

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2011
УДК 615.322.015.44

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО И
АНТИИШЕМИЧЕСКОГО ЭФФЕКТОВ ФИТОЭКДИСТЕРОНА

А.В. Шулькин, В.В. Давыдов, Е.Н. Якушева, А.Г. Краснолобов

ГОУ ВПО Рязанский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения и социального развития, г. Рязань

В исследовании установлено, что курсовое внутрижелудочное введение фитоэкдистерона (ФЭ) в дозе 5 мг/кг массы в течение 7 и 14 дней существенно повышает резистентность нелинейных белых крыс самцов к острой гипобарической гипоксической гипоксии. Назначение ФЭ крысам в течение 3, 7 и 14 дней приводит также к повышению устойчивости изолированных кардиомиоцитов к острой тотальной ишемии. Данные эффекты могут быть связаны со способностью ФЭ (ежедневное введение в течение 7 дней) перестраивать процессы метаболизма в жизненно важных органах, в частности достоверно повышать содержание гликогена в мозге, в миокарде и в печени, глюкозы – в мозге и в миокарде, активность каталазы в печени и активность глутатионпероксидазы в мозге, а также достоверно снижать уровень лактата в мозге и уровень МДА в печени.

Ключевые слова: фитоэкдистерон, гипоксия, ишемия миокарда, перекисное окисление липидов, гликоген, глюкоза, лактат.

Гипоксия, или кислородное голодание, – типовой патологический процесс, возникающий в результате снижения содержания или использования O_2 в тканях, а также чрезмерной нагрузки (когда возросшего количества O_2 не хватает для обеспечения ещё более возросших потребностей тканей организма) [9].

Кислородная недостаточность служит патогенетической основой разнообразных заболеваний человека (разные формы дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности, кровопотери, ишемии миокарда, нарушений мозгового и периферического кровообращения и др.), часто обнаруживается в различных клиниках и является одной из центральных проблем медицины [8]. Поэтому детальное изучение патогенеза гипоксических состояний и разработка новых лекарственных препаратов, обладающих антигипоксической активностью, остаются актуальными проблемами современной

науки и медицины [5].

Экдистероиды – это липофильные полигидроксилированные стероиды, являющиеся гормонами линьки в организме насекомых [16]. В организме млекопитающих они оказывают разнообразные позитивные эффекты: повышают физическую работоспособность, обладают анаболическим, гипополидемическим, антигипергликемическим, иммуностропным и другими видами действия [4, 11].

Цель исследования – изучить антигипоксическую и антиишемическую активность фитоэкдистерона (ФЭ).

Материалы и методы

В эксперименте использовали водную вытяжку из смолёвки поникшей (*Silene nutans*) и смолёвки татарской (*Silene tatarica*), содержащую 0,1% ФЭ. Концентрацию вещества определяли спектрофотометрически при длине волны 242 нм [4].

Работа проведена на 74 нелинейных белых крысах – самцах, массой 230-270 г. Содержание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993. Исследования осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977).

Всего проведено 5 серий опытов. 1 серия – контроль (n=19), представлена крысами, которым ежедневно в течение 14 дней внутрижелудочно вводили дистиллированную воду. 2, 3, 4 серии включали опытных животных, которым профилактически в желудок вводили ФЭ в дозе 5 мг/кг массы в течение 3 дней (два раза в день) (n=12), 7 (n=19) и 14 (n=12) дней (один раз в день). 5 серия представлена крысами (n=12), которым в течение 7 дней внутрижелудочно один раз в день вводили милдронат (МД) («Grindex») в дозе 250 мг/кг массы.

1 и 3 серии включали три подсерии животных, 2, 4 и 5 серии – две подсерии.

Крысы первой подсерии 1, 2, 3, 4, 5 серий (по 7 животных в каждой подсерии) подвергались воздействию тяжелой острой гипобарической гипоксической гипоксии (ОГГГ), которую моделировали подъемом животных на высоту 11000 м со скоростью подъема и спуска 50 м/с. Устойчивость к гипоксии определяли по времени наступления клонико-тонических судорог.

