гуманному обращению с животными [5], нанесение ожогов проводили на фоне

© Бузлама А. В., Сливкин А. И., Чернов Ю. Н., Фролова И. В., 2009

внутримышечного введения нейролептика фенотиазинового ряда ксилозинола в дозе 10 мг/кг. Моделирование ожоговой раны проводили с использованием электрического устройства для контактного термического ожога, сконструированного на кафедре ФЧЖ ВГУ [6]. Устройство обеспечивает стабильную температуру 100° С, площадь контактной металлической пластины 214 мм², время аппликации 10 секунд. Степень ожога — IIIa, средняя по всем группам исходная площадь каждого на 1-й день 232,8 ± 6,5 мм², общая — около 15,0 % от площади поверхности тела. Каждому животному наносили 2 симметричных ожога на предварительно депилированные участки кожи заднебоковой поверхности тела по обе стороны от позвоночника. В опытных группах один участок являлся контрольным: в группе «масло» заживление проходило самостоятельно, в группе «гумат» на поверхность ожога наносили основу мази. Второй участок являлся опытным, на его поверхность ежедневно 1 раз в день в течение всего срока наблюдения наносили в соответствии с группами изучаемые «препараты» — масло облепиховое (0,15 мл), 5,0 % раствор гумата (0,15 мл), 5,0 % мазь гумата (0,15 г).

Площадь ожога измеряли планиметрическим способом. Измерения производили на 1-й день после нанесения ожога и затем через каждые 5 дней до полного заживления.

В качестве критериев регенераторной активности использовали абсолютные и относительные показатели, сравнения проводили с контролем и с исходными значениями по группам:

- абсолютная площадь ожога — выражалась в квадратных миллиметрах,
- степень заживления ожога — вычислялась в процентах как изменение площади по отношению к исходной по группе.

Для оценки изменения поведенческой активности животных проводили тест «открытое поле» на 1, 7, 20 день. Использовали стандартную модель поля для крыс — манеж 80×80 см, разделенный на 16 квадратов со стороной 20 см, размер отверстия «норки» 3,8 см. Время наблюдения — 5 минут. На 12 день после нанесения ожога у животных контрольной группы и опытной группы «гумат» провели забор крови для определения общепринятыми методами СОЭ и количества лейкоцитов. По окончании эксперимента животных умерщвляли хлороформным наркозом и затем осуществляли патолого-анатомические исследования [5]. Внутренние органы взвешивали на электронных весах

и производили перерасчет относительной массы в граммах на 1000 г массы тела животного. Общая длительность наблюдения составила 28 дней. Математическая обработка результатов проводилась методами медико-биологической статистики [2] с определением достоверности изменений при помощи *t*-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перед проведением собственно экспериментальной части исследования предварительно была осуществлена оценка местно-раздражающего действия 5,0 % раствора и 5,0 % липофильной мази гумата леонардита в соответствии с общепринятыми методиками [4, 5]. Установлено, что 5,0 % раствор гумата при исследованиях методом накожных аппликаций и «пробирочным методом» не вызывает покраснения, отека, изъязвления кожных покровов, изменения поведенческой активности животных. Изучаемая 5,0 % мазь гумата и основа мази при нанесении на кожные покровы так же не вызывают вышеперечисленных патологических изменений. Таким образом, не выявлено местно-раздражающего действия изучаемых 5,0 % раствора и мази гумата леонардита.

На первом этапе исследований установлено, что применение раствора гумата к 14 дню наблюдений обеспечило достоверное ($P < 0,05$) снижение площади ожоговой раны на 40,7 % по абсолютным значениям, что соответствовало улучшению степени заживления на 24,4 % по сравнению с контрольной группой. Таким образом, выявлено, что изучаемый 5,0 % раствор гумата леонардита обладает регенераторными свойствами. Результаты проведенных исследований послужили теоретическим обоснованием для создания мази на липофильной основе (вазелин с ланолином 1:1), содержащей 5,0 % субстанции гумата леонардита. Состав и процентная концентрация мази были подобраны опытным путем.

На втором этапе исследований установлено, что в контрольной группе на 7 день после нанесения ожога площадь участков увеличилась на 5,3 %, в дальнейшем наблюдалось постепенное заживление ожоговой раны — на 24,3 % (12 день), 52,4 % (16 день), 83,0 % (20 день) и 97,8 % (28 день). На фоне применения мази гумата через 7 дней отсутствовало увеличение площади ожоговых участков по отношению к исходным значениям. Степень заживления опытных участков являлась на 9,4 % лучшей при сравнении с контрольными участками данной группы (основа мази), на 25,4 % лучшей

при сравнении с контрольной группой ($P < 0,05$) и на 19,2 % лучшей по сравнению с облепиховым маслом. В дальнейшем улучшение степени заживления при сравнении с контрольной группой сохранялось, однако имело менее интенсивную динамику — на 17,9 % (12 день), 27,1 % (16 день), 5,6 % (20 день) и 2,2 % на 28 день (рис. 1).

