

2015 Экспериментальное изучение фармакологических свойств солей гуминовых кислот Диссерт

БУЗЛАМА АННА ВИТАЛЬЕВНА

Экспериментальное изучение фармакологических свойств солей гуминовых кислот

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук 5 МАР 2015

14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология

005561068

Москва, 2015

005561068

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор Чернов Юрий Николаевич
Официальные оппоненты:

Яснецов Владимир Викторович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ГНЦ РФ - Институт медико-биологических проблем РАН
Новиков Василий Егорович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии с курсом фармации ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздрава России

Матюшин Александр Иванович — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика РАМН П.В. Сергеева ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России Ведущая организация:

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится » 2015 г. в 14.00 на заседании диссер-

тационного совета Д.208.040.13 при ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России по адресу: 11991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» и на сайте www.mma.ru. Автореферат разослан «.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.м.н.

Архипова Дария Евгеньевна

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Разработка инновационных лекарственных средств отечественного производства является одной из приоритетных задач, положенных в основу стратегии развития современной фармакологии и фармации (Стратегия ФАРМА-2020), так как, несмотря на существование более 17 000 зарегистрированных в РФ лекарственных препаратов, до сих пор крайне остро стоит проблема недостаточной безопасности, низкой эффективности и высокой стоимости многих из них.

В связи с вышеизложенным, в частности, не теряет актуальности создание новых лекарственных средств, содержащих вещества природного происхождения. Одной из перспективных групп природных соединений для разработки лекарственных препаратов являются продукты биodeградации растительного сырья, именуемые гуминовыми кислотами (Орлов Д.С., 1997). Основными источниками возобновляемого природного сырья, пригодными для промышленного получения солей гуминовых кислот являются древесный лигнин, придонные лечебные грязи (сапропели, пелоиды), а так же бурый уголь (леонардит) (Перминова И.В., 2008). Природные гуминовые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения, содержащие ароматические фрагменты, при этом преобладающими заместителями, определяющими их химическое поведение, являются кислородсодержащие функциональные группы, прежде всего карбоксильные и фенолгидроксильные, присутствуют так же карбонильные, метоксильные, аминогруппы и др. (Лодыгин Е.Д., 2014; Орлов Д.С., 1997; Холодов В. А., 2011). Основной массив научных исследований посвящен изучению влияния гуминовых кислот на растения и состояние почвы (Ермаков Е.И., 2003; Попов А.И., 2006), а широкое практическое применение ограничивается областью агрономии и промышленной технологии.

В отечественной и зарубежной литературе имеется ряд сообщений о том, что гуминовые кислоты и их соли (гуматы) обладают комплексобразующими и дезшжсикационными, противовоспалительными, антибактериальными, антиоксидантными свойствами и проявляют ряд других потенциально полезных эффектов (Аввакумова Н.П., 2011; Исмадова Р.Р., 2007; Маслов С. Г., 2013; Сухих А.С., 2009; Aeschbacher M, 2010; Van Rensburg C.E.J., 2009). В российской медицине известно применение препаратов-прототипов и аналогов гуминовых кислот. Например, лекарственный препарат гумизоль (являлся зарегистрированным в РФ до 1997 г.), получаемый из морских лечебных грязей, проявляющий противовоспалительные и биостимулирующие свойства, применялся местно и путем электрофореза (Машковский М.Д., 1988). В качестве энтеросорбентов широко используются лекарственные препараты лигнина гидролизного (например, полифепан и др.), который является природным предшественником гуминовых кислот (Машковский М.Д., 2010). Основной сферой применения собственно гуминовых кислот и содержащих их природных субстратов в российской медицине является санаторно-курортное лечение

(пелоидотерапия, бальнеотерапия) и физиотерапия (электрофорез) (Аввакумова Н.П., 2005-2011, Юбичкая Н.С., 2009, Beer А.М., 2005).

Однако, имеющаяся в научной литературе информация о фармакологических свойствах солей гуминовых кислот является недостаточной, несистематизированной и не позволяет обосновано выявить наиболее перспективные источники, которые могли бы выступить в качестве фармацевтических субстанций для разработки новых лекарственных препаратов. В настоящее время в РФ не существует лекарственных препаратов, содержащих в качестве основного и единственного компонента соли гуминовых кислот. Целесообразным представляется использовать для разработки новых лекарственных средств не природные субстраты, содержащие гуминовые кислоты, а выпускаемые промышленным путем для агротехнических целей субстанции, характеризующиеся стабильностью состава и свойств, обусловленной стандартными условиями производства. При этом, помимо потенциальной фармакологической активности соли гуминовых кислот обладают рядом перспективных преимуществ, таких как низкая токсичность (Савченко И.А., 2014), большие запасы широкодоступного природного сырья (Перминова И.В., 2008) и невысокая себестоимость промышленного производства - розничная цена субстанции не менее чем в 7 раз дешевле по отношению к препаратам сравнения.

Цель исследования: экспериментальное доклиническое изучение различных видов фармакологической активности и обоснование возможности разработки лекарственных препаратов, содержащих соли гуминовых кислот, получаемые промышленным путем из различных сырьевых источников (лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита). Задачи исследования:

1. Провести токсикологические исследования солей Гуминовых кислот различного происхождения (лигногумата, сапропелевого гумата, гумата леонардита).

2. Провести экспериментальные доклинические исследования по выявлению перспективных видов фармакологической активности лигногумата, сапропелевого гумата, гумата леонардита:

- изучить дезинтоксикационные и гепатопротекторные свойства;

- определить наличие антидиабетической активности;
- провести исследования по выявлению адаптогенной активности;
- изучить противовоспалительные, анальгетические и регенераторные свойства,
- оценить наличие ulcerогенного действия и гастропротекторных свойств,
- выявить мембранопротекторные свойства.

3. Проанализировать дозозависимость эффектов, провести сравнительную характеристику по силе и эффективности, обосновать возможность разработки лекарственных средств, содержащих соли гуминовых кислот:

- лекарственного средства, проявляющего дезинтоксикационную активность;
- лекарственного средства для коррекции прандиальной гликемии при сахарном диабете 2 типа.
- лекарственного средства, проявляющего противовоспалительные свойства;
- лекарственного средства, обладающего регенераторным действием при местном применении;

— лекарственного средства, проявляющего гастропротекторные свойства. Научная новизна исследования. Соли гуминовых кислот (лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат) являются умеренно токсичными (3 класс токсичности и опасности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 и по классификации Березовской И.В., 2003, 2010), не кумулируют, обладают значительной широтой терапевтического действия (индекс широты терапевтического действия >45), не обладают органотропной токсичностью; при нанесении на кожные покровы и слизистые оболочки оказывают слабое раздражающее действие (1 класс раздражающего действия); не проявляют эмбриотоксических и тератогенных эффектов в эксперименте.

На 6 моделях интоксикаций (психотропными веществами - клозапин, гексенал и мединал; прооксидантами - окисленная олеиновая кислота и мезоксали-ломочевина; и при токсическом гепатите, вызываемом четыреххлористым углеродом) доказаны дезинтоксикационные свойства солей гуминовых кислот, обусловленные способностью повышать антиоксидантную функцию печени и анти-оксидантными свойствами. Впервые (Патент РФ №2232024) доказано, что при интоксикации нейролептиком клозапином лигногумат в составе комбинированной терапии с поливинилпирролидоном обеспечивает увеличение выживаемости в 2 раза, уменьшает проявления цитолиза гепатоцитов (снижение АЛТ до нормальных значений через 96 ч) и улучшает клиническое состояние животных.

Впервые (Заявка на выдачу Патента РФ на изобретение №2003110637) выявлены антидиабетические свойства лигногумата. На моделях аллоксанового и стрептозоцинового сахарного диабета лигногумат повышает выживаемость животных (максимально - в дозе 1 мг/кг на 60%), предотвращает снижение массы тела, снижает концентрацию глюкозы (на 8-й день — достоверно, в 4,6 раза), обеспечивает улучшение толерантности к углеводам при гликемической нагрузке, проявляет антиоксидантные свойства, достоверно уменьшает проявления диабетической полидипсии (меньше на 25,7%) и полиурии (на 27,8%), снижает выраженность деструктивных процессов в островках Лангерганса по данным гистологических исследований. Лигногумат отличается благоприятным профилем постпрандиальной гипогликемической активности - незначительно снижает уровень гликемии натощак (на 18,6%) и при этом в большей степени, чем гумат леонардита и сапропелевый гумат проявляет сопоставимую с глибенкламидом гипогликемическую активность в тесте толерантности к глюкозе (через 60 мин. снижение гликемии на 26,8%).

Доказано наличие противовоспалительной и анальгетической активности солей гуминовых кислот (3 модели - укусы корчи, отек лапы крыс, электрокожное болевое раздражение), наиболее выраженной по большинству критериев для гумата леонардита (в дозе 1 мг/кг — снижение количества укусов корчей в 2 раза; уменьшение отека лапы крыс на 21,9%, предотвращение сдвига лейкоцитарной формулы влево; в дозе 10 мг/кг - повышение порога болевой чувствительности на 17,7% при электрокожном болевом раздраже-

нии), сила анальгетического эффекта сопоставима с диклофенаком натрия, при этом гумат леонардита является в 2,8 раза менее токсичным и не обладает ulcerогенным действием. На модели термических ожогов кожи гумат леонардита в форме 5% мази обладает регенераторными и противовоспалительными свойствами, превосходит масло облепиховое по скорости заживления в 2 раза, обеспечивая заживление раны по «первичному натяжению» без визуальных и лабораторных признаков гнойного воспаления

(снижение СОЭ на 12,5%, лейкоцитоза на 14,3%), снижает выраженность патолого-анатомических признаков ожогового стресса (инволюции тимуса, спленоме-галии, гипотрофии надпочечников), способствует нормализации поведенческой активности животных по данным теста открытое поле.

Лигногумат проявляет адаптогенную активность (3 модели — острый иммобилизационный стресс, принудительное плавание, нормобарическая ги-перкапническая гипоксия) средней степени выраженности и уступает экстракту элеутерококка по большинству показателей, однако обеспечивает выраженное предотвращение стрессорного ульцерогенеза - снижение частоты встречаемости язвообразования на 50% и суммарной длины язв в не менее чем в 4,6 раза (в дозе 1 мг/кг однократно внутримышечно за 1 ч до стресс-воздействия на модели острого иммобилизационного стресса).

Установлено, что лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат способствуют предотвращению НПВС-гастропатии. Впервые (Патент РФ №2481111) доказано, что сапропелевый гумат в дозе 5 мг/кг однократно перорально за 50 мин. до введения диклофенака натрия достоверно снижает частоту встречаемости (на 33,4%), количество (на 87,4%), площадь (на 87,9%), обширность (на 45,4%) язвенных повреждений слизистой оболочки желудка и обладает высокой противоязвенной активностью, превосходящей фамотидин в 2,4 раза.

