

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ГИПОКСИИ МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Лысенко Т.А.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, e-mail: prk@pmedpharm.ru

Основой патогенеза неврологических когнитивных дисфункций является нарушение биохимических процессов мозга: эксайтотоксичность, окислительно-воспалительный каскад стресса, дефицит обновления нейронов. Поэтому, какова бы ни была причина – старение, бактериально-вирусное повреждение мозга (например, при менингите, COVID-19), черепно-мозговые травмы, необходима реабилитационная терапия средствами с нейропротекторным действием. Ведется активный поиск лекарственных веществ, которые могли бы замедлять сценарий развития патологии, стабилизировать запущенные процессы гибели нейронов и повысить вероятность благоприятного исхода течения патологии. Целью настоящего исследования является проведение сравнительного анализа антигипоксической активности экстракта листьев гинкго билоба, экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки, экстракта плодов шиповника при моделировании циркуляторной гипоксии головного мозга у крыс и гипоксической гипоксии у мышей. Антигипоксический эффект экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки и плодов шиповника изучали в дозах 50 мг/кг массы животного (однократное и курсовое профилактическое введение). Полученные результаты показывают, что при однократном введении экстракта листьев гинкго билоба, экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки, экстракта плодов шиповника изменения выживаемости у животных при циркуляторной и гипоксической гипоксии статистически недостоверны. Курсовое профилактическое введение на модели циркуляторной гипоксии в течение 14 дней выявило статистически значимые отличия относительно контрольной серии эксперимента. Так, выживаемость крыс при циркуляторной гипоксии под влиянием экстракта листьев гинкго билоба составила 70%, экстракта плодов пальмы сабаль – 60%, экстракта листьев петрушки и экстракта плодов шиповника – 50%. В контрольной серии выживаемость составила 30%. При гипоксической гипоксии (курсовое введение) наблюдалось статистически значимое увеличение выживаемости мышей при введении раствора экстракта листьев гинкго билоба (55,7%) и раствора экстракта плодов пальмы сабаль (39,1%) относительно контрольной серии.

Ключевые слова: эксперимент, экстракты, гинкго билоба, пальма сабаль, петрушка кудрявая, плоды шиповника, крысы, мозговой кровоток, гипоксия.

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON THE SURVIVAL OF LABORATORY ANIMALS IN VARIOUS TYPES OF BRAIN HYPOXIA IN AN EXPERIMENT

Lisenko T.A.¹

¹The Pyatigorsky Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of the FGBOU VO «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, e-mail: prk@pmedpharm.ru

The basis of the pathogenesis of neurological cognitive dysfunctions is a violation of the biochemical processes of the brain: excitotoxicity, oxidative-inflammatory cascade of stress, deficiency of neuronal renewal. Therefore, whatever the cause – aging, bacterial and viral brain damage (for example, meningitis, COVID-19), traumatic brain injuries, rehabilitation therapy with neuroprotective agents is necessary. An active search is underway for drugs that could slow down the scenario of the development of pathology, stabilize the running processes of neuronal death and increase the probability of a favorable outcome of the course of pathology. The purpose of this study is to conduct a comparative analysis of the anti-toxic activity of ginkgo biloba leaf extract, sabal palm fruit extract, parsley leaf extract, rosehip fruit extract in modeling circulatory brain hypoxia in rats and hypoxic hypoxia in mice. The antihypoxic effect of extracts of ginkgo biloba, sabal palm, parsley leaves and rosehip fruits was studied at doses of 50 mg/kg of animal weight (single and course prophylactic administration). The results obtained show that with a single administration of ginkgo biloba leaf extract, sabal palm fruit extract, parsley leaf extract, rosehip fruit extract, changes in survival in animals with circulatory and hypoxic hypoxia are not statistically significant. A course of preventive administration on a model of circulatory hypoxia for 14 days

revealed statistically significant differences relative to the control series of the experiment. Thus, the survival rate of rats with circulatory hypoxia under the influence of ginkgo biloba leaf extract was 70%, sabal palm fruit extract – 60%, parsley leaf extract and rosehip fruit extract – 50%, while in the control series the survival rate was only 30%. In hypoxic hypoxia (course administration), a statistically significant increase in the survival of mice was observed when a solution of ginkgo biloba leaf extract (55.7%) and a solution of sabal palm fruit extract (39.1%) was administered.

