

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДАПТОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЛИГНОГУМАТА

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

¹ Воронежский государственный университет,

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

Поступила в редакцию 28.09.2010 г.

Аннотация. В экспериментальных исследованиях на 190 крысах самцах на модели острого 18-часового иммобилизационного стресса установлено, что соли гуминовых кислот, получаемые при гидролизе лигнина (экспериментальный препарат лигногумат) проявляют адаптогенные свойства. Максимальная эффективность выявлена при однократном внутримышечном введении лигногумата за 1 час до иммобилизации в дозах 1,0 и 10,0 мг/кг. Наиболее выраженным проявлением адаптогенной активности лигногумата является предотвращение стрессорного ulcerogenesis, в меньшей степени — снижение гипертрофии надпочечников и инволюции селезенки. Однако, выраженность адаптогенного действия лигногумата в дозе 10,0 мг/кг уступает эталонному фитоадаптогену — экстракту элеутерококка. Вероятными органами-мишенями адаптогенного действия лигногумата могут являться надпочечники и органы тимико-лимфатической системы, так как установлена способность лигногумата снижать стрессорную лейкопению, вызывать перераспределение и мобилизацию клеток лимфоидного ряда.

Ключевые слова: гуминовые вещества, гуматы, стресс, адаптогены, экспериментальная фармакология

Abstract. In experimental immobilization stress model on 190 mail rats it was determined, that humic acid salts derived from hydrolyzed lignin (lignogumat) reveals adaptogenic activity, that is maximal for once intramuscular injection in doses 1.0 mg/kg and 10.0 mg/kg on scheme 1 hour before stress induction. Most intensive lignogumat's adaptogenic action reveals as blocking stress-induced ulcerogenesis, low adrenals hypertrophy and decrease spleen involution. By the way, lignogumat's adaptogenic activity in dose 10.0 mg/kg is less than eleutherococcus's once. Probably, target organs in lignogumat's adaptogenic action are adrenals and timico-lymphoid system because it was shown lignogumat's ability to decrease stress-induced leukopenia, excite relocation and mobilization of lymphoid cells.

Keywords: humic substance, humate, stress, adaptogen, experimental pharmacology.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что теория стресса и адаптации была сформулирована Гансом Селье более 50 лет назад, а понятие об адаптогенах — Лазаревым Н. В. и Брехманом И. И. в 60—80 годы прошлого века [1, 4], интерес к данной проблеме не ослабевает, предпринимаются новые попытки поиска биологически активных веществ, проявляющих адаптогенные свойства. Одной из групп природных соединений, проявляющих стресс-протекторную, защитно-стимулирующую и адаптогенную активность по литературным данным [2, 3] являются гуминовые вещества. Однако, перечисленные эффекты гуминовых кислот описаны в основном в отношении растений, тогда как адаптогенная их активность в классическом понимании по отношению к организму человека и животных практически

не изучена. В связи с вышеизложенным, целью исследования являлось изучение адаптогенных свойств солей гуминовых кислот, получаемых при гидролизе лигнина (экспериментальный препарат, условно названный лигногумат) на модели острого иммобилизационного стресса, оценка дозозависимости эффекта и разработка оптимальной схемы введения препарата.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проведены на 190 крысах самцах массой 150—165 г. Оценка адаптогенных свойств изучаемого экспериментального препарата лигногумат проводили на классической модели острого иммобилизационного стресса [5] длительностью 18 часов. Исследования проведены в 2 этапа. На первом этапе проводили выбор оптимальной схемы введения препарата и оценку дозозависимости эффекта. На втором этапе проводили сравнение адаптогенной активности лигногумата по выбранной схеме и дозе

с известным эталоном адаптогенной активности — экстрактом элеутерококка. На первом этапе (150 животных, масса 145—160 г) проведено 3 серии опытов, различавшихся схемой введения лигногумата — иммобилизация проводилась через 1, 6 и 24 часа после введения препарата. В каждой серии всех животных разделили на 5 групп по 10 в каждой, из которых три группы являлись опытными, различавшимися по дозе лигногумата (1,0; 10,0; 100,0 мг/кг, однократно внутримышечно), четвертая и пятая — интактные и контрольные животные. Во всех сериях опытов животным контрольных групп инъекцировали соответствующий объем стерильного физиологического раствора; животных интактной группы иммобилизации не подвергали, лишали воды и корма на 18 часов, затем умерщвляли. На втором этапе исследование проведено на 40 крысах самцах с массой тела 150—165 г — 4 группы по 10 голов в каждой. В 2-х опытных группах применяли лигногумат или экстракт элеутерококка, которые вводили однократно парентерально в равных дозах — 10,0 мг/кг массы тела за 1 час до проведения иммобилизации. Лигногумат вводили внутримышечно, экстракт элеутерококка — подкожно. Для выяснения предполагаемых органов и тканей-мишеней действия лигногумата, сразу после окончания иммобилизации у животных интактной, контрольной и опытной группы осуществляли забор крови из хвостовой вены для определения общего содержания лейкоцитов и лейкоцитарной формулы. Производили забор надпочечников, паховых лимфатических узлов и селезенки для гистологических исследований. Результаты подвергали статистической обработке с расчетом средних значений, ошибки среднего и достоверности изменений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что в интактных группах 18-часовое лишение воды и корма сопровождалось