С использованием 3-х тест-систем клеточного уровня (инфузории *Paramecium caudatum*, кислотный и гипоосмотический гемолиз эритроцитов) выявлена способность лигногумата, гумата леонардита и сапропелевого гумата изменять структурно-функциональные свойства биологических мембран, что возможно является одним из механизмов регенераторного и гас-тропротекторного эффектов. Установлено, что гумат леонардита обладает мембранопротекторным действием, так как на 31,9% увеличивает продолжительность жизни инфузорий *Paramecium caudatum* при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида; впервые доказано (Положительное решение о выдаче патента по Заявке №2013133380 и по Заявке №2013133363), что гумат леонардита достоверно снижает скорость кислотного гемолиза (максимально - в дозе 10 мг/кг, в 5,5 раз) и количество подвергшихся деструкции клеток (на 37,7%); сапропелевый гумат в дозе 1 мг/кг оказывает модифицирующее влияние при скрытых повреждениях мембраны (снижение скорости гипоосмотического гемолиза на 50,2%), что является его дополнительной отличительной особенностью.

Практическая значимость и реализация результатов исследований. Для повышения точности и облегчения планиметрических измерений впервые предложена «Палетка для планиметрических измерений объектов в биологии и медицине» (Патент РФ №114147). Палетка используется для измерения размеров и площади ран и ожогов в хирургических отделениях лечебных учреждений г. Воронежа (БУ ВО «Воронежская городская клиническая больница №3»; БУЗ ВО «Воронежская городская клиническая больница скорой медицинской помощи №1», при проведении научных исследований в НИИ экспериментальной биологии и медицины при ГБОУ ВПО «ВГМА им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, имеются Акты внедрения. Впервые для проведения доклинических исследований предложен простой, низкочастотный и имеющий высокий уровень воспроизводимости «Способ выявления психотропной активности лекарственных и нелекарственных веществ» (Патент РФ №2506649), способ используется при проведении научных исследований в НИИ экспериментальной биологии и медицины при ГБОУ ВПО «ВГМА им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, что подтверждается Актом внедрения. В экспериментальных доклинических исследованиях изучена фармакологическая активность солей гуминовых кислот различного происхождения (лигногума-та, сапропелевого гумата и гумата леонардита), что может иметь прикладное значение, поскольку позволит осуществить разработку инновационных лекарственных средств, содержащих данные соединения. Научные положения, полученные в результате диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс кафедр фармацевтического факультета ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет» Минобрнауки России; кафедр медицинского факультета ГОУ «Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко», кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», что подтверждено Актами внедрения. Основные положения, выносимые на защиту:

- соли гуминовых кислот (лигногумат, сапропелевый гумат, гумат леонардита) являются низкотоксичными;
- лигногумат, сапропелевый гумат, гумат леонардита проявляют дезинтокси-кационное и гепатопротекторное действие;
- лигногумат обладает антидиабетическими свойствами;
- гумат леонардита, сапропелевый гумат и лигногумат, обладают противовоспалительной и анальгетической активностью, и при этом не обладают ульцерогенным действием; мазь гумата леонардита проявляет регенераторные свойства;

- лигногумат обладает адаптогенной активностью средней выраженности;

- сапропелевый гумат, гумат леонардита и лигногумат проявляют выраженный гастропротекторный эффект при НПВС-гастропатии и стрессорном язве желудка.

- гумат леонардита, сапропелевый гумат, лигногумат обладают мембрано-протекторными свойствами.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен выбор направления диссертационного исследования, анализ литературных данных по изучаемой проблеме, все экспериментальные доклинические исследования выполнены автором лично, лабораторные и гистологические исследования проведены при непосредственном личном участии автора. Автором самостоятельно проведена математическая обработка данных, анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации и автореферата, подготовка всех основных публикаций по тематике исследования. Апробация результатов исследования. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 13 научных конференциях - ежегодных научных сессиях ФГБОУ ВПО ВГУ (2006-2014 г), Всероссийской научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ», Воронеж, 2007, 2010, 2013; Межрегиональной научно-практической юбилейной конференции «Проблемы здоровьесбережения школьников и студентов. Новые научные тенденции в медицине и фармации», Воронеж, 2008; а также представлены на 15 международных, всероссийских и региональных конференциях в городах Москва, Пермь, Ростов-на-Дону, Курск, Премышль (Польша), Томск, Санкт-Петербург в период с 2006-2014 гг. Апробация проведена на расширенном заседании кафедры клинической фармакологии ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко» Минздрава России (протокол №11 от 19.06.2014 г). Публикации. 54 опубликованных печатных работы, в т.ч. 15 статей в журналах, рекомендуемых ВАК при Министерстве образования и науки РФ для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций, 4 Патента РФ на изобретение, 4 учебно-методических работы, 1 монография. Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология, которая в соответствии с формулой специальности изучает взаимодействие лекарственных средств с живыми системами, одним из основных направлений является поиск и разработка новых эффективных лекарственных средств для профилактики и лечения различных заболеваний, а одной из основных областей исследований - поиск новых биологически активных фармакологических веществ среди природных и синтетических соединений на экспериментальных моделях патологических состояний, что полностью соответствует цели и задачам диссертационного исследования, включающего экспериментальное доклиническое изучение различных видов фармакологической активности и обоснование возможности разработки лекарственных препаратов, содержащих соли гуминовых кислот (лигногумат, сапропелевый гумат и гумат леонардита). Основными методами специальности являются в том числе исследования на животных и *in vitro*, что в полной мере соответствует использованным в диссертационном исследовании различным моделям экспериментальных доклинических исследований выполненных на лабораторных животных и тест-системах клеточного уровня.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 410 страницах текста компьютерной верстки и содержит: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), результаты собственных исследований (главы 3-9), обсуждение результатов, выводы и практические предложения; содержит 146 таблиц, 34 рисунка. Список литературы включает 307 источников, из них 208 отечественных, 99 зарубежных.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование выполнено в период 2006-2014 гг. в Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко (ГБОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко Минздрава России), отдельные разделы исследований территориально выполнены на базе фармацевтического факультета Воронежского государственного университета (ФГБОУ ВПО ВГУ Минобрнауки России) и Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института патологии, фармакологии и терапии (ВНИВИПФит Рос-сельхозакадемии). При проведении экспериментов учитывали рекомендации, изложенные в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под редакцией Фисенко В. П. (2000), Хабриева Р.У. (2005), Миронова А.Н. (2012), соблюдали принципы биоэтики, методические подходы к контролю качества экспериментов и мониторингу здоровья лабораторных животных (Каркищенко Н.Н., 2010). Объекты исследования - изучаемые фармакологические вещества - соли гу-миновых кислот, получаемые промышленным путем из трех различных сырьевых источников, условно названные - сапропелевый гумат, гумат леонардита и лигногумат, общая характеристика представлена в таблице (Табл. 1)

Таблица 1

Общая характеристика объектов исследования_

Показатель Сапропелевый гумат Гумат леонардита Лигногумат

Описание порошок черно-коричневого цвета, частиц с размером 0,5 мм не более 40% порошок мелкодисперсный коричнево-черного цвета жидкость темно-коричневого цвета, без осадка и твердых инородных включений

Сырьевой источник натриевые соли гуминовых кислот, получаемые из придонных грязей (сапропелей), условное название -сапропелевый гумат натриевые и калиевые соли гуминовых кислот, получаемые из бурого угля (леонардита), условное название - гумат леонардита соли гуминовых кислот, получаемые га лигнина(продукт гидролиза препарата полифе-пан), условное название — лигногумат

Производитель ООО «Невская линия», г. Санкт-Петербург, Наименование и обозначение продукции: удобрение органо-минеральное гуминовое «Агрокор» ООО «Гумат», г. Иркутск, Наименование и обозначение продукции: «Гумат-80» -удобрение на основе гуминовых кислот ООО «Лигфарм», г. Москва Наименование и обозначение продукции: опытные партии лекарственного препарата «Олипифат»

нд ТУ 2387-006-54260752-2002 ТУ 2189-004-41764643-98 ТУ 9337-01-18290665-01, временная фармакопейная статья

Сфера применения Для агротехнических целей. Фармакологические свойства не изучены Для агротехнических целей. Фармакологические свойства не изучены Опытные партии - для доклинических и клинических исследований. Фармакологические свойства изучены недостаточно

Используемые методы исследования. Дизайн исследований представлен на блок-схеме (Рис. 1). Использованы 22 различных экспериментальных модели доклинических исследований, 7 референтных препаратов; методы оценки клинического состояния животных - Т°С, ЧДЦ, ЧСС, ЭКГ (электрокардиограф ЭК1Т-04 Аксион, Россия) и др.; более 30 лабораторных показателей согласно общепринятым методикам и с использованием автоматического биохимического и гематологического анализаторов; патологоанатомические и гистологические методы (окраска препаратов гематоксилином Майера с эозином, микроскоп световой Биомед-1 (Россия), монтируемый на окуляр фотоаппарат Canon PC1099 Power Shot A95 (Китай), цифровая видеокамера Microscope Digital Camera Levenhuk C800 NG C-Series (Levenhuk, Ltd., USA).

Этические и правовые нормы доклинического исследования. Условия содержания животных соответствовали действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утверждены 06.04.1973, №1045-73) - содержание в пластиковых клетках, кормление полнорационным комбикормом, поение вволю при помощи автоматических nippleных поилок. Соблюдали международные принципы гуманного обращения с животными согласно Директиве Совета ЕС от 24.11.1986 по вопросу защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609ЕЕС, Конвенция по защите позвоночных животных, г. Страсбург, Франция, 1986) и Хельсин-ской декларации. Эвтаназию животных осуществляли гуманным методом (передозировка хлороформного наркоза).

Описание используемой в исследовании тест-системы. Исследования проведены на 2985 лабораторных животных грызунах и негрызунах (1760 белых аутбредных конвенциональных крыс самцов и самок в возрасте 3 мес. массой тела 180-220 г, 1098 белых аутбредных мышей самцов и самок в возрасте 2,5 мес. массой тела 18-25 г, полученных из вивария ГБОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко, 127 кроликов самцов породы белый великан в возрасте 4 мес. массой тела 3,5 кг); на тест-системах клеточного уровня (культура инфузорий *Paramecium caudatum*, получена из лаборатории кафедры физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО ВГУ; суспензии мембран эритроцитов, полученных из венозной крови белых аутбредных крыс самцов — моделирование кислотного и гипоосмотического гемолиза. Животные в группах были подобраны по принципу парных аналогов по полу, возрасту и массе тела (разница по массе тела не более 10%), расчет дозы проводили индивидуально для каждого животного. Животным интактных и контрольных групп вводили эквивалентный изучаемым веществам объем 0,9% раствора натрия хлорида. Статистическая обработка результатов исследования. Определяли средние значения по вариационному ряду, ошибку среднего, достоверность различий (при параметрическом распределении по критерию Стьюдента или при непараметрическом распределении по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни), с использованием пакета прикладных лицензионных программ «Statistica 5.0» на персональном компьютере Pentium Dual Core на 3,2 ГГц.