При визуальном осмотре ожоговых участков на фоне применения мази гумата в течение всего периода наблюдений отсутствовали признаки воспаления, тогда как в контрольной группе с 3 по 20 день у 50,0 % животных в зоне ожоговых участков наблюдалось наличие краевой гиперемии, зон глубокого некроза и серозно-гнояного экссудата. К 28-му дню наблюдений на фоне применения мази гумата наблюдалось полное заживление поврежденных участков по «первичному натяжению», оставался тонкий рубец вытянутой формы, образованный соединительной тканью с частичными признаками эпителизации.

При оценке результатов общего анализа крови установлено, что на 12 день в контрольной группе наблюдалось повышение СОЭ на 33,3 % и лейкоцитов на 30,8 %. На фоне применения мази гумата выявлено снижение СОЭ на 12,5 % и уменьшение лейкоцитоза на 14,3 %. Данные изменения являлись недостоверными, однако характеризуют тенденцию к снижению выраженности воспалительного процесса, что дополнительно подтверждает результаты визуальных наблюдений за заживлением ожогов.

В процессе клинических наблюдений установлено, что на 1-е сутки после нанесения ожога во

всех группах снижалось потребление корма при повышении потребления воды. При тестировании в «открытом поле» у животных контрольной группы через 1 сутки после нанесения ожога наиболее характеристическим изменением можно считать относительное к интактной группе повышение груминга в 2,0 раза. Указанный результат, вероятно, объясняется стремлением животных поддерживать поврежденные ожогом кожные покровы в чистом состоянии. Тестирование опытной группы животных в данный период не проводилось, так как исследование проведено до первого нанесения препарата на ожоговые участки. Через 7 дней в интактной группе наблюдалось повышение дефекации на 67,0 % выше исходного, что как правило объясняют физиологичным для здоровых животных поведением по «маркировке» территории. Показательно, что в контрольной группе дефекация отсутствовала ($0,0 \pm 0,0$), тогда как на фоне применения мази гумата наблюдалось повышение данного показателя в 2,5 раза при сравнении с контролем. В контроле сохранялось повышение груминга в 4,54 раза выше, чем в интакте. Применение мази гумата обеспечило снижение груминга на 16,7 % по сравнению с контролем.

К 20 дню в контрольной группе наблюдалось отсутствие груминга, что вероятно следует объяснять частичным заживлением ожоговых повреждений, все остальные показатели являлись сниженными по отношению к интакту и к исходным значениям. На фоне применения мази гумата к 20 дню выявлено повышение различных видов поведенче-

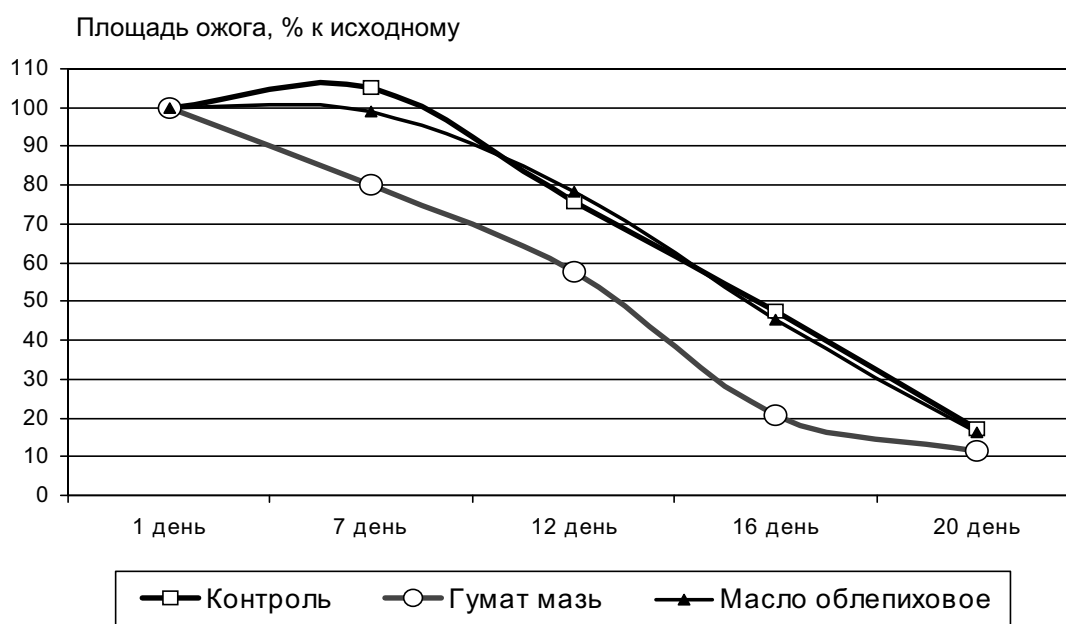


Рис. 1. Динамика заживления экспериментальных ожогов на фоне применения мази гумата леонардита