Keywords: experiment, extracts, ginkgo biloba, sabal palm, curly parsley, rosehip fruits, rats, cerebral blood flow, hypoxia.

Не так давно открытый механизм «молекулярного переключения» клеток мозга с целью насыщения его кислородом дал импульс созданию новых лекарственных растительных препаратов для профилактики состояний, вызывающих гипоксию мозга. Актуальность поиска новых средств антигипоксического действия не вызывает сомнений, так как состояний, провоцирующих церебральную гипоксию, довольно много, и даже кратковременный сбой физиологии «молекулярного переключения» может вызвать нарушение кровоснабжения головного мозга, вплоть до развития полной (аноксии) или частичной (гипоксии) кислородной недостаточности, приводящей к гибели нейронов. Аноксия по механизму патофизиологии подразделяется на: аноксическую (в воздухе понижено содержание самого кислорода), анемическую (из-за патологий, связанных с работой гемоглобина), ишемическую (собственно гипоксию), когда поступление кислорода в мозг нарушено по различным причинам. Клиническая картина гипоксии, аноксии имеет прямую связь с зоной поражения головного мозга [1]. Гипоксические состояния мозга имеют широкий разброс с точки зрения клинических проявлений. Это связано с тем, что биохимические и физиологические процессы, наблюдающиеся в организме при различных видах гипоксии, способны очень сильно различаться. Это может быть как незначительная рассеянность («туман в голове»), так и утрата функции [1]. Основные причины появления «мозгового тумана» – физиологические процессы, которые при избыточном стрессе, снижении иммунной реактивности, несбалансированном питании, повышенных физических нагрузках приводят к декомпенсации организма, формируя дисбаланс между поступлением кислорода в мозг и его потреблением [1, 2, 3]. Например, при заражении вирусом COVID-19 воспалительный процесс превращается в «цитокиновый шторм» [2, 3]. Это приводит к появлению когнитивных расстройств, снижению реактивности головного мозга, что может способствовать развитию его нервно-дегенеративных поражений, вплоть до появления психических отклонений. Потеря обоняния связана с повреждением активности мозга, так как повреждаются аксоны обонятельных рецепторов, напрямую связанные с мозгом [2, 3]. Помимо длительности протекания неврологических расстройств, надо отметить и тяжесть «мозгового тумана», который может проявляться головной болью, усталостью, головокружением, судорогами и даже развитием инсульта. Корректирующая

реабилитационная терапия мозговой активности посредством различных препаратов актуальна, так как вещества, обладающие антигипоксической и антиоксидантной активностью, способны улучшать «молекулярное переключение» клеток мозга. Введение синтетических препаратов, в основном, характеризуется выраженностью фармакологического эффекта, скоростью наступления эффекта, но их курсы ограничены по длительности применения. Фитотерапия предлагает более мягкое и длительное воздействие без сильного ущерба для организма в целом [4, 5]. В России очень популярны растительные препараты и биологически активные добавки из гинкго билоба, что говорит об актуальности поиска лекарственных растительных препаратов с целью их использования в корректирующей терапии когнитивных и цереброваскулярных расстройств [46].

Целью настоящего исследования является проведение сравнительного анализа антигипоксической активности растворов сухих экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника при моделировании циркуляторной гипоксии головного мозга у крыс и гипоксической гипоксии у мышей.

Материалы и методы исследования. Антигипоксическую активность исследуемых экстрактов изучали на моделях циркуляторной гипоксии и гипоксической гипоксии. Эксперименты проведены на 100 белых крысах линии Wistar обоего пола, массой 220–250 г, и 100 белых мышах массой 20–24 г, выращенных в стандартных условиях вивария. Манипуляции с экспериментальными животными выполняли в соответствии с общепринятыми этическими нормами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986), и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Все манипуляции соответствовали национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Перед экспериментом и во время эксперимента животные получали пищу и воду без ограничений. Изучение влияния водных растворов экстракта листьев гинкго билоба, экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки, экстракта плодов шиповника на выживаемость животных с циркуляторной гипоксией проводили при однократном профилактическом (1-я серия) и курсовом профилактическом (2-я серия) введении препаратов. Серия включала 5 групп животных по 10 особей в каждой. Антигипоксический эффект исследуемых сухих экстрактов изучался в дозе 50 мг/кг массы животного, что составляет 1/10 от LD₅₀ (однократное профилактическое и курсовое профилактическое введение) при моделировании циркуляторной и гипоксической гипоксии головного мозга. Изучаемые экстракты перед введением растворяли в дистиллированной воде.