1. ДЕЗИНТОКСИКАЦИОННАЯ, ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ

6 моделей, крысы n=271, мыши n=150

11. Гексенартовый сон Препарат сравнений — эссенциальные фосфолипиды

Р

Г

[Гумат леонардита] [Лигногумат] [Сапропелевый гумат)

[2. Медиаловый сон |

} 4. Интоксикация ! I мезоксалилмочевинной Г

3. Острая интоксикация клозапином препарат сравнения — поповинилпирролидон_

ч

5. Интоксикация окисленной I олеиновой кислотой I

6. Токсический гепатит, вызываемый четыреххлористым углеродом

у

II. АНТИДИАБЕТИЧЕСКАЯ, ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ . 5 моделей, крысы n=270. мыши №200

1. Глюкозотолерантный тест Препарат сравнения — глибеикламид

у

Гумат 1 { Лигногумат I [Сапропелевый гумат I еонардита] | - -

2. Оценка гипогликемического действия на здоровых животных 3. Аллоксановой [4. Стрептозоциновой] диабет [диабет]

1

Глюкозо- Н Глюкозо- 1 1 толерантный тест ; [толерантный тест) Г Глюкозо- | [толерантный тест}

[Гумат леонардита | | Лигногумат 11 Сапропелевый гумат)

Дезикгоксикзционное средство, гелатопротектор -] _лигногумат, р-р в/м_ j

5. Острая интоксикация аллоксаном

I Антидиабетическое средство - лигногумат, р-р в/м

III. ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ, АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ, РЕГЕНЕРАТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ

5 моделей, крысы n=229, мыши n=250

1. Тест укусы корчи Препарат сравнения - диклофенак натрия

и

[Гумат леонардита] [~ Лигногумат**"] (Сапропелевый гумат]

4- I T

2. Электрокожное болевое ___раздражение

[3 Отек лапы крыс]

| 4. Оценка ульцерогенного действия I

Противовоспалительное, анальгетическое средство -гумат леонардита. лекарственная форма -твердая дозированная для приема внутрь

5. Термический ожог кожных покровов Препарат сравнения — масло облепихоеое

—»[Реларант, регенерант -тумат леонардита, мазь 5%, доза 30 г/ма |

гС

V. ГАСТРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ

крысы п=84

1. НПВС-гастролатия Препарат сравнения - фамотидин

у

[Гумат леонзрд^та] | Лигногумат] | Сапропелевый гумат]

к

Гастропротектор- сапропелевый гумат. лекарственная форма -твердая дозированная для приема внутрь

IV. АДАПТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ

3 модели, крысы п=190, мыши п-290

1. Тест принудительное плавание Препарат сравнения - элеутерококка экстракт

п

[Гумат леонардита] | Лигногумат] [Сапропелевый - --I гумат

2. Иммобилизацион-ный стресс 3 Нормобариче-ская гиперкапниче-ская гипоксия 4. Принудительное плавание с грузом

Адаптоген - лигногумат, р-р в/м

VI. МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ

_3 тест-системы клеточного уровня

1. Тестирование на инфузориях ___Рагатеаит саиаатт_

у

"[Гумат леонардт^ап Лигногумат ПСапропелевый гумат]*

1 т

ч

2. Кислотный гемолиз эритроцитов

3. Гипоосмотический гемолиз эритроцитов

]-

Мембранопротеектор — гуamat леонардита, лекарственная форма -твердая дозированная для приема внутрь

Рис. 1. Дизайн исследования (блок-схема)

3. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОЛЕЙ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Токсикологические исследования осуществлены на 1021 лабораторных животных грызунах и негрызунах: 686 белых аутбредных конвенциональных крыс самцов и самок в возрасте 3 мес. со средней массой тела $210,5 \pm 35,4$ г, 208 белых аутбредных конвенциональных мышей самцов в возрасте 2,5 мес. массой $20,3 \pm 2,5$ г, 127 кроликов самцов породы белый великан в возрасте 4 мес. массой тела $3,4 \pm 0,5$ кг.

Изучение острой токсичности проведено на белых аутбредных мышах самцах и самках массой тела $20,5 \pm 2,0$ г, белых крысах самцах и самках массой $190,5 \pm 5,0$ г, всего 624 головы, не менее чем по 6 голов в каждой группе. Лиг-ногуamat (5% раствор) вводили внутривентрально, внутривентрально и внутримышечно, так как его опытные партии предназначены для внутримышечного введения. Гуamat леонардита и сапропелевый гуamat (5% водные растворы, изготовленные экстенпорально) вводили подкожно и внутривентрально, так как предполагаемый терапевтический способ применения - перорально. Расчет LD₅₀ проводили с использованием метода «накопленных частот» в модификации Беренса и методом пробит-анализа; дозы выбирали согласно рядам Фульда (Беленький М.Л., 1963; Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., 2005).

При однократном внутривентральном введении в дозах до 1000 мг/кг (с учетом предельно допустимого объема вводимого раствора) лигногуamat, гуamat леонардита и сапропелевый гуamat не вызывают летальных исходов в первые сутки и последующие 14 суток. У выживших животных не было выявлено достоверных изменений массы тела, поведенческих реакций, двигательной активности, вегетативной иннервации, объема и цвета мочи, дефекации, потребления корма (в пределах 5-7 г/гол/сут. для мышей) и воды ($3,5-5,5$ мл/гол./сут.).

При парентеральном введении высоких доз часть животных погибало на 1-3 сутки или сразу на фоне клонико-тонических судорог, саккодированного дыхания и симптомов легочно-сердечной недостаточности. Результаты патолого-анатомических исследований органов погибших животных выявили окрашивание в серовато-коричневатый цвет мышечной ткани (лигногуamat — внутримышечно), толщи дермы и подкожной жировой клетчатки (сапропелевый гуamat, гуамата леонардит - подкожно), что вероятно обусловлено процессами всасывания солей гуминовых кислот, имеющих коричневую окраску.

Таблица 2

Масса внутренних органов крыс, погибших в течение первых суток после внутримышечного введения лигногуамата (доза 600 мг/кг)

Показатель Масса тела Относительная масса органов, г/кг массы тела

Селезенка Тимус Надпочечники

Интакт $191,9 \pm 5,4$ $4,00 \pm 0,50$ $0,61 \pm 0,12$ $0,29 \pm 0,02$

Лигногуamat $177,0 \pm 7,8$ $6,68 \pm 1,38^*$ $0,73 \pm 0,12$ $0,30 \pm 0,03$

- разница с интактом, % -7,8 +67,0 +19,6 +3,4

Показатель Почки Легкие Сердце Печень

Интакт $8,49 \pm 0,48$ $6,51 \pm 0,46$ $4,25 \pm 0,22$ $52,65 \pm 4,00$

Лигногуamat $7,26 \pm 0,20$ $9,98 \pm 0,33^{***}$ $4,49 \pm 0,17$ $36,19 \pm 2,15^{***}$

- разница с интактом, % -14,5 +53,3 +5,6 -31,3

Примечание: * - $P < 0,05$; *** - $P < 0,001$ - достоверность различий при сравнении показателей в опытных группах с интактом.

Слизистая оболочка желудка и тонкого кишечника розоватого цвета, не выявлено язв, эрозий и кровоизлияний. В брыжейке тонкого кишечника — темноокрашенные включения, вероятно частицы гуминовых веществ. Тимус красновато-розовый, с единичными мелкоточечными кровоизлияниями. Легкие темно-алые, кровенаполнены. В полостях сердца жидкая кровь. Выявлено (Табл. 2, 3) повышение массы селезенки (для сапропелевого гумата, гума-

та леонардита и лигногумата соответственно на 23,5%, 29,1% и 67,0%) и тимуса (на 54,1%, 50,8%, 19,6%), свидетельствующее о мобилизации лимфоид-ных клеток и их последующей гибели в селезенке. Выявлено снижение массы печени (на 38,4%, 33,4%, 31,3%), почек (на 20,3%, 13,4%, 14,5%), повышение массы сердца (не более чем на 18,1%) и легких (на 58,7%, 51,0% и 53,3%), что свидетельствует о смерти на фоне отека легких и сердечной недостаточности, подтверждая данные клинической картины гибели животных.

Таблица 3

Масса внутренних органов животных, погибших после подкожного введения

сапропелевого гумата и гумата леонардита (доза 1000 мг/кг)

Показатель Масса тела Ошосительная масса органов, г/кг массы

Селезенка Тимус Надпочечники

Интакт 214,0±2,4 3,06±0,21 0,61±0,19 0,29±0,02

Сапропелевый гумат 191,3±3,5 4,00±0,50* 0,94±0,50 0,37±0,08

- разница с интактом, -10,6 +23,5 +54,1 +27,6

Гумат леонардита 198,5±5,3 3,95±0,54 0,92±0,20 0,31±0,05

- разница с интактом, % -7,24 +29,1 +50,8 +6,9

Показатель Почки Легкие Сердце Печень

Интакт 8,49±0,48 6,51±0,46 4,25±0,22 52,65±4,00

Сапропелевый гумат 6,77±1,27 10,33±0,37*** 5,02±0,58 32,37±2,33*

- разница с интактом, % -20,3 +58,7 + 18,1 -38,4

Гумат леонардита 7,35±0,54 9,83±0,51*** 4,98±0,37 35,0±6,21*

- разница с интактом, % -13,4 +51,0 +17,2 -33,4

Примечание: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$ - достоверность различий при сравнении показателей в опытных группах с интактом.

Определение наличия кумулятивного действия осуществляли по методу Ыт'а (Арзамасцев Е.В, Гуськова Т.А, Березовская И.В, 2005) на 30 белых аутбредных крысах самцах массой 190,0±5,3 г. Дозы - от 0,1 до 1,12 от ЛД50, суммарная доза за 24 дня - 12,8 ЛД50. При многократном внутримышечном введении лигногумата коэффициент кумуляции $K_k = 11,6$, т.е. > 10 , что позволяет отнести его к умеренно опасным веществам по классификации Березовской И.В. (2010) [3], при этом нельзя исключить развитие привыкания, так как $K_k > 1$. При многократном пероральном введении сапропелевого гумата и гумата леонардита не было выявлено гибели животных. В связи с тем, что суммарная доза составляла 12,8 ЛД50, следует предположить, что $K_k > 12$, позволяя отнести сапропелевый гумат и гумат леонардита к веществам умеренно опасным.