У животных второй подсерии 1, 2, 3, 4, 5 серий (по 5 животных в каждой подсерии) в конце эксперимента (после введения исследуемых веществ) под легким эфирным наркозом вскрывали грудную клетку, отмывали сокращающееся сердце в теплом (t 37,0 °C) физиологическом растворе, извлекали его и затем моделировали тотальную ишемию по методике К.А. Remier et al. (1981) в модификации Н.А. Сысолятиной (1991). Для этого, после отсечения предсердий, миокард желудочков рассекали ножницами на 3 части. Одну часть сразу опускали в фиксирующую жидкость (10% нейтральный формалин), остальные 2 части помещали в

нагретые до 37°C бюксы, на дне которых находилась фильтровальная бумага, смоченная физиологическим раствором. Бюксы плотно закрывали и помещали в термостат при температуре 37°C. Через каждые 15 минут кусочек миокарда извлекали из бюкса и помещали в фиксирующую жидкость. После фиксации кусочки миокарда заливали в парафин и готовили срезы толщиной 8-10 мкм. Для выявления наиболее ранних изменений, обусловленных острым нарушением кровоснабжения миокарда, была использована специальная методика Г. Селье (1958), основанная на выявлении фуксинофильного субстрата. Принято считать, что его появление характерно лишь для самых начальных стадий поражения сердечной мышцы и предшествует развитию как некроза, так и апоптоза. Фуксинофильный субстрат полностью исчезает, когда мышечные волокна дезинтегрируются и находятся в процессе рассасывания. Морфометрию миокарда выполняли с использованием светооптического микроскопа Микмед-2, при увеличении в 280 раз. Микропрепараты фотографировали с помощью цифровой камеры Canon Power Shot G5 с переходником Carl Zeiss. Ввод и анализ изображений осуществляли с использованием компьютера Intel Pentium III и программы Photoshop CS2. Для определения удельной площади (S_A мм²/мм²) фуксинофильного субстрата применяли метод точечного счета [3].

Животных третьей подсерии 1 и 3 серий (по 7 животных в каждой подсерии) после введения в течение 7 дней соответственно ФЭ или дистиллированной воды забивали под легким эфирным наркозом, после чего забирали для исследования головной мозг, сердце и печень. В гомогенатах этих органов определяли содержание глюкозы, молочной кислоты, гликогена – по общепринятым биохимическим методам, малонового диальдегида (МДА) по методу Гавриловой В.Б. и соавт. (1987) [2], свободных и связанных сульфгидрильных (SH) групп по методу Ellman G.L. (1959) [14], активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу Костюк В.А. и соавт. (1990) [6], каталазы по методу М.А. Королюк с соавт. (1988) [1], глута-

тионпероксидазы по методу Paglia D.E., Valentine W.N. в модификации Ланкина В.З. (1976) [7], глутатион-SH-трансферазы по методу J.N. Keen, W.B. Iakoby (1978) [15], глутатионредуктазы по методу J. Carbery, B. Maunervik (1975) [13].

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.1». Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего арифметического значения. Различия между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), тест Ньюмена-Кейсла.

Результаты и их обсуждение

Исследование влияния ФЭ на устойчивость крыс к ОГГГ выявило, что его профилактическое применение в течение 7 и 14 дней повышает резистентность животных на 52,5% ($p=0,013$) и 67,5% ($p=0,0018$) соответственно (рис. 1). Введение ФЭ в течение 3-х дней достоверно не изменяло устойчивость животных к ОГГГ. Превентивное введение МД в течение 7 дней повышало устойчивость животных к гипоксии на 47,5% ($p=0,017$).

При изучении антиишемического эффекта ФЭ и МД, оцениваемого по площади фуксинофильного субстрата, были получены следующие результаты (табл. 1).