незначительным снижением массы тела на 4,0—5,0 %, язвообразования на слизистой оболочке желудка выявлено не было, относительная масса надпочечников ($0,24 \pm 0,02$ г/1000 г), тимуса ($1,56 \pm 0,12$ г/1000 г), селезенки $5,06 \pm 0,19$ г/1000 г) соответствовала значениям средней видовой-возрастной нормы. Иммобилизация крыс контрольной группы сопровождалась снижением массы тела на 7,7 % и развитием классических проявлений острого стресса — «триады Селье» — язвенными повреждениями слизистой оболочки желудка (частота встречаемости 100,0 %), гипертрофией надпочечников (на 33,3 %), инволюцией органов тимико-лимфатической (тимуса на 31,0 % и селезенки на 33,9 %).

При проведении первого этапа исследований установлено, что наибольшей адаптогенной активностью обладает лигногумат, вводимый за 1 час до начала иммобилизации, максимальная эффективность выявлена для доз 1,0 и 10,0 мг/кг, наибольшее положительное влияние проявлялось в отношении профилактики стрессорного ulcerogenesis, предотвращении гипертрофии надпочечников и спленоконстрикции. Полученные результаты послужили методическим обоснованием к проведению второго этапа исследований: схема введения лигногумата за 1 час до иммобилизации в дозе, равной известной дозе препарата-эталона элеутерококка — 10,0 мг/кг.

При проведении второго этапа исследований установлено, что экстракт элеутерококка предотвращал стрессогенное снижение массы тела на 1,7 % по сравнению с контролем, лигногумат — на 2,9 %, однако изменения не являлись достоверными. Применение лигногумата обеспечило достоверное снижение частоты встречаемости ulcerogenesis на 30,0 % и суммарной длины язв на 78,5 %, что являлось сопоставимым с экстрактом элеутерококка (табл. 1).

Таблица 1

Оценка эффективности лигногумата по критерию «стрессорный ulcerogenesis»

Показатель	Контроль	Лигногумат	Элеутерококк
Частота встречаемости ulcerogenesis, %	80,0	50,0	50,0
разница с контролем, %	—	–30,0	–30,0
Суммарная длина язв, мм	$4,69 \pm 0,39$	$1,01 \pm 0,20^{***}$	$0,99 \pm 0,22^{***}$
разница с контролем, %	—	–78,5	–78,8

Примечание: *** — $P < 0,001$ — достоверность различий при сравнении с контролем.

Морфологические изменения в селезенке на фоне применения лигногумата при иммобилизационном стрессе

Соотношение структур селезенки	Интакт	Контроль	Лигногумат
Белая пульпа, %	31,14	13,50	23,76
разница с интактом, %	0	-17,64	-7,38
разница с контролем, %	—	0	+10,26
Красная пульпа, %	61,60	72,34	70,46
разница с интактом, %	0	+10,74	+8,86
разница с контролем, %	—	0	-1,88
Стромальные структуры, %	7,26	14,16	5,78
разница с интактом, %	0	+6,9	-1,48
разница с контролем, %	—	0	-8,38

Предотвращение гипертрофии надпочечников на фоне введения лигногумата составило 20,8 %, что меньше эффективности элеутерококка (29,1 %). Лигногумат не оказал существенного влияния в отношении изменения массы тимуса (на 3,1 % меньше чем в контроле), что значительно уступает элеутерококку, предотвращение инволюции тимуса для которого составило 25,9 %. Выраженность защитного действия лигногумата в отношении стрессорной спленоконстрикции являлась сопоставимой с элеутерококком и составила 12,0 % и 14,0 % соответственно.

Сводный анализ эффективности лигногумата в сравнении с элеутерококком приведен на лепестковой диаграмме, показатели по группам представлены в виде процентного отношения к интакту, принятому за 100 % (рис. 1).