Основные параметры острой токсичности лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита представлены в таблице (Табл. 4). Индекс широты терапевтического действия (Березовская И.В, 2010) рассчитан исходя из того, что терапевтическая доза составляет не более 10 мг/кг, значения ЬО50 взяты для лигногумата при внутримышечном введении крысам, для сапропелевого гумата и гумата леонардита — при подкожном введении крысам.

Изучение хронической токсичности проведено на 100 белых аутбредных крысах массой тела $190,5 \pm 5,6$ г. Лигногумат вводили внутримышечно в дозах: 100 мг/кг (предполагаемая терапевтическая, 1/10 от ЬО50), 360 мг/кг (максимальная переносимая доза) и 280 мг/кг (промежуточная доза).

13

Таблица 4

Параметры острой токсичности лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита

Доза, мг/кг, способ введения Ввд жпвошых Кол-во животных Лигногумат Сапропелевый гумат Гумат леонардита

Внутрижелудочно

1-О50 мыши 100 >1000 >1000 >1000

МПД 1000 1000 1000

ЪО50 крысы 80 >1000 >1000 >1000

МПД 1000 1000 1000

Подкожно

ЪЭ50 крысы 180 - $1482,5 \pm 203,0$ $799,8 \pm 144,8$

МПД - 770 360

Внутрибрюшинно

ЪЭзо мыши 36 $459Д \pm 95Д$ - -

МПД 280 - -

ЪО50 крысы 84 $510,5 = 161,1$ - -

МПД 280 - -

Внутримышечно

1-О50 мыши 72 $8933 \pm 121Д$ - -

МПД 460 - -

1Х>50 крысы 72 $974,9 * 135,0$ - -

МПД 360 - -

Класс токсичности и опасности (по ГОСТ 12.1.007-76 и И.В. Березовской, 2003) - - 3 умеренно токсичны 3 умеренно токсичны 3 умеренно токсичны

Коэффициент кумуляции крысы 30 $11,6 > 12 > 12$

Степень опасности (по И.В. Березовской, 2010) - - умеренно опасны умеренно опасны умеренно опасны

Индекс широты терапевтического действия (БОзо/терапевтическая доза) - - 97 149 80

Степень опасности (по И.В. Березовской, 2010) - - малоопасны малоопасны малоопасны

Сапропелевый гуamat и гуamat леонардита вводили перорально в дозах: 100, 500 и 1000 мг/кг. Длительность введения - 3 мес., так как предполагаемая продолжительность применения для терапевтических целей 15-30 суток. Лигногуamat, сапропелевый гуamat и гуamat леонардита не вызывали изменений поведенческих реакций, двигательной активности, нервно-мышечной возбудимости, вегетативной иннервации, ритма дыхания, не выявлено цианоза, отеков и эритемы кожных покровов. Ежедневное внутримышечное введение лигногуамата в дозе 100 мг/кг через 7-14 суток у части животных вызывало отек и болезненность (в течение 1-3 ч.) в зоне инъекций, в связи с чем места инъекций в дальнейшем ежедневно меняли. Не выявлено изменений массы тела, консистенции и окраски фекальных масс, суточного диуреза (не более 20 мл/сут.), удельной плотности и цвета мочи, потребления корма (12—15 г/гол./сут.) и воды (17-24 мл/гол./сут.); влияния на ЧСС (не более 520 уд/мин.), ЧДД (не более 150/мин.), температуру тела (38,0-3 8,5°C) как через 1 ч. после введения, так и при ежедневном применении изучаемых веществ те-

чение 3 мес. Не выявлено влияния на количество эритроцитов, содержание гемоглобина, цветной показатель, гематокрит. При введении лигногуамата в дозах, превышающих терапевтические, выявлено повышение количества лейкоцитов (не более чем на 7,5%) и СОЭ (не более чем на 6,2%).

Таблица 5

Биохимические показатели крови крыс при длительном применении лигногуамата, сапропелевого гуамата, гуамата леонардита (данные по максимальным переносимым дозам)

Показатель, группа Исходно 7 дн. 30 дн. 3 мес.

Общий белок, г/л, интакт 60,8±3,6 60,9±4,6 62,7±6,1 60,9±8,9

Лигногуамат 59,8±3,6 59,7±10,2 60,7±5,6 59,9±7,3

Сапропелевый гуамат 59,8±3,6 58,7±8,9 57,7±7,2 56,2±6,3

Гуамат леонардита 62,1±2,5 62,1±3,0 61,9±5,5 61,5±3,0

Мочевина, ммоль/л, интакт 6,2±0,5 6,2±0,7 6,4±0,8 6,2±0,3

Лигногуамат 5,9±0,2 6,0±0,8 6,0±0,5 5,8±0,3

Сапропелевый гуамат 5,8±0,7 5,5±0,2 6,3±0,8 6,4±0,9

Гуамат леонардита 6,0±0,9 5,9±0,7 5,4±0,04 5,5±0,05

Билирубин, мкмоль/л, интакт 6,3±0,5 6,0±0,6 6,1±0,7 6,0±0,5

Лигногуамат 5,7±0,1 5,8±0,4 5,9±0,3 6,0±0,4

Сапропелевый гуамат 6,3±0,3 6,5±0,5 6,9±0,1 6,7±0,3

Гуамат леонардита 6,0±0,5 6,2±0,6 6,1±0,7 6,3±0,1

АЛТ, ммоль/ч-л, интакт 0,9±0,04 1,0±0,05 0,9±0,03 1,1±0,10

Лигногуамат 0,9±0,08 1,0±0,07 1,1±0,05 1,4±0,10

Сапропелевый гуамат 0,9±0,04 1,0±0,05 1,0±0,03 1,2±0,90

Гумат леонардита 1,0±0,02 1,0±0,05 1,1±0,03 1,4±0,08

АСТ, ммоль/ч-л, интакт 1,0±0,03 1,2±0,04 1,2±0,05 1,3±0,07

Лигногумат 1,0±0,05 1,2±0,06 1,3±0,07 1,5±0,10

Сапропелевый гумат 1,0±0,08 1,0±0,05 1,1 ±0,04 1,0±0,03

Гумат леонардита 1Д±0,05 1,1±,10 1,3±0,05 1,5±0,07

ЩФ, ммоль/ч-л, интакт 4,59±0,9 5,00±0,8 5,50±0,9 5,45±0,8

Лигногумат 4,90±0,7 5,00±0,5 4,9±0,7 5,10±0,3

Сапропелевый гумат 5,40±0,4 5,50±0,8 5,60±0,7 5,60±0,9

Гумат леонардита 4,55±0,7 4,57±0,8 4,60±0,4 5,50±1,0

Креатшпш, мкмоль/л, интакт 81,0±6,0 87,0±5,0 85,0±4,5 83,2±7,0

Лигногумат 85,6±5,5 87,5±7,2 89,0±4,9 88,5±8,9

Сапропелевый гумат 78,9±3,7 73,0±2,0 75,±6,5 78,5±7,3

Гумат леонардита 71,5±1,5 72,6±7,5 73,4±8,0 75,5±9,1

Не выявлено влияния на концентрацию глюкозы крови и общих липидов. Лигногумат в дозе 100 мг/кг, сапропелевый гумат и гумат леонардита в дозе 500 мг/кг повышали содержание общего белка (не более чем на 22,3%) и снижали содержание мочевины (не более чем на 19,4%); снижали концентрацию билирубина (порядка 20,0%), ЩФ (не более чем на 17,4%), креатинина (не более чем на 19,5%). В дозах, превышающих терапевтические, выявлена тенденция к повышению АЛТ (не более чем на 27,2%), АСТ (не более чем на 15,3%), других существенных изменений выявлено не было (Табл. 5). Значения всех показателей в опытных группах не выходили за границы нормы для здоровых животных.

Результаты патолого-анатомических исследований свидетельствуют об отсутствии изменений внешнего вида и массы внутренних органов, параметры

соответствовали видово-возрастной норме для взрослых здоровых животных. Не выявлено язв, эрозий и кровоизлияний на слизистой оболочке желудка и кишечника. По результатам гистологических исследований на фоне применения лигногумата выявлено увеличение лимфоидных околососудистых скоплений в печени, повышение кровенаполнения сосудов в печени и почках. Введение лигногумата и гумата леонардита сопровождалось преобладанием в пучковой зоне надпочечников крупных темных активно функционирующих клеток, в клубочковой зоне - молодых мелких темноокрашенных клеток, выраженными являлись очаги пролиферации, выявлено увеличение площади ядер адренкортикоцитов (для лигногумата - на 3,2%), повышена васкуляризация сетчатой зоны, что свидетельствует об активизации биосинтетических процессов. Введение лигногумата сопровождалось скоплением лимфоцитов по всей поверхности мозгового и коркового вещества лимфатического узла, в том числе в краевых и промежуточных корковых синусах, увеличением диаметра лимфатических фолликулов (на 23,2%). Введение лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита сопровождалось незначительным увеличением объемной доли паренхиматозных структур селезенки (для лигногумата на 2,5%), общая масса органа не изменялась. Других изменений морфологической структуры или признаков деструкции органов не было выявлено.

Изучение влияния на сердечно-сосудистую систему при длительном введении (ежедневно, 30 суток) лигногумата (внутримышечно в дозах 100; 280; 360 мг/кг), сапропелевого гумата и гумата леонардита (перорально в дозах 100; 500 и 1000 мг/кг) проведено на кроликах самцах породы белый великан, 3,8±0,5 кг, 27 голов. Лигногумат, сапропелевый гумат и гумат леонардита не оказывали значимого влияния на САД (85-100 мм.рт.ст.), ЧСС (210-240 уд./мин) и параметры ЭКГ через 3 ч после первого введения и при длительном применении через 3, 14 и 30 суток (Табл. 6), что с учетом отсутствия патолого-анатомических признаков повреждения сердца и влияния на АСТ свидетельствует об отсутствии кардиотоксического действия. Изучение влияния на поведенческую аютшность проведено с использованием модели эвристических решений (Патент РФ №2506649) на 42 белых аутбредных крысах самцах, массой тела 210,9±14,3 г, интактная группа (здоровые животные) 21 голова, и 3 опытных группы по 7 голов в каждой.