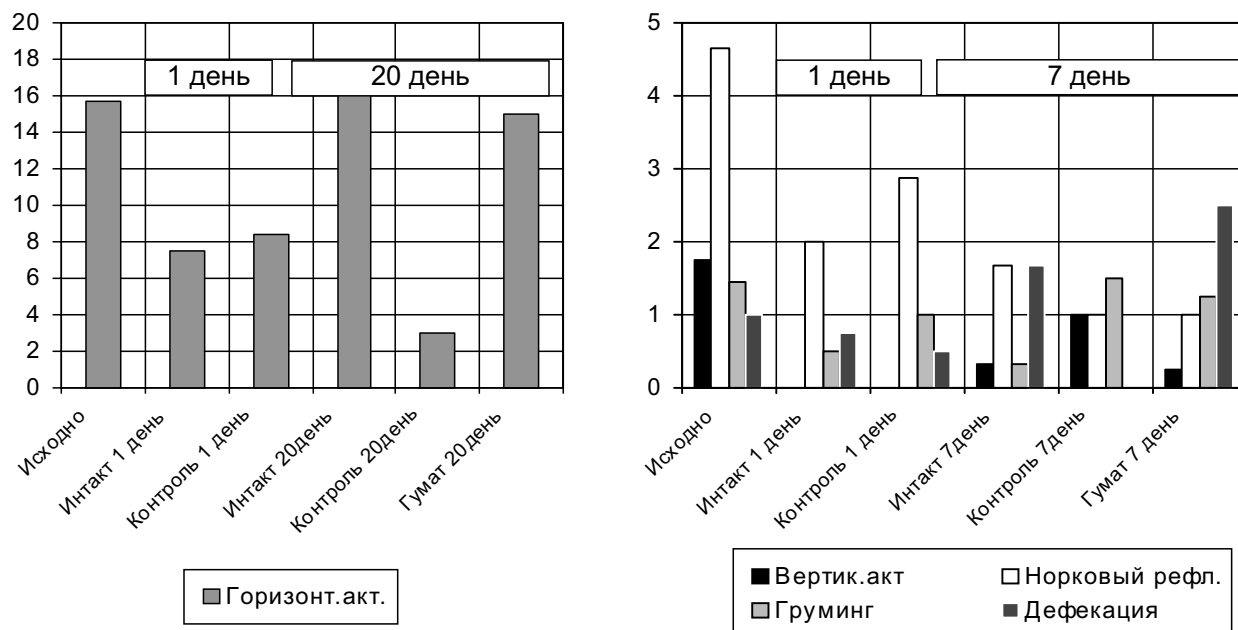


Рис. 2. Динамика изменения поведенческой активности при экспериментальных ожогах (представлены наиболее значимые по срокам изменения)

ской активности при сравнении с контролем. Наиболее выраженным являлось повышение горизонтальной активности — в 5,0 раз при сравнении с контролем (рис. 2).

Таким образом, по данным теста «открытое поле» можно сделать вывод о нормализации поведенческой активности животных опытной группы, что косвенно свидетельствует об улучшении их общего клинического состояния на фоне применения изучаемой мази гумата.

При проведении патолого-анатомических исследований установлено, что через 1 сутки после нанесения ожога в контрольной группе наблюдалась инволюция селезенки и тимуса соответственно на 33,0 % и 36,9 %, гипертрофия надпочечников на 20,7 %. У 83,3 % животных выявлено развитие ulcerogenesis, количество язв составило $22,8 \pm 18,6$ штук площадью $10,4 \pm 5,82$ мм². Масса тела животных контрольной группы снизилась на 12,9 %. Данный комплекс изменений характеризует классическую реакцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем организма на стресс, вызванный нанесением ожоговой раны. Патолого-анатомическое исследование в опытной группе в данный период не проводилось, т.к. представлялось маловероятным наличие изменений после однократного местного нанесения препарата.

Через 28 дней в интактной, контрольной и опытной группах не было выявлено язвенных по-

ражений, т.к. средний срок рубцевания язв обычно составляет около 4-х недель, следовательно произошло их заживление. В контроле сохранялась инволюция тимуса на 58,6 % при сравнении с интактом, применение мази гумата обеспечило повышение массы тимуса на 63,0 %. Изменения массы селезенки и надпочечников в контрольной группе являлись реципрокными по отношению к 1 суткам — масса селезенки увеличилась на 64,5 %, а масса надпочечников снизилась на 31,0 % по отношению к интакту. В опытной группе на 28 день масса селезенки оказалась ниже на 48,0 % при сравнении с контролем, масса надпочечников увеличилась на 30,0 % при сравнении с контролем (табл. 1).