По данным гистологических исследований установлено, что у животных контрольной группы снижалась объемная доля белой пульпы на 17,64 % при повышении объемной доли красной пульпы и стромальных структур. Таким образом, выявленное снижение массы селезенки (на 33,9 %) вероятно связано с истощением лимфоидных структур. Лигногумат значительно уменьшал опустошение белой пульпы, так как ее объемная доля составила на 10,26 % больше по сравнению с контролем (табл. 2).

В контрольной группе выявлено резкое обеднение лимфоцитами коркового и мозгового вещества лимфоузлов, деструкция основной массы лимфатических фолликулов. Оставшиеся фолликулы размерами до $353,0 \pm 8,11$ мкм, что достоверно на 42,2 % больше чем в интакте ($248,3 \pm 5,93$ мкм). На фоне введения лигногумата лимфоциты распределены в фолликулах равномерно, без светлых зон, средний диаметр фолликулов достоверно меньше на 13,9 % по сравнению с контролем, что характеризует предотвращение опустошения лимфоидной ткани фолликулов лимфоузлов. У животных контрольной группы в клубочковой, внутренней части пучковой и сетчатой зонах надпочечников выявлены обширные скопления клеток с признаками некроботических процессов (пикнотичность ядер, исчезновение границ клеток), васкуляризация сет-

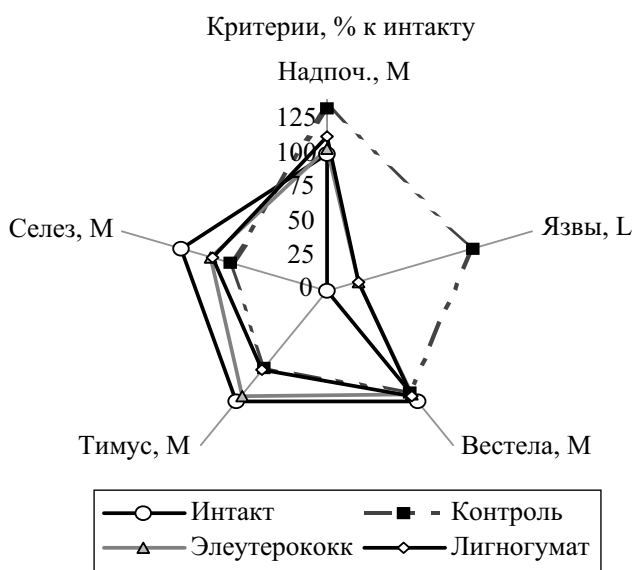


Рис. 1. Комплексная оценка критериев иммобилизационного стресса

Влияние лигногумата на количество лейкоцитов в периферической крови

Показатель	Интакт	Контроль	Лигногумат
Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	13,33 \pm 0,98	12,50 \pm 0,56	15,04 \pm 1,51**
разница с интактом, %	—	-6,2	+12,8
разница с контролем, %	—	—	+20,3

Примечание: ** — $P < 0,01$ — достоверность различий при сравнении показателей в опытной группе с контролем.

чатой зоны слабо выражена. В пучковой зоне большинство клеток с признаками функционального истощения (уменьшенные размеры ядер, вакуолированная цитоплазма); отдельные клетки с признаками гипертрофии (увеличение размеров ядра и цитоплазмы). Данные изменения согласуются выявленной гипертрофией надпочечников (на 33,3 %) и характеризуют их функциональную активацию и последующее истощение. Влияние лигногумата характеризуется снижением выраженности деструктивных процессов — тенденцией к увеличению размеров ядер, снижением количества клеток в состоянии некробиоза в пучковой и клубочковой зонах, повышением кровоснабжения сетчатой зоны.

При подсчете количества лейкоцитов в периферической крови установлено, что в контрольной группе наблюдалась тенденция к снижению количества лейкоцитов на 6,2 % по отношению к интакту. Лигногумат способствовал предотвращению снижения лейкоцитов относительно контроля на 20,3 % (достоверно, $P < 0,01$) (табл. 3).