Изучаемые вещества вводили в предполагаемой терапевтической дозе 100 мг/кг в течение 7 суток, последний раз за 1 ч до начала теста, лигногумат внутримышечно, гумат леонардита и сапропелевый гумат внутрь. Животных погружали в стеклянный цилиндр, заполненный холодной водой 11°C, где размещено предлагаемое средство спасения - рейка или верёвка. Согласно методике (Патент РФ №2506649) рассчитывали время нахождения решения (ВНР, сек.) и время выполнения решения (ВВР, сек.) задачи покинуть цилиндр при первом и вторичном тестировании (через 15 мин. после первого), вероятность решения задачи (ВРЗ, %) — процентное количество животных, успешно выполнивших задачу по отношению к общему количеству животных в группе, Индекс психоземotionalного воздействия (ИПД) и Индекс моторно-

двигательного воздействия (ИДД). Общее время наблюдения за каждым животным - не более 120 сек. Установлено, что гумат леонардита незначительно сокращал время нахождения и время выполнения решения задачи при первом и последующем тестировании, расчетные значения индексов ИПД=0,96 и ИДД=0,95, что свидетельствует о слабом психостимулирующем действии. Сапропелевый гумат незначительно повышал затраты времени на нахождение и выполнение решения задачи, значения индексов ИПД=1,01 и ИДД=1,35, что свидетельствует о наличии слабого седативного эффекта. Лигногумат значительно сокращал время принятия решения при первичном предъявлении, в меньшей степени влияя на время выполнения задачи, ИПД=0,29 и ИДЦ=1,09 (Табл. 7), что свидетельствует о вероятном наличии психостимулирующего или адаптогенного действия при отсутствии влияния на двигательную активность.

Исследование местно-раздражающего действия растворов лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита проведено на 100 кроликах самцах породы белый великан массой 3,5±0,5 кг, по 5 животных в каждой группе. Результаты оценивали полуквантитативно при помощи бальной шкалы оценки. Лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат при однократном и многократном нанесении на конъюнктиву глаза (конъюнктивальная проба - 0,5; 1 и 5% растворы) и на кожные покровы (метод кожных аппликаций — 1; 5; 10% растворы) оказывают слабое раздражающее действие (1 класс раздражающего действия), проходящее самостоятельно без осложнений, не оказывают отрицательного влияния на общее клиническое состояние животных, поведение, температуру тела (38,2±0,3°C), ЧДД (76±2,5/мин.), ЧСС (255±15,0 уд./мин.), что позволяет констатировать отсутствие опасности развития контактного дерматита при нанесении на кожные покровы и реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типа.

Оценка эмбриотоксического и тератогенного действия проведена на 140 белых аутбредных самках крыс массой тела 195,5±7,0 г при применении лигногумата (внутримышечно в дозах 100; 280 и 360 мг/кг), сапропелевого гумата и гумата леонардита (перорально в дозах 100,500 и 1000 мг/кг) беременным самкам с первых суток беременности в течение 18 суток. Эвтаназию проводили на 19 сутки беременности у половины всех самок опытных и интактной групп, по 7 из каждой группы. Проводили аутопсию, подсчитывали количество жёлтых тел беременности, мест имплантации эмбрионов, живых, мертвых плодов, рассчитывали показатели смертности - доимплантационную, постимплантационную, общую эмбриональную смертность. Определяли наличие отечности, кровоизлияний, аномалии развития у плодов. Оставшиеся беременные самки родили. Подсчитывали количество живых и мертворожденных крысят, оценивали наличие уродств и аномалий развития, массу тела, краниокаудальный размер. На фоне применения лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита в предполагаемой терапевтической дозе 100 мг/кг выявлена тенденция к снижению доимплантационной смертности (не более чем на 7% при сравнении с интактом), ни в одной из опытных групп не выявлено увеличения количества мертвых эмбрионов.

Таблица 6

Влияние максимально переносимых доз лигногумата (360 мг/кг), сапропелевого гумата

Показатель ЧСС, уд/мин. Длительность интервалов (10⁴ с) Амплитуда зубцов, мВ

Р | РО | (?!« | О-Т | Я-Я Р | Я | Т

Исходно для каждой из групп животных

Лигногумат 230±8,0 3,0±0,1 5,8±0,2 2,9±0,2 14,0±0,3 282±0,3 1,9±0,1 4,5±0,3 3,7±0,1

Сапропелевый гумат 220±6,0 2,9±0,3 5,8±0,5 3,1±0,5 13ДШД 28,0±0,3 1,6±0,3 5,0±0,5 3,9±0,2

Гумат леонардита 230±5,00 3,0±1,5 5,7±0,4 3,1±0,1 13,8±0,5 273±0,5 1,7±0,2 5,0±0,2 3,7±0,3

Через 3 ч после введения изучаемых веществ

Лигногумат 235±5,0 2,8+0,3 5,8+0,2 2,8+0,1 143+0,9 29,0Ш2 1,9+0,1 5,0+0,4 3,9+0,2

Сапропелевый гумат 230+10,0 2,8+0,3 5,8+0,3 3,2+0,2 13,9+1,0 28,0+0,1 1,7+0,3 5,0+0,5 4,0+0,5

Гумат леонардита 230+6,0 3,0+0,4 5,7+0,3 3,1+0,1 13,7+2,0 28,0±0,3 1,8+0,4 5,5+0,5 3,8+0,1

Через 3 суток ежедневного введения изучаемых веществ

Лигногумат 230+5,0 3,1+0,1 5,5+0,1 2,9+0,2 14,0Щ5 28,8±0,9 1,9+0,3 4,5+0,1 4,0+0,1

Сапропелевый гумат 230+10,0 3,0+0,4 5,6+0,2 3,1+0,1 13,9+0,3 28,04)2 1,7+0,5 5,5+0,2 3,9+0,2

Гумат леонардита 235+7,0 3,1+0,3 5,7+0,1 зд+оз 13,7+0,3 28,2±0,2 1,8+0,2 5,5+0,2 3,8+0,5

Через 14 суток ежедневного введения изучаемых веществ

Лигногумат 230+5,0 3,2+0,4 5,4+0,7 3,0+0,3 14,2+0,3 27,7+0,3 1,8+0,2 5,0+0,1 4,1+0,5

Сапропелевый гумат 230+7,0 3,1+0,4 5,7+0,3 3,1+0,7 13,9+0,7 28,0Ш3 1,7+0,1 5,5+0,5 3,8+0,5

Гумат леонардита 240+5,0 зд+оз 5,6+0,2 3,2+0,3 13,6+0,9 28,5+0,3 1,7±0,3 5,0+0,9 3,8+0,3

Через 30 суток ежедневного введения изучаемых веществ

Лигногумат 240+5,0 3,0+0,1 5,5+0,3 2,9+0,2 14,3+0,3 28,8±0,2 1,7+0,1 5,5+0,2 4,0+0,1

Сапропелевый гумат 230+3,0 3,2+0,3 5,8+0,3 зд+оз 13,9+0,3 29,5+0,3 1,8+0,4 5,0+0,7 3,9+0,3

Гумат леонардита 240+5,0 2,8+0,4 5,7+0,1 3,0+0,3 13,7+0,3 28,5+0,1 1,7+0,1 5,5+0,2 3,8+0,2

Таблица 7

Влияние лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита (доза 100 мг/кг) на поведенческие реакции животных на модели эвристических решений_

Группа животных ВРЗ, % Время решения задачи, сек.

при 1-м тестировании 15 мин. после 1-го

ВНР, ВВР, ВНР2 ВВР2

Интакт, среднее 100 8,99+2,11 2,38+0,22 5,14+2,50 2,14+0,23

Гумат леонардита 100 8,64+4,33 2,07+0,28 4,98+2,37 2,25+0,23

ипд - 0,96 - - -

идд - 0,95 - - -

Сапропелевый гумат 100 8,24+2,99 4,14+0,70 6,10+3,42 2,00+0,32

ипд - 1,01 - - -

ИДЦ - 1,35 - - -

Лигногумат 100 2,07+0,49** 2,86+0,79 2,06+0,61 2,10+0,65

ипд - 0,29 - - -

ИДД - 1,09 - - -

Примечание: ** - $P < 0,01$ - достоверность различий при сравнении показателей опытных групп с интактом. ВНР1 - время нахождения решения задачи при первом предъявлении средства спасения; ВНР2 - то же при повторном тестировании; ВВР1 - время выполнения

решения задачи при первом тестировании; ВВР2 — то же при повторном тестировании; ВРЗ - вероятность решеши задачи, %; ИПД - индекс психоэмоционального воздействия; ИДД - индекс моторно-двигательного воздействия.

В терапевтической, средней и максимально переносимой дозах не было выявлено увеличения общей эмбриональной смертности, в терапевтической дозе наблюдалось незначительное снижение мертворождаемости (в пределах 21% по сравнению с интактом), не выявлено повышения количества крысят с аномалиями и уродствами (не более чем 0,8% при 1,9% в интактной группе), влияния на массу тела (не менее чем $6,00 \pm 0,7$ г) и краниокаудальный размер (не менее $50,5 \pm 1,2$ мм) новорожденных крысят. Следовательно, применение лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита беременным самкам крыс не оказывает отрицательного влияния на репродуктивную функцию и полученное потомство.

Таким образом, доказано, что лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат являются умеренно токсичными (3 класс токсичности и опасности), не кумулируют, индекс широты терапевтического действия > 45 , не обладают органотропной токсичностью; при нанесении на кожные покровы и слизистые оболочки оказывают слабое раздражающее действие (1 класс) при концентрации растворов более 5%; не обладают эмбриотоксическим и тератогенным действием в эксперименте.

4. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЗИНТОКСИКАЦИОННЫХ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ СОЛЕЙ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Исследования проведены на 271 белых аутбредных крысах самцах и 150 белых аутбредных мышах самцах; 6 моделей интоксикаций трех различных категорий: психотропными лекарственными веществами (клозапин, гексенал и мединал); прооксидантами (окисленная олеиновая кислота и мезо-ксалиломочевина) и на модели токсического гепатита, вызываемого четырёххлористым углеродом.

Скрининг антитоксической активности в тесте «гексеналовый сон» проведен на 30 белых аутбредных крысах самцах, $220,5 \pm 5,0$ г; 5 групп (по 6 животных в каждой), 1 контрольная (здоровые животные, вводили только гексенал), 4 группы - опытных. Препарат сравнения - эссенциальные фосфолипиды (ЭФЛ), (препарат Эссенциале Н, «A.Nattermann and Cie., GmbH», Германия), вводили в дозе 80 мг/кг в виде официального раствора однократно подкожно за 24 ч до гексенала. Три опытных группы для гумата леонардита, сапропелевого гумата и лигногумата, вводили в виде 1% водных растворов в дозе 10 мг/кг однократно за 40 мин. до гексенала; гумат леонардита и сапропелевый гумат — перорально; лигногумат — внутримышечно. Гексенал (1,5-диметил-5 (циклогексен-1-ил)-барбитурат натрия, порошок Гексенал, «Рижский ХФЗ», Латвия) вводили в виде 4% водного раствора однократно внутривенно в дозе 60 мг/кг. Критерии эффективности: продолжительность сна; длительность периода засыпания (латентный период сна - Тлат). Общее время наблюдения - 120 мин.