При однократном профилактическом введении исследуемые растворы экстрактов вводили крысам в дозе 50 мг/кг массы животного в объеме 1 мл. Разбавляли 0,9%-ным раствором натрия хлорида. Контрольной группе животных вводили 0,9%-ный раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. Растворы вводили перорально методом принудительного запаивания через зонд за 120 мин до перевязки обеих сонных артерий. Животных вводили в наркоз с помощью раствора хлоралгидрата (300 мг/кг массы животного). У крыс рассекали кожу вдоль трахеи, раздвигали мышцы и выделяли сонные артерии. Отпрепарированные обе сонные артерии перевязывали и на кожу накладывали швы. После этого раневую поверхность обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом. Прооперированных животных помещали в клетки. Наблюдение за животными проводили в течение 72 ч после перевязки сонных артерий.

При изучении профилактического курсового введения (14 дней) растворов экстракта листьев гинкго билоба, экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки, экстракта плодов шиповника крысы находились в стандартных условиях вивария, пищу и воду получали без ограничения. Изучаемые вещества вводили 1 раз в день также перорально методом принудительного запаивания через зонд в дозе 50 мг/кг массы животного в разбавленном виде в объеме 1 мл. Контрольная группа животных получала 0,9%-ный раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. Последнее введение (14-й день) растворов проводили за 120 мин до окклюзии сонных артерий. По истечении 120 мин животных вводили в наркоз с помощью раствора хлоралгидрата (300 мг/кг), затем проводили перевязку обеих сонных артерий. За животными наблюдали в течение 72 ч после операции. Критерием эффективности антигипоксического действия была выживаемость животных в течение 72 ч после двусторонней окклюзии сонных артерий.

Изучение влияния этих экстрактов при гипоксической гипоксии на выживаемость мышей проводили с помощью очень простой методики, для которой не нужно сложной аппаратуры. Мышей размещали по одной в герметически закрытые контейнеры одинакового объема. По мере потребления животными кислорода его содержание во вдыхаемом воздухе снижается, а углекислого газа – повышается, что и приводит животных к гибели. Одновременно проводили контрольный опыт. Время жизни животных регистрировали в минутах [7]. Изучение влияния этих экстрактов на выживаемость мышей в модели гипоксической гипоксии проводили также с формированием двух серий по 5 групп (1 контрольной и 4 основных по количеству испытуемых экстрактов). Каждая группа насчитывала 10 особей. При однократном профилактическом введении изучаемые экстракты вводили в разбавленном виде интрагастрально, с помощью зонда, в дозе 50 мг/кг массы животного в объеме 0,5 мл. Мышам из контрольной группы вводили 0,9%-ный раствор

натрия хлорида в эквивалентном объеме. Через 120 мин после этого мышей помещали в замкнутое пространство с целью моделирования гипоксической гипоксии. Контейнеры с животными во время исследования находились в помещении с температурой воздуха +20°C, влажностью 65–70%. Продолжительность жизни животных регистрировали в минутах.

При курсовом профилактическом введении изучаемые экстракты вводили в течение 14 дней также интрагастрально, с помощью зонда, в дозе 50 мг/кг массы животного 1 раз в сутки. Растворы экстрактов и 0,9%-ный раствор натрия хлорида вводили в эквивалентных объемах. Последнее введение было за 120 мин до помещения мышей в замкнутое пространство. Продолжительность жизни регистрировали в минутах.