Указанные изменения характеризуют предотвращение увеличения массы селезенки, гипотрофии надпочечников и инволюции тимуса на фоне применения изучаемой мази, что косвенно подтверждает ее фармакологическую активность.

Следует предположить, что гумат леонардита проявляет не только местное, но и резорбтивное действие, т.к. вероятно всасывается через поврежденные ожогом кожные покровы, оказывая системные противовоспалительные эффекты. Возможно, противовоспалительные свойства гумата леонардита связаны с наличием известной по литературным данным [1] антибактериальной активности гуминовых веществ. Однако данное предположение требует дополнительного подтверждения.

Оценка изменения массы внутренних органов при экспериментальных ожогах

Показатель	Относительная масса органов, г/1000 г массы		
	Селезенка	Тимус	Надпочечники
Интакт	4,00 ± 0,50	1,11 ± 0,12	0,29 ± 0,02
Контроль, 1 день	2,68 ± 0,41 ⁺	0,70 ± 0,15 ⁺	0,35 ± 0,04
разница с исходным, %	-33,0	-36,9	+20,7
Контроль, 28 день	6,58 ± 0,64 ⁺⁺	0,46 ± 0,27 ⁺	0,20 ± 0,05
разница с интактом, %	+64,5	-58,6	-31,0
Гумат мазь, 28 день	3,42 ± 0,22 ^{**}	0,75 ± 0,12 ⁺	0,26 ± 0,02
разница с интактом, %	-14,5	-32,4	-10,3
разница с контролем, %	-48,0	+63,0	+30,0

Примечание: ⁺ — $P < 0,05$; ⁺⁺ — $P < 0,01$ — достоверность различий при сравнении с интактом, ^{**} — $P < 0,01$ — достоверность при сравнении с контролем.

ВЫВОДЫ

1. Доказано увеличение скорости заживления ожогов, проявляющееся в более быстром уменьшении их площади по отношению к контрольной группе.

2. Установлено, что применение изучаемой мази гумата способствует нормализации поведенческой активности животных и предотвращению ряда характерных для ожоговой болезни патологических изменений внутренних органов.

3. Выявлено улучшение качества репаративной регенерации при нанесении мази гумата, характеризующееся заживлением ожоговой раны по «первичному натяжению», с частичной эпителизацией и отсутствием признаков гнойного воспаления.

4. В результате проведенных исследований на модели экспериментальных термических ожогов выявлены регенераторные и противовоспалительные свойства разработанной нами 5,0 % липофильной мази гумата леонардита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибактериальная активность гуминового препарата, произведенного из лечебной грязи Джелал-Абадского месторождения Киргизии / Н. З. Гаджиева [и др.] // Биологические науки. — 1991. — № 10. — С. 109—113.

2. Гайдышев И. Анализ и обработка данных: специальный справочник / И. Гайдышев. — СПб.: Питер, 2001. — 127 с.

3. Горовая А. И. Гуминовые вещества / А. И. Горовая, Д. С. Орлов, О. В. Щербенко. — Киев: Наук. думка, 1995. — 304 с.

4. Методы определения токсичности и опасности химических веществ / под ред. И. В. Саноцкого. — М.: Медицина, 1970. — С. 108—114.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В. П. Фисенко [и др.]. — М.: ЗАО «ИИАИ «Ремедиум», 2000. — 398 с.

6. Степанюк Г. И. Устройство для моделирования экспериментальных ожогов / Г. И. Степанюк, В. П. Бобрук // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1990. — №2. — С. 41—42.

Бузлама Анна Витальевна — доцент кафедры фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530380, e-mail: buzlamaa@yandex.ru, buzlama@pharm.vsu.ru

Buzlama A. V. — associate professor of the department of pharmacology, Voronezh State University; e-mail: buzlamaa@yandex.ru, buzlama@pharm.vsu.ru

Сливкин Алексей Иванович — профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530789

Slivkin A. I. — professor, head of the department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh State University; tel.: (4732) 530789

Чернов Юрий Николаевич — профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 371011, 656607

Фролова Ирина Владимировна — аспирант кафедры фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета, тел.: (4732) 530380

Chernov Y. N. — professor, head of the department of clinical pharmacology, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 371011, 656607

Frolova I. V. — Post-graduate student of the department of pharmacology, Voronezh State University, tel.: (4732) 530380