Таблица 8

Влияние солей гуминовых кислот на показатели «гексеналового сна»

Показатель Контроль ЭФЛ Гумат леонардита Лигногумат Сапропелевый гумат

Тлат-, мин $5,00 \pm 0,43$ $5,98 \pm 0,34$ $5,80 \pm 1,35$ $4,75 \pm 0,25$ $5,33 \pm 0,56$

- разница с контролем, % - +19,6 +16,0 -5,0 +6,7

Длительность сна, мин. $73,57 \pm 11,66$ $30,8 \pm 2,96^{**}$ $42,80 \pm 9,42$ $29,67 \pm 11,96^{*}$ $50,17 \pm 14,47$

- разница с контролем, % - -58,1 -41,8 -59,7 -31,8

Кол-во уснувших животных, % 100 100 100 66,6 100

Примечание: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$ - достоверность различий при сравнении с контролем; Тлат - латентный период сна, т.е. длительность засыпания.

Установлено, что гумат леонардита снижает длительность гексеналового сна на 41,8%, сапропелевый гумат - на 31,8% (Табл. 8). Лигногумат обеспечивает достоверное снижение длительности сна на 59,7%, что сопоставимо с эффектом ЭФЛ, при этом 33,3% животных (2 из 6 подопытных) не уснули вообще. Таким образом, доказана способность гумата леонардита, сапропелевого гумата и лигногумата снижать длительность наркотического сна, вызываемого барбитуратами, что характеризует наличие дезинтоксикационной активности, наиболее выраженной для лигногумата.

Изучение дезинтоксикационных свойств в тесте «мединаловый сон» проведено на 20 самцах белых аутбредных мышей, 20,5±5,6 г; 3 группы - интактная (7 голов, здоровые животные), контрольная (6 голов, мединал без введения других веществ), опытная (7 голов, вводили лигногумат в дозе 10 мг/кг однократно внутримышечно за 1 ч до мединала). Мединал (5,5-диэтилбарбитурат натрия, субстанция-порошок Мединал производства «Усо-лье-Сибирский ХФЗ», Россия) вводили в виде 1% водного раствора в дозе 250 мг/кг однократно подкожно. Установлено, что лигногумат снижает Тлат на 3,9%, увеличивает количество проснувшихся животных через 4 ч на 8,6% и достоверно снижает длительность сна мышей, проснувшихся в течение первых 4-х ч на 21,5% по сравнению с контролем, что подтверждает наличие дезинтоксикационных свойств.

Изучение дезинтоксикационных свойств при острой интоксикации клозапином проведено на 120 самцах белых аутбредных крыс массой тела 180,0±9,0 г. Клозапин вводили однократно внутрижелудочно в виде 2,5% раствора на пропиленгликоле в дозе 200 мг/кг, близкой к LD50. Контрольной группе животных вводили только клозапин. Одной из опытных групп животных вводили препарат сравнения - поливинилпирролидон (препарат Гемодез, производства ОАО «Биохимик», Россия) в дозе 6 мг/кг внутривенно трехкратно через 2 ч, 24 ч и 48 ч после отравления. В связи с тем, что поливинилпирролидон является обязательным компонентом базисной дезинтоксикационной терапии, животным 3-х других опытных групп на фоне терапии поливинилпирролидоном дополнительно вводили лигногумат двукратно внутримышечно через 2 ч и 48 ч после отравления в дозах 50 мг/кг, 25 мг/кг или 12,5 мг/кг. Наиболее эффективной оказалась схема комбинированной терапии, включающая поливинилпирролидон и лигногумат в дозе 12,5 мг/кг,

обеспечившая значительное повышение выживаемости животных на 33,4% по сравнению с контролем (Табл. 9).

Таблица 9

Влияние лигногумата на выживаемость животных при интоксикации клозапином

Группа (n=12 в каждой группе) Выживаемость, %

Контроль (интоксикация клозапином) 33,3

Препарат сравнения (поливинилпирролидон) 50,0

Комбинированная терапия

Схема 1 - поливинилпирролидон+лигногумат 12,5 мг/кг 66,7

Схема 2 - поливинилпирролидон+лигногумат 25 мг/кг 50,0

Схема 3 - поливинилпирролидон+лигногумат 50 мг/кг 41,7

Продолжительность токсического сна, вызываемого клозапином, при комбинированной терапии поливинилпирролидоном и лигногуматом уменьшилась на 18,4%, степень угнетения рефлексов положения являлась достоверно меньшей на 20,3% по сравнению с контролем. В группе комбинированной терапии поливинилпирролидоном и лигногуматом через 24 ч после введения клозапина повышение АЛТ являлось на 7,8% меньшим, чем в контроле, через 96 ч активность АЛТ в контрольной группе достоверно превышала нормальные значения на 15,0%, на фоне монотерапии поливинилпирролидоном - на 8,4% сравнению с интактом, тогда как при использовании лигногумата соответствовала нормальным значениям, что свидетельствует об уменьшении синдрома цитолиза гепатоцитов.

Изучение дезинтоксикационных свойств на модели интоксикации окисленной олеиновой кислотой проведено на 110 белых аутбредных мышцах самцах массой тела 19,0±3,5 г; 11 групп по 10 мышей в каждой - контрольная, интактная и 9 опытных групп, различающихся дозами и схемой введения лигногумата. Окисленную олеиновую кислоту получали по методу Кудряшова Ю.Б. (1964) из цис-9-октадеценовой кислоты (кислота олеиновая, ЗАО «Вектон», Россия), экспериментально подобрана доза приближающаяся

к ЛД50 вызывающая 50-60%-ную смертность в течение 3-х суток - 25,0 мл/кг. Мышам интактной группы вводили однократно внутривентриально неизмененную олеиновую кислоту, в данной группе летальность отсутствовала. Животным контрольной группы однократно внутривентриально вводили окисленную олеиновую кислоту в дозе 25 мл/кг. Животным опытных групп вводили 5% водный раствор лигногумата в дозах 1, 10, и 100 мг/кг, однократно внутримышечно по трем схемам - за 1, 6 или 24 ч до введения окисленной олеиновой кислоты. Продолжительность наблюдений — 72 ч. Установлено, что наиболее выраженный антиоксидантный эффект наблюдался при введении лигногумата в дозе 1 мг/кг за 24 ч до окисленной олеиновой кислоты, эффективность начинала проявляться через 30 ч (снижение летальности на 20%), достигая максимума через 70 ч - снижение летальности составило 40%, причем повышение дозы не приводило к повышению выживаемости.

Изучение дезинтоксикационных свойств на модели острой интоксикации мезоксалилмочевинной проведено на 70 белых крысах самцах, 160,0±25,5 г; 6 групп по 10 животных в каждой. Интоксикацию воспроизво-

дили путем введения мезоксалиломочевины однократно подкожно в дозе приближающейся к ЛД50 - 150 мг/кг. Животным 6 опытных групп вводили лигногумат в дозе 10 мг/кг однократно внутримышечно по 6 различным схемам: профилактические схемы введения - за 7,4,3 и 1 сутки до введения мезоксалиломочевины, лечебные схемы введения — через 1 и 24 ч после введения токсиканта. Общая длительность эксперимента - 14 суток. Установлено, что общетоксическое воздействие мезоксалиломочевины вызывает гибель 60% животных контрольной группы начиная с 3 по 7-е сут. Лигногумат, применяемый по схемам за 7 сут. до и через 24 ч после токсиканта, полностью предотвращает гибель животных, причем последняя схема так же достоверно препятствовала снижению массы тела в раннем посттоксическом периоде (14 сутки).

Изучение дезинтоксикационных и гепатопротекторных свойств на модели токсического гепатита, вызываемого четыреххлористым углеродом проведено на 47 белых аутбредных крысах самцах массой тела 279,2±4,06 г, 5 групп - интакт (7 голов), контроль (10 голов) и 3 опытных (по 10 животных в каждой). Четыреххлористый углерод (тетрахлорметан, далее — ТХМ, ООО «Компонент-Реактив», Россия) вводили в виде 50% масляного раствора после суточной пищевой депривации перорально однократно в дозе 320 мг/кг. Лигногумат вводили в виде 0,5% водного раствора однократно внутримышечно в дозе 10 мг/кг, сапропелевый гумат и гумат леонардита вводили первые сутки однократно перорально в дозе 10 мг/кг 0,5% водного раствора через 24 ч после ТХМ, остальные дни в дозе 1 мг/кг групповым способом через автоматические поилки.

На фоне применения гумата леонардита через 7 суток после введения ТХМ выявлено достоверное снижение АСТ на 25,9% (P<0,05), АЛТ на 28,5%, ГГТП на 64,5% по сравнению с контролем (Табл. №), что свидетельствует о снижении выраженности проявлений холестаза и цитолиза. Применение сапропелевого гумата способствовало достоверному снижению ГГТП на 22,6%, АСТ на 17,3%, АЛТ на 9,4%. Введение лигногумата способствовало снижению АСТ на 11,1%, АЛТ на 17,8% (Табл. 10). Содержание общих липидов при сравнении с контролем снижалось на 23,7% (лигногумат), 31,6% (гумат леонардита, достоверно), 5,3% (сапропелевый гумат). Концентрация холестерина являлась более низкой по отношению к контролю соответственно на 21,3% (лигногумат, достоверно), 17,0% и 6,9% соответственно для гумата леонардита и сапропелевого гумата. Введение лигногумата и гумата леонардита сопровождалось повышением содержания альбуминов (на 8,8% и 11,3%) при относительном снижении содержания а-, р-, у-глобулинов. На фоне применения сапропелевого гумата наблюдалось перераспределение белковых фракций в пользу глобулинов: увеличение р-глобулинов составило 4,0% к контролю и 35,1% к интакту, содержание у-глобулинов превышало контроль на 13,2%, интакт на 26,9%, что может свидетельствовать об активизации гуморального звена неспецифической резистентности организма. Концентрация мочевины на фоне применения лигногумата, гумата леонардита и сапропелевого гумата превышала контроль соответственно на 61,3%, 44,4% и

43,8%. Содержание креатинина при применении гумата леонардита и сапропелевого гумата являлось более низким чем в контроле на 8,0% и 5,0% соответственно. В связи с тем, что содержание мочевины и креатинина в опытных группах не превышало уровня здоровых животных, данный факт наряду с повышением содержания альбуминов можно расценивать как свидетельство относительно лучшей сохранности биосинтетической функции печени.

Таблица 10

Биохимические показатели цитолиза и холестаза (7 сутки после введения ТХМ)

Показатель Ингам- Котроль Лигногумат Гумат леонардита Сапропелевый гумат

АСТ, ЦД/л 43,0±6,9 58,8±3,9+ 52,3±2,0 43,6±3,2** 48,6±4,1*

разшца с интактом, % - +36,7 +21,6 +1,4 +13,0

разница с котпролем, % - -Ш -25,9 -173

АЛТ, ЕД/л 38,1+4,24 67,±8,44++ 55,7±2,7++ 48,5±1,65*, + 61,4±9,64+

разница с интактом, % - +78,0 +46.2 +27,3 +61,2

разница с контролем, % - -17,8 -28,5 -9,4

ГТТП,ЕД/л 1,93±0,53 6,20+0,52+++ 8,25+2,15 2,20+0,97* 4,80+1,23+, *

разница с шпакгом, % - +221,0 +327,0 +14,0 +149,0

разница с контролем, % - - +33,1 -64,5 -22,6

Примечание: + - P<0,05; ++ - P<0,01; +++ - P<0,001 - достоверность различий при сравнении с интактом, * - P<0,05; ** - P<0,01 - достоверность различий при сравнении с контролем.