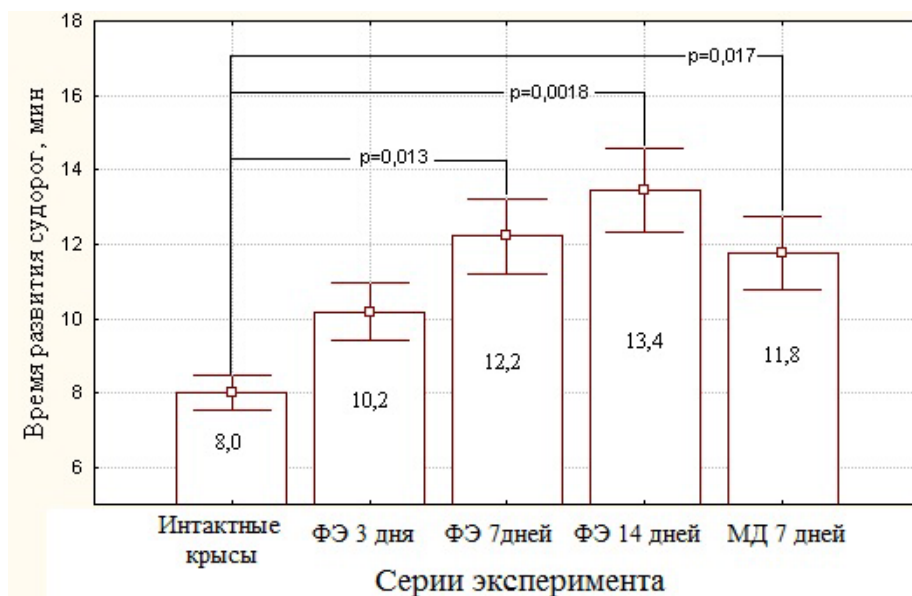


Рис. 1. Влияние ФЭ и МД на устойчивость крыс к острой гипоксической гипобарической гипоксии ($M \pm m$)

Сразу после забоя фуксинофильный субстрат в кардиомиоцитах интактных крыс наблюдался крайне редко, его удельная площадь составляла $0,25 \text{ мм}^2/\text{мм}^2$. Через 15 минут удельная площадь поражения достигала $0,49 \text{ мм}^2/\text{мм}^2$.

30-минутная экспозиция острой тотальной ишемии сердечной мышцы обусловила ещё более выраженную фуксинофилию – удельная площадь поражения достигала $0,61 \text{ мм}^2/\text{мм}^2$.

Таблица 1

Влияние ФЭ и МД на площадь фуксинофильного субстрата ($\text{мм}^2/\text{мм}^2$) при экспериментальной тотальной ишемии миокарда ($M \pm m$)

Серия опытов	Площадь фуксинофильного субстрата в миокарде в динамике ишемии		
	0 минут	15 минут	30 минут
Интактные крысы	0,25±0,019	0,49±0,027	0,61±0,031
Фитоэкдистерон, 3 дня	0,25±0,029	0,28±0,021*	0,37±0,039*
Фитоэкдистерон, 7 дней	0,27±0,025	0,31±0,038*	0,35±0,045*
Фитоэкдистерон, 14 дней	0,24±0,024	0,32±0,033*	0,38±0,041*
Милдронат, 7 дней	0,23±0,021	0,42±0,044	0,47±0,037*

Примечание: каждая серия включала по 5 крыс,

* – достоверные различия ($p < 0,05$) с показателями интактных крыс.

Сразу после забоя крыс, получавших ФЭ, так и, получавших МД, гистологическая картина миокарда не отличалась от контрольной группы. 15-минутная экспозиция миокарда на фоне 3-дневного назначения ФЭ приводила к снижению удельной площади поражения на 42,5% ($p < 0,05$), на фоне 7-дневного введения – на 37,2% ($p < 0,05$), на фоне 14 дневного применения – на 34,3% ($p < 0,05$), а на фоне введения МД – лишь на 13,3% ($p > 0,05$). Через 30 минут ишемии на фоне 3-дневного введения ФЭ удельная площадь фуксинофильного субстрата уменьшилась на 40,1% ($p < 0,05$), на фоне 7-дневного введения ФЭ – на 42,4% ($p < 0,05$), на фоне 14 дневного назначения ФЭ – на 37,2% ($p < 0,05$), а на фоне введения МД – только на 23% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями интактных крыс.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ФЭ обладал отчетливым антигипоксическим действием, которое было даже более значительным, чем у известного лекарственного препарата МД, обладающего выраженным метаболическим и цитопротекторным действием. Данный эффект ФЭ проявлялся как на системном уровне (повышение резистентности организма крыс к ОГГГ), так и на

тканевом (снижение площади фуксинофильного субстрата при тотальной ишемии миокарда).