В контроле наблюдалось достоверное изменение состава лейкоцитарной формулы — снижение палочкоядерных нейтрофилов на 3,0 % (1,8 \pm 0,4 против 4,8 \pm 0,9 в интакте) при повышении количества сегментоядерных на 19,1 % (49,2 \pm 5,1 против 30,1 \pm 3,2) и снижение количества лимфоцитов на 15,5 %. Указанные изменения общего количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы согласуются с результатами патолого-анатомических и гистологических исследований, что следует трактовать как стрессорную лейкопению с перераспределением клеток лимфоидного ряда — выход клеток лимфоидного ряда из тимуса, селезенки, лимфоузлов и крови, преобладание в периферической крови зрелых нейтрофилов с последующей миграцией лимфоцитов, моноцитов и незрелых форм нейтрофилов из крови в ткани. При применении лигногумата направленность изменений соответствовала таковой в контроле (рис. 2), однако, снижение палочкоядерных нейтрофилов являлось

достоверно менее выраженным, превышая показатель контроля на 1,4 % ($P < 0,05$), что в абсолютных значениях соответствует 3,2 \pm 0,6 и приближается к значениям нормы.

ВЫВОДЫ

На модели острого иммобилизационного стресса установлено, что лигногумат проявляет адаптогенную активность, наиболее выраженную в дозах 1,0 и 10,0 мг/кг при однократном внутримышечном введении за 1 час до стресс-воздействия. Наиболее выраженным проявлением адаптогенного действия лигногумата является предотвращение стрессогенного ульцерогенеза, в меньшей степени — гипертрофии надпочечников и инволюции селезенки. На уровне надпочечников лигногумат несколько сглаживает отрицательные последствия стресса, однако полностью не предотвращает их. Антиульцерогенное действие лигногумата и предотвращение стрессорной лейкопении возможно связано с уменьшением гипертрофии надпочечников и снижением концентрации эндогенных глюкокортикоидов (кортизол), проявляющих иммуносупрессивный эффект и способствующих стрессорному ульцерогенезу.

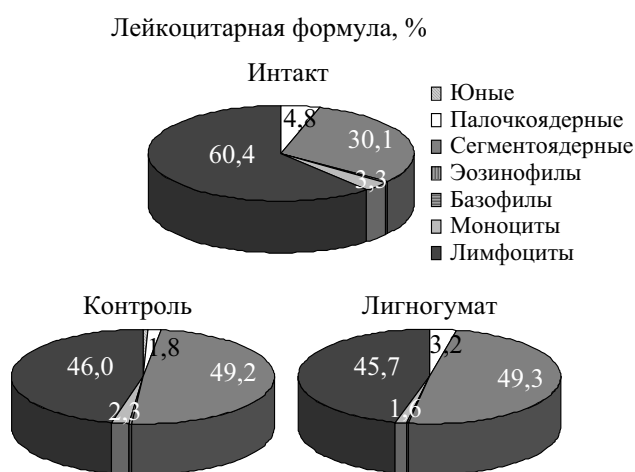


Рис. 2. Лейкоцитарная формула при иммобилизационном стрессе

Комплекс органов лимфоидной системы, возможно, является органами-мишенями в действии лигногумата, что проявляется мобилизацией клеточного звена естественной резистентности в большей степени за счет клеток-фагоцитов нейтрофильного ряда. В целом, результаты исследований подтверждают наличие у лигногумата адаптогенной активности. Однако, при комплексной оценке всех показателей адаптогенная активность лигногумата характеризуется как средняя по степени выраженности, существенно уступая эталонному адаптогену элеутерококку (высокая активность) по большинству показателей, кроме предотвращения язвообразования, где степень их эффективности сопоставима. В связи с вышеизложенным, гуминовые вещества можно считать альтернативными по отношению к классическим фитоадаптогенам препаратами, проявляющими адаптогенную активность средней степени выраженности.

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Брехман И. И.* Элеутерококк / И. И. Брехман. — Л.: Наука, 1979. — 186 с.
2. *Вержук В. Г.* Гуминовые кислоты — биогенные стимуляторы роста растений и повышения стрессоустойчивости / В. Г. Вержук, А. В. Назарова // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: 5-й Международный симпозиум, Пущино, 9—14 июня, 2003 г.: сб. науч. тр. — Пущино, 2003. — С. 128—130.
3. Защитно-стимулирующие и адаптогенные свойства препарата ГУМИ — биоактивированной формы гуминовых кислот. Эффективность его использования в сельском хозяйстве / И. Т. Шаяхметов [и др.]. — Уфа, 2000. — 102 с.
4. *Селье Г.* Очерки об адаптационном синдроме / Г. Селье: пер. с англ. — М.: Медгиз, 1960. — 254 с.
5. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / В. А. Волчегорский [и др.]. — Челябинск: ЧГПУ, 2000. — 167с.

Buzlama A. V. — Medical doctor, associate professor of the department of pharmacology, Voronezh State University; tel.: (4732) 530380, e-mail buzlamaa@yandex.ru, buzlama@pharm.vsu.ru

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

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