При проведении теста открытое поле (6 сутки) выявлено, что на фоне применения лигногумата и гумата леонардита наблюдалось снижение меры локомоции наряду со снижением уровня тревожности животных. На фоне применения сапропелевого гумата наблюдалось повышение горизонтальной активности на 18,7% по отношению к контролю, предотвращение повышения вертикальной активности (на 3,4%) и норкового рефлекса (на 31,4%) по сравнению с контролем, что свидетельствует о предотвращении снижения локомоторной активности и уменьшении выраженности тревожности. При проведении патолого-анатомических исследований в опытных группах выявлена тенденция к предотвращению снижения массы печени (в пределах 2,8%) и препятствование увеличению массы почек, легких и сердца.

Таким образом, доказаны дезинтоксикационные свойства солей гумино-вых кислот, обусловленные способностью повышать антитоксическую функцию печени и антиоксидантной активностью. Впервые (Патент РФ№2232024) доказано, что при острой интоксикации клозапином лигногумат в составе комбинированной терапии с поливинилпирролидоном обеспечивает повышение выживаемости, уменьшает проявления цитолиза гепатоцитов и улучшает клиническое состояние животных, в связи с чем представляется возможным создание дезинтоксикационного средства, содержащего лигногумат, для комплексной фармакотерапии острых интоксикаций психотропными средствами, прооксидантами и гепатотоксичными веществами. Предполагаемая лекарственная форма - раствор 5% для внутримышечных инъекций.

5. ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ И АНТИДИАБЕТИЧЕСКОМ АКТИВНОСТИ СОЛЕЙ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Исследования проведены на лабораторных животных общим количеством 470 голов, из них 200 мышей (самцы и самки) и 270 крыс (самцы); 5 моделей (глюкозо-толерантный тест, аллоксановый и стрептозоциновый сахарных диабет в различных модификациях).

Скрининг гипогликемической активности на модели глюкозо-толерантного теста (ГТТ) проведен на 120 здоровых животных - мышах самцах и самках массой тела 20,3±3,2 г - контрольная группа (40 животных - по 20 самцов и самок), 4 опытных группы по 20 животных в каждой, из них 10 самцов и 10 самок. Препарат сравнения - глибенкламид (препарат Мани-нил 5, Берлин-Хеми АГ/Менарини Групп, Германия), вводили за 1 ч до введения глюкозы однократно перорально при помощи желудочного зонда, в виде 0,01% суспензии в дозе 0,36 мг/кг, что соответствует максимальной суточной дозе для человека. Гумат леонардита или сапропелевый гумат вводили в дозе 10 мг/кг в виде 0,1% водных растворов однократно перорально за 30 мин. до введения глюкозы, лигногумат - в дозе 10 мг/кг однократно внутримышечно за 24 ч до глюкозы. Предварительно всех животных подвергали 12-часовой пищевой депривации при свободном доступе к воде. В течение всего периода проведения ГТТ (120 мин.) животные были лишены корма. ГТТ воспроизводили путем введения 40% раствора глюкозы однократно подкожно в дозе 3 г/кг. Измерения концентрации глюкозы в крови животных опытных групп проводили 5-и кратно - натощак до введения изучаемого вещества (исходно), через 30 мин. после введения изучаемого вещества до введения

глюкозы (точка отсчета, принимаемая за 0 мин.), через 30, 60 и 120 мин. после введения глюкозы. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозоокси-дазным методом, забор крови осуществляли путем дистальной резекции хвоста. Установлено, что лигногумат в отличие от глибенкламида незначительно снижает гликемию натощак (на 18,6%) и при этом вызывает достоверное снижение постпрандиальной

гликемии через 30 мин. ГТТ в среднем на 18,7% и через 60 мин. на 26,8% при сравнении с абсолютными значениями контроля, что являлось сопоставимым с гипогликемической активностью глибенкламида. Гумат леонардита и сапропелевый гумат не проявляли выраженной гипогликемической активности (Рис. 2).

Изучение прямой гипогликемической активности лигногумата проведено на здоровых животных без глюкозной нагрузки (40 крыс самцов массой 190,5±0,6 г). Установлено, что гипогликемическое действие наблюдает-

Концентрация глюкозы крови, мМ/л

» Кылриь. средне« —о—Г™бе.*таыиа

•••О Гумит леонардита ■ А-■ - Сапролегквы» гуиаг

—О-Лнкяуиаг

Рис. 2. Гипогликемическая активность солей гуминовых кислот при ГТТ (здоровые животные)

ся только при применении лигногумата в высокой дозе 100 мг/кг - достоверное ($P<0,001$) снижение концентрации глюкозы на 40,4% через 24 ч голодания, однако гликемия сохранялась в пределах нижней границы видового-возрастной нормы, составив $3,1\pm 0,21$ мМ/л.

Изучение антидиабетических свойств лигногумата на модели ал-локсанового сахарного диабета проведено в 2 этапа - на 1 этапе проведен выбор наиболее эффективной схемы введения лигногумата, на 2 — выбор максимально эффективной дозы.

На 1 этапе исследования проведены на 70 белых крысах самцах массой тела $160,0\pm 25,5$ г (6 групп по 10 животных в каждой). Аллоксан вводили однократно подкожно в высокой диабетогенной дозе - 150 мг/кг. Животным 6 опытных групп вводили лигногумат в дозе 10 мг/кг однократно внутримышечно в разные сроки: «профилактика» - за 7, 4, 3 и 1 сутки до введения ал-локсана, и «лечение» - через 1 и 24 ч после аллоксана. Установлено, что общетоксическое воздействие аллоксана вызывает гибель животных контрольной группы в течение 3-7 суток в 60% случаев. Максимальной эффективностью обладает лигногумат, применяемый через 24 ч после и за 7 суток до аллоксана, данные схемы обеспечивали 100% выживаемость животных. В контрольной группе снижение массы тела к 14 дню составило 19,9% по сравнению с исходным. Введение лигногумата через 24 ч после аллоксана обеспечило достоверное нарастание массы на 5,3%. Наиболее эффективной по сравнению с другими является схема введения лигногумата через 24 ч после аллоксана - на 3-й сутки обеспечивает достоверно ($P<0,001$) в 2,19 раза меньшую, чем в контроле концентрацию глюкозы и наиболее раннюю тенденцию к ее нормализации (на 9 сутки).

На 2 этапе исследования проведены на 70 самцах белых аутбредных крыс массой тела $160,0\pm 10,5$ г - 5 групп (10 голов интакт, 15 — контроль, 3 опытных группы по 15 голов для 3-х различных доз лигногумата). Аллоксан вводили в дозе 140 мг/кг однократно подкожно, доза аллоксана была уменьшена по сравнению с 1 этапом для снижения летальности животных контрольной группы. Животным опытных групп вводили лигногумат однократно внутримышечно в дозах 1, 10 и 100 мг/кг через 24 ч после аллоксана.

Установлено, что наибольшую эффективность проявляет лигногумат в дозе 1 мг/кг, предотвращая развитие гипергликемии в течение всего периода наблюдений (Табл. 11): на 3 сутки достоверно в 2,7 раза меньше, на 8 сутки - в 4,6 раза ($P<0,001$), на 14 сутки - в 4,1 раза меньше, чем в контроле. Клиническое состояние животных данной опытной группы расценивалось как удовлетворительное, шерстные покровы являлись сухими и чистыми, менее выраженными, чем в контрольной группе являлись проявления диабетической полидипсии (достоверно меньше на 25,7%) и полиурии (достоверно меньше на 27,8%). При проведении на 11 сутки ГТТ установлено, что наибольшее влияние на нормализацию гликемической кривой оказывает лигногумат в дозе 1 мг/кг, обеспечивая через 30 мин. достоверно в 1,4 раза меньшую гликемию, через 60 мин. - в 2,5 раза меньшую, чем в контроле.

Таблица II

Влияние лигногумата на динамику гликемии при аллоксановом диабете

Гликемия, мМ/л (на 11 сутки исследования) Контроль Лигногумат 1 мг/кг Лигногумат 10 мг/кг Лигногумат 100 мг/кг

3 сутки $23,3\pm 1,57$ $8,6\pm 0,80$ *** $15,3\pm 2,20$ ** $20\pm 2,46$

5 сутки 20,3±2,11 5,7±0,79*** 10,8±1,10** 18,9±1,97

8сутки 19,8±3,50 4,3±0,59*** 5,5±0,73*** 11,3±1,67***

10 сутки 18,3±2,40 6,8±0,87*** 7,0±0,90*** 6,7±0,95***

12 сутки 18,8±1,97 7,3±1,30** ^ 8,8±0,85*** 6,4±0,88***

14 сутки 25,0±0,42 6,0±0,44*** 8,3±0,71** 8,0±1,10***

Примечание: * - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001 - достоверность различий при сравнении показателей опытных групп с контролем.

На фоне применения лигногумата в дозе 1 мг/кг выявлено достоверное увеличение количества островков Лангерганса на 65,2% по сравнению с контролем, при этом сохранялось снижение размеров островков по сравнению со здоровыми животными, однако клетки с некротическими изменениями практически отсутствовали (Рис. 3).

Интакт Контроль Лигногумат 1,0 мг/кг

(здоровые животные) (аллоксановый диабет) (аллоксановый диабет, лечение)

Островки Лангерганса - значительно уменьшены, количест- уменьшены при сравнении с интак-

размеры островков крупные, в поле 80 клеток снижено, много клеток с том, клетки с деструктивными изменениями расположены попарно деструктивными изменениями практически отсутствуют

Рис. 3. Гистологическая картина поджелудочной железы (аллоксановый диабет, 7 сутки). Увеличение - объектив 40. Окраска гематоксилин-эозин.