При изучении механизмов развития данного эффекта установлено (табл. 2), что введение ФЭ в течение 7 дней интактным крысам повышает содержание в миокарде гликогена на 24,9% ($p < 0,05$), глюкозы на 25,6% ($p < 0,05$), в печени – гликогена на 8,9% ($p < 0,05$) и активности каталазы на 28,6% ($p < 0,05$), а также снижает содержание МДА на 28,6% ($p < 0,05$), а в мозге повышает уровень гликогена на 10,7% ($p < 0,05$), глюкозы на 20,3% ($p < 0,05$), активность глутатионпероксидазы на 8,3% ($p < 0,05$) и снижает содержание лактата на 23,5% ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ФЭ положительно влияет на метаболизм исследуемых жизненно важных органов, в частности стимулирует аэробное окисление и снижает анаэробные процессы (судя по уменьшению уровня лактата, повышению содержания глюкозы и гликогена), что может лежать в основе его антигипоксического эффекта [5]. В тоже время, повышение активности каталазы и снижение уровня МДА в печени под влиянием ФЭ может оказывать дополнительное протекторное действие на

Влияние 7 дневного введения ФЭ на биохимические показатели миокарда, печени и мозга ($M \pm m$)

Изучаемые показатели, единицы измерения	Миокард		Печень		Мозг	
	Норма	фитоэкдистерон	Норма	фитоэкдистерон	норма	фитоэкдистерон
Гликоген, мг/г	3,4±0,23	4,25±0,12*	42,3±1,7	46,1±3,3*	1,4±0,11	1,55±0,14*
Лактат, мкмоль/г	5,9±0,45	5,1±0,39	1,9±0,17	1,6±0,12	1,7±0,13	1,3±0,1*
Глюкоза, мкмоль/г	4,3±0,33	5,4±0,43*	6,7±0,55	7,3±0,67	0,7±0,05	0,84±0,06*
Общие SH-группы, мкмоль/мг белка	0,68±0,048	0,65±0,053	0,79±0,045	0,83±0,056	0,39±0,025	0,44±0,039
Свободные SH-группы, мкмоль/мг белка	0,19±0,013	0,18±0,0094	0,17±0,011	0,15±0,0092	0,11±0,0078	0,1±0,0063
МДА, нмоль/мг белка	2,5±0,15	2,8±0,18	2,83±0,18	2,02±0,12*	13,32±1,05	12,64±0,87
СОД, Ед/мг белка	3,36±0,15	3,07±0,24	2,97±0,17	2,79±0,14	4,01±0,27	3,76±0,31
Глутатионпероксидаза, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	21,3±0,86	20,5±1,07	22,5±1,35	21,92±1,15	8,5±0,32	9,2±0,21*
Глутатион-SH-трансфераза, нмоль ХДНБ/ мин× мг белка	53,3±1,9	55,18±2,7	140,69±2,6	138,4±2,7	112,18±3,5	115,83±3,8
Глутатионредуктаза, нмоль НАДФН/ мин× мг белка	22,86±0,8	21,03±0,9	52,26±1,96	48,95±1,77	24,86±1,11	23,56±0,78
Каталаза, МЕ/мг белка	5,58±0,32	5,0±0,38	5,6±0,4	7,2±0,5*	1,24±0,07	1,26±0,06

* – достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с показателями интактных крыс.

гепатоциты. Однако, в наших экспериментах уровень общих и свободных SH-групп, а также активность глутатионредуктазы, глутатион-SH-трансферазы и СОД в исследуемых органах на фоне 7-дневного применения ФЭ у подопытных крыс достоверно не изменялись.

Выводы

1. Курсовое ежедневное введение фитостерона в дозе 5 мг/кг массы в течение 7 и 14 дней приводит к повышению резистентности белых крыс к тяжелой острой гипобарической гипоксической гипоксии.
2. Профилактическое ежедневное применение фитостерона в дозе 5 мг/кг массы в течение 3, 7 и 14 дней повышает устойчивость кардиомиоцитов сердца крыс к тотальной ишемии.
3. Ежедневное применение фитостерона в течение 7 дней приводит к существенным метаболическим перестройкам в жизненно важных органах крыс:
 - а) в миокарде – к повышению уровня гликогена и глюкозы;
 - б) в печени – к увеличению содержания гликогена, активности каталазы и уменьшению содержания МДА;
 - в) в мозге – к повышению уровня гликогена, глюкозы, активности глутатионпероксидазы и снижению количества лактата.
4. Фитостерон оказывает более выраженное антигипоксическое и антиишемическое действие на организм крыс по сравнению с милдронатом.