Результаты эксперимента представлены в виде абсолютных данных и в процентном отношении к исходным значениям. Результаты исследования подвергли статистической обработке с применением пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, США) для операционной системы WINDOWS. Проверка вариационных рядов, проведенная методом Шапиро–Уилка, показала нормальный характер их распределения, что позволило в дальнейшем использовать параметрические методы с вычислением t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты, полученные при однократном введении исследуемых экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника, свидетельствовали о незначительных изменениях в выживаемости крыс с моделью циркуляторной гипоксии ($p > 0,05$). Данные эксперимента по сравнительному изучению курсового профилактического введения растворов экстракта листьев гинкго билоба, экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки, экстракта плодов шиповника при циркуляторной гипоксии представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника на выживаемость крыс при циркуляторной гипоксии мозга (профилактическое курсовое введение в течение 14 дней)

Исследуемые вещества	Дозы	Кол-во животных	Количество выживших животных		
			Через 24 ч	Через 48 ч	Через 72 ч

			Число животных	%	Число животных	%	Число животных	%
0,9%-ный раствор натрия хлорида		10	4	40	3	30	3	30
Экстракт листьев гинкго билоба	50 мг/кг	10	8	80	8	80*	7	70*
Экстракт плодов пальмы сабаль	50 мг/кг	10	8	80	7	70*	6	60
Экстракт Листьев петрушки	50 мг/кг	10	6	60	5	50	5	50
Экстракт плодов шиповника	50 мг/кг	10	5	50	5	50	4	50

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контрольной серии животных.

Профилактическое курсовое введение изучаемых экстрактов (табл. 1) в дозировке 50 мг/кг массы крыс в течение 14 дней показало статистически значимые отличия выживаемости животных относительно данных контрольной группы. Так, выживаемость крыс через 72 ч после начала эксперимента на фоне действия экстракта листьев гинкго билоба составила 70% ($p < 0,05$). Влияние экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки и экстракта плодов шиповника также увеличивало продолжительность жизни животных, но оно является статистически недостоверным.

В следующей серии экспериментов оценивалась выживаемость мышей с моделью гипоксической гипоксии при однократном и курсовом проведении антигипоксической профилактики экстрактами листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника.

Проведенные эксперименты по сравнительному влиянию изучаемых экстрактов из растительного сырья на выживаемость мышей при гипоксической гипоксии мозга при профилактическом однократном введении показали, что в контрольной серии выживаемость мышей составила $19,5 \pm 1,2$ мин. При введении экстракта листьев гинкго билоба, экстракта плодов пальмы сабаль, экстракта листьев петрушки, экстракта из плодов шиповника зарегистрирован рост продолжительности жизни животных. Эти данные оказались статистически незначимыми, но отразили четкую тенденцию позитивного влияния экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника в отношении увеличения продолжительности жизни лабораторных животных. И,

хотя постепенный эффект накопления экстрактивных веществ может по-разному влиять на патологические процессы при гипоксии, полученные результаты требовали проверки эффективности кумулятивного влияния курсового введения экстрактов на выживаемость животных.

В связи с этим следующим этапом нашей работы было исследование сравнительного влияния экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника на выживаемость белых мышей при гипоксической гипоксии мозга при профилактическом курсовом введении.

Результаты сравнительного влияния экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника на выживаемость мышей при гипоксической гипоксии мозга по завершении 14-дневного профилактического курса терапии представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты сравнительного влияния экстрактов листьев гинкго билоба, плодов пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника на продолжительность жизни мышей после моделирования гипоксической гипоксии мозга

(профилактическое курсовое введение в дозе 50 мг/кг массы животного в течение 14 дней)

Исследуемые вещества	Продолжительность жизни, мин ($M \pm m$, n=10)	Изменения, %
0,9%-ный раствор натрия хлорида	19,2±1,4	
Экстракт листьев гинкго билоба	29,9±2,1*	55,7*
Экстракт плодов пальмы сабаль	26,7±1,8	39,1*
Экстракт листьев петрушки	24,5±1,5	27,6
Экстракт плодов шиповника	23,9±1,1	24,4

Примечание:* – $p < 0,05$ относительно данных контрольной группы.

Проведенные эксперименты показали, что после курсового профилактического введения водного раствора экстракта листьев гинкго билоба, водного раствора экстракта плодов пальмы сабаль продолжительность жизни мышей статистически достоверно увеличилась на 55,7% и 39,1% соответственно относительно контроля. Под влиянием водного раствора экстракта листьев петрушки и водного экстракта из плодов шиповника выживаемость мышей с гипоксической гипоксией имела недостоверное увеличение относительно контрольной серии. Результаты проведенных экспериментов выявили, что

водный раствор экстракта листьев гинкго билоба и водный раствор экстракта пальмы сабаль наиболее эффективны при курсовом профилактическом введении при циркуляторной гипоксии.