Для выяснения механизмов антидиабетического действия лигногумата определяли его антиоксидантные свойства при острой интоксикации аллоксаном. Исследование проведено на 30 белых аутбредных мышцах самцах массой 18,2±5,1 г (3 группы - интакт, контроль, опыт, по 10 в каждой). Аллоксан вводили в высокой диабетогенной дозе 240 мг/кг однократно подкожно. Лигногумат вводили однократно внутримышечно в дозе 10 мг/кг через 24 ч после

аллоксана. Через 1 сутки животных умерщвляли (хлороформный наркоз), осуществляли забор материалов для исследований. Анти-оксидантную активность определяли методом люминолзависимой индуцированной биохимиллюминесценции (Фархутдинов Р. Р., 1995) с использованием хемиллюмино-метра БХЛ-06М, рассчитывали разницу между светосуммой пробы с добавлением плазмы крови (контрольная проба) и без плазмы крови (опытная проба). Установле-

Антиоксидантная активность крови, АЭ. тУ

□ Интакт ■ Контроль □ Лигногумат

Рис. 4. Влияние лигногумата на антиоксидантную активность крови (интоксикация аллоксаном)

но, что в контрольной группе антиоксидантная активность компонентов крови и печени достоверно снижается по сравнению со здоровыми животными (интакт) на 32,9% и 33,3%. Лигногумат достоверно повышает антиоксидантную активность крови на 59,0% (P<0,001) к контролю, на 6,6% к интакту (Рис. 4).

Изучение антидиабетических свойств лигногумата на модели стрептозоцинового диабета проведено на 50 белых аутбредных крысах самцах массой 155,0±23,5 г (5 групп по 10 животных в каждой). Лигногумат вводили однократно внутримышечно в дозах 1, 10 и 100 мг/кг на 4 сутки после первого введения стрептозоцина. Установлено, что наиболее эффективным является лигногумат в дозе 1 мг/кг, обеспечивая на 4 сутки достоверно на 36,2% меньшую гликемию, раннюю ее нормализацию начиная с 10 суток, на 12 сутки - достоверно (P<0,05) в 1,4 раза меньший уровень гликемии по сравнению с контролем (Рис. 5). Установлено, что при проведении ГТТ лигногумат в дозе 1 мг/кг, обеспечивает достоверное снижение гликемии через 60 и 120 мин. соответственно в 1,4 раза и в 1,7 раза по сравнению с контролем.

В целом, впервые доказано, что лигногумат достоверно снижает концентрацию глюкозы при экспериментальном сахарном диабете и диабетическую полиурию, обладает сопоставимой с глибенкламидом гипогликемической активностью и отличается низким риском развития гипогликемического состояния при применении натошак, в связи с чем возможно создание лекарственного средства, содержащего лигногумат, для коррекции прандиальной гликемии при декомпенсации сахарного диабета 2 типа. Предполагаемая лекарственная форма-раствор 5% для внутримышечных инъекций.

6. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ, АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ И РЕГЕНЕРАТОРНЫХ СВОЙСТВ СОЛЕЙ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Исследования проведены на 5 экспериментальных моделях, использовано 479 животных (250 белых аутбредных конвенциональных мышей, 229 белых аутбредных конвенциональных крыс).

Скрининг аналгетической активности в тесте укусные корчи проведен на 160 белых аутбредных мышах самцах и самках с массой тела $28,0 \pm 0,9$ г - контрольная (30 голов, по 15 самцов и самок), 13 опытных групп и 1 группа для препарата сравнения (по 10 животных в каждой группе, из них

.....

24,6±2,1

\

136,2%

""»-;да.85

1 ЯК 0 °, 5.410.50*

4 5 ■"Контроль

10 12 14 сутки — Лигногумат 1 мг/кг

Рис. 5. Динамика гликемии при стрептозоциновом диабете

по 5 самцов и самок). Болевую реакцию моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения 3% водного раствора уксусной кислоты в дозе 300 мг/кг. Животным опытных групп за 40 мин. до уксусной кислоты вводили лигногумат (однократно внутримышечно в дозах 1; 5; 10 и 100 мг/кг), сапропелевый гумат и гумат леонардита (в дозах 0,2; 1; 5 и 10 мг/кг однократно перорально при помощи металлического желудочного зонда). Препарат сравнения - диклофенак натрия вводили однократно внутривентриально в дозе 8 мг/кг. Длительность наблюдения - 20 мин.

Установлено, что наиболее эффективным являлся гумат леонардита в дозе 1 мг/кг, достоверно снижая количество корчей на 53,9% ($P < 0,001$), по альтернативному критерию процент животных с аналгезией составил 60%, что являлось сопоставимым с аналгетической активностью диклофенака натрия (Табл. 12). Кроме того, гумат леонардита снижал объем экссудата в брюшной полости на 19,2%, сапропелевый гумат - на 75,5%, что являлось сопоставимым с эффектом диклофенака натрия. Расчетное значение EO_{50} для гумата леонардита по альтернативному критерию (метод пробит-анализа) $ED_{50} = 8,75 \pm 3,92$ мг/кг. Гумат леонардита является в 2,8 раза менее токсичным по сравнению с диклофенаком натрия, так как значение терапевтического индекса гумата леонардита $TI = 91,4$, для диклофенака натрия $TI = 32$.

Изучение аналгетических свойств на модели электрокожного болевого раздражения проведено на 90 белых аутбредных мышах самцах массой тела $20,5 \pm 3,1$ г, контрольная и 14 опытных групп, по 6 голов в каждой. Болевое раздражение моделировали при помощи устройства, представляющего собой клетку с полом из металлических прутьев, позволяющих подавать электрический ток к лапам животного.

Таблица 12

Аналгетическая активность лигногумата, сапропелевого гумата и

гумата леонардита в тесте «уксусные корчи»

Группа Кол-во корчей, шт. Кол-во корчей, разщца с котролем, % Кол-во животных с аналгезией, %

Контроль 18,75±1,69 - -

Диклофенак натрия 8 мг/кг 8,50±2,98** -54,7 70,0

Лигногумат 1 мг/кг 18,70±4,35 -0,3 0

Лигногумат 5 мг/кг 16,40±3,7 -12,5 10,0

Лигногумат 10 мг/кг 16,10±5,3 -14,1 10,0

Лигногумат 100 мг/кг 11,2±3,11* -40,3 50,0

Гумат леонардагга 0,2 мг/кг 16,4±2,7 -12,5 10,0

Гумат леонардита 1 мг/кг 8,65±1,93*** -53,9 60,0

Гумат леонардота 5 мг/кг 15,82±8,87 -15,6 50,0

Гумат лео(ирд! па 10 мг/кг 11,73±3,58* -37,4 40,0

Сапропелевый гумат 0,2 мг/кг 18,05±3,24 -3,7 0

Сапропелевый гумат 1 мг/кг 14,90±3,12 -20,5 30,0

Сапропелевый гумат 5 мг/кг 18,25±8,99 -2,7 30,0

Сапропелевый гумат 10 мг/кг 17,80±3,05 -5,1 20,0

Примечание: ** - $P < 0,01$ - достоверность различий при сравнении показателей в опытных группах с контролем.

Измерения порога болевой чувствительности проводили при помощи вольтметра (в пределах от 10 до 25 V), 4-хкратно в течение 1 ч. через каждые 15 мин. Препарат сравнения — диклофенак натрия, вводили внутримышечно и перорально в дозах 8 мг/кг и 1 мг/кг. Установлено, что гумат леонардита проявлял наибольшую эффективность в дозе 10 мг/кг, достоверно повышая порог болевой чувствительности через 45 мин. на 17,7%, лигногумат- максимально в дозе 5 мг/кг через 60 мин. на 18,9%; сапропелевый гумат в дозе 10 мг/кг - через 60 мин. на 69,9% по отношению к исходным значениям.

Изучение противовоспалительных свойств на модели отека лапы крыс проведено на 84 белых аутбредных крысах самцах массой 215,4±8,0 г, 14 групп по 6 голов в каждой - интакт, 3 контрольных группы, группа препарата сравнения (диклофенак натрия, внутримышечно в дозе 8 мг/кг), 9 опытных групп. Воспалительную реакцию моделировали путем введения 3% водного раствора формалина, 0,1 мл субплантарно в одну из задних конечностей. Осуществляли измерение объема конечности онкометрическим способом через 1 и 3 ч. после введения формалина; ректальной температуры тела через 3 ч. после формалина. Животным опытных групп за 1 ч. до формалина вводили лигногумат, гумат леонардита, сапропелевый гумат в дозах 1; 5 и 10 мг/кг.

Установлено, что гумат леонардита в дозе 1 мг/кг снижал отек конечности через 3 ч после введения формалина на 21,9%; в дозе 5 мг/кг (Рис. 3) — через 1 ч на 15,1% и через 3 ч на 14,4%; в дозе 10 мг/кг - через 3 ч на 12,8%.

На фоне применения лигногу-мата в дозе 5 мг/кг выявлено достоверное снижение отека конечности через 1 ч на 17,3%, через 3 ч на 9,4%.

Сапропелевый гумат являлся эффективным только в дозе 5 мг/кг, достоверно снижая отек конечности через 1 и 3 ч на 26,6% и 22,2% соответственно, что являлось сопоставимым с эффектом диклофена-ка натрия (Рис. 6).

Введение гумата леонардита и сапропелевого гумата в дозе 1 мг/кг сопровождалось достоверным снижением ректальной температуры на 4,8% и 3,0% соответственно группам. На фоне применения гумата леонардита наблюдалось так же относительное снижение количества юных и палочкоядерных нейтрофилов на 0,7%, сегментоядерных на 7,5% (достоверно, $P < 0,01$) при повышении количества лимфоцитов на 9,0%; индекс сдвига лейкоцитарной формулы влево составил 0,16, для сапропелевого гумата — индекс сдвига 0,15, что свидетельствует о предотвращении миграции незрелых форм лейкоцитов в периферическую кровь и подтверждает наличие противовоспалительной активности.

—О— Контроль » Диклофенак

—А—Лигногумат 5мг/кг —О— Гумат леонардита 5мг/кг

— Сапропелевый гумат 5мг/кг

Рис. 6. Динамика отека лапы крыс под влиянием лигногумата, гумата леонардита и сапропелевого гумата

Выявление наличия ulcerогенного действия лигногумата, гумата леонардита и сапропелевого гумата проведено на белых аутбредных крысах самцах массой тела $209,7 \pm 12,5$ г, 70 голов, по 10 животных в каждой группе. Установлено, что лигногумат, сапропелевый гумат и гумат леонардита при однократном и субхроническом введении в терапевтической дозе 10 мг/юг не вызывают покраснения, эрозий, язвенных повреждений и кровотечений на слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки, что свидетельствует об отсутствии ulcerогенного действия (Табл. 13).

Таблица 13

Оценка наличия ulcerогенного действия лигногумата, гумата леонардита и

сапропелевого гумата (доза 10 мг/кг)

Группа Выраженность эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки желудка, баллы

Однократное введение Субхроническое введение ежедневно в течение 4-х суток

Интакт 0 0

Лигногумат 0 0

Сапропелевый гумат 0 0

Гумат леонардита 0 0

Таким образом, установлено, что гумат леонардита обладает противовоспалительным и анальгетическим действием, сопоставимым по эффективности с диклофенаком натрия, при этом является в 2,8 раза менее токсичным и не проявляет ulcerогенного действия. В связи с вышеизложенным, для создания лекарственного средства, обладающего противовоспалительными свойствами для симптоматической терапии посттравматических