Литература

1. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина; под ред. В.Х. Хавинсона. – СПб., 2000. – 251 с.
2. Гаврилова В.Б. Анализ методов определения продуктов ПОЛ / В.Б. Гав-

рилова, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мазул // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – №1. – С. 118-120.

3. Гуцол А.А. Практическая морфометрия органов и тканей / А.А. Гуцол, Б.Ю. Кондратьев. – Томск, 1988. – 121 с.
4. Дармограй В.Н. Фармакогностическое изучение некоторых видов семейства гвоздичных и перспективы использования их в медицинской практике: дис. в виде науч. докл. ... д-ра фарм. наук / В.Н. Дармограй. – Рязань, 1996. – 91 с.
5. Зарубина И.В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов. – СПб.: ООО «Изд-во Н-Л», 2004. – 368 с.
6. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.
7. Ланкин В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // *ДАН СССР.* – 1976. – Т. 226, №3. – С. 705-708.
8. Новиков В.Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В.Е. Новиков, Н.П. Катунина // *Обзоры по клинич. фармакологии и лекарственной терапии.* – 2002. – Т. 1, №2. – С. 73-87.
9. Патология: учебник для фарм. вузов: в 2-х т. / под ред. В.А. Черешнева; В.В. Давыдова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 1, 2.
10. Селье Г. Профилактика некрозов сердца химическими средствами / Г. Селье. – М.: Медгиз, 1961. – 321 с.
11. Сыров В.Н. Фитостероиды: биологические эффекты в организме высших животных и перспективы использования в медицине / В.Н. Сыров // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 1994. – № 5. – С. 61-66.

12. Сысолятина Н.А. Влияние бета-адренергических средств на лизосомы миокарда: дис. ... д-ра мед. наук / Н.А. Сысолятина. – М., 1991. – 243 с.
13. Carbery J. Purification and characterization of the flavoenzyme, glutathione reductase from rat liver / J. Carbery, B. Maunervik // J. Biol. Chem. – 1975. – Vol. 250, № 14. – P. 5425-5480.
14. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Archives of biochemistry and biophysics. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70-77.
15. Keen J.N. Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione / J.N. Keen, W.B. Iakoby // Biol. Chem. – 1978. – Vol. 253, № 16. – P. 5854-5858.
16. Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster* / A.F. Simon [et al.] // Science. – 2003. – Vol. 299. – P. 1407-1410.

THE STUDY OF ANTIHYPOXIC AND ANTIISCHEMIC ACTIVITY OF PHYTOECDYSTERONE

A.V. Shchulkin, V.V. Davydov, E.N. Yakusheva, A.G. Krasnolobov

In this research it is established that the phytoecdysterone (PE) administration (per os, 5 mg/kg) for 7 and 14 days increases resistance of the nonlinear white rats to an acute hypobaric hypoxic hypoxia. PE administration for 3, 7 and 14 days increased resistance of isolated cardiomyocytes to acute total ischemia. These effects may be related to the ability of the PE (daily administration within 7 days) to increase the glycogen content in the brain, in the myocardium and in the liver, glucose – in the brain and in the myocardium, catalase activity in the liver, glutathioneperoxidase activity in the brain and to decrease lactate levels in the brain and MDA levels in the liver.

Keywords: *phytoecdysterone, hypoxia, myocardium ischemia, lipid peroxidation, glycogen, glucose, lactate.*

Щулькин Алексей Владимирович – ст. лаборант кафедры фармакологии с курсом фармакотерапии ФПДО ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России.

Адрес: г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34 корп. 2, фармацевтический корпус, 3 этаж
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru.

Якушева Елена Николаевна – д-р мед. наук, доц., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармакотерапии ФПДО ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России.

Давыдов Виктор Викторович – д-р мед. наук, проф. кафедры патофизиологии ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России.

Дармограй Василий Николаевич – д-р фарм. наук, проф., зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России.