Несомненно, что основой патогенеза неврологических когнитивных дисфункций является нарушение биохимических процессов мозга: эксайтотоксичность, окислительно-воспалительный каскад стресса, дефицит обновления нейронов. Поэтому, какова бы ни была причина – старение, бактериально-вирусное повреждение мозга (например, при менингите, COVID-19) или черепно-мозговые травмы, мозгу необходима реабилитационная терапия средствами, оказывающими нейропротекторное действие. Актуален поиск фитопрепаратов, которые могли бы замедлить сценарий развития патологии, стабилизировать запущенные процессы гибели нейронов и повысить вероятность благоприятного исхода течения патологии [6, 7]. В клинической практике уже длительное время используются препараты, получаемые из листьев гинкго билоба двулопастного.

Прием растительных препаратов, подразумевающих длительный курс терапии, не наносит вреда организму [7-10]. И, возможно, даже целесообразно рассматривать применение фитопрепаратов в комплексном лечении расстройств мозгового кровообращения в сочетании с нормализацией артериального давления (приемом антигипертензивных препаратов), снижением уровня холестерина в крови (приемом статинов), антитромботической терапией (приемом антитромбоцитарных препаратов и антикоагулянтов).

Заключение

Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что экстракты из растительных источников гинкго билоба, пальмы сабаль, листьев петрушки, плодов шиповника оказывают антигипоксическое действие. Достоверно выраженным антигипоксическим эффектом в модели циркуляторной гипоксии при курсовом введении обладает экстракт гинкго билоба. Наблюдалось увеличение выживаемости у крыс относительно контрольной серии животных в среднем на 70%. При курсовом введении водных экстрактов гинкго билоба и пальмы сабаль мышам в модели гипоксической гипоксии наблюдалось статистически значимое увеличение продолжительности их жизни на 55,7% и 39,0% соответственно относительно контроля.

Список литературы

1. Пизова Н.В., Пизов Н.А., Скачкова О.А., Соколов М.А., Измайлов И.А., Тарамакин Р.Б. Острые нарушения мозгового кровообращения и коронавирусная болезнь //

Медицинский совет. 2020. № 8. С. 18-25.

2. Остроумова Т.М., Черноусов П.А., Кузнецов И.В. Когнитивные нарушения у пациентов, перенесших COVID-19 // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2021. Т. 13. № 1. С. 126-130.
3. Новикова Л.Б., Акопян А.П., Шарапова К.М., Латыпова Р.Ф. Неврологические и психические расстройства, ассоциированные с covid-19 // Артериальная гипертензия. 2020. Т. 26. № 3. С. 317-326.
4. Одинец А.Д., Левента А.И., Щукин Д.А., Шабатурова О.В. К антигипоксическому действию препаратов из растительного сырья Байкальской Сибири // Сибирский медицинский журнал. 2011. № 5. С. 112-115.
5. Арльт А.В., Сергиенко А.В., Зацепина Е.Е., Савенко А.В., Ивашев М.Н. Влияние жирных растительных масел на динамику мозгового кровотока в эксперименте // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012. № 11. С. 45-46.
6. Селимзянова Л.Р., Вишнёва Е.А., Федосеенко М.В., Промыслова Е.А. Фитотерапия: современное состояние вопроса // Педиатрическая фармакология. 2016. № 5. С. 488-493.
7. Савенко А.В., Ивашев М.Н., Сергиенко А.В., Савенко И.А., Зацепина Е.Е. Оценка состояния нервной системы при применении масляного экстракта плодов пальмы сабаль в условиях субхронического эксперимента // Успехи современного естествознания. 2013. № 3. С. 141-142.
8. Савенко И.А., Сергиенко А.В., Ивашев М.Н., Савенко А.В., Зацепина Е.Е. Оценка состояния нервной системы при однократном применении масляного экстракта плодов пальмы сабаль // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012. № 11. С. 15.
9. Зацепина Е.Е., Ивашев М.Н., Сергиенко А.В. Исследование репаративной активности экстракта жирного масла шиповника при моделированном ожоге у крыс // Успехи современного естествознания. 2013. № 3. С. 122-123.
10. Сергиенко А.В., Ефремова М.П., Зацепина Е.Е., Ивашев М.Н. Биологическая активность чернушки дамасской // Аллергология и иммунология. 2011. Т. 12. № 3. С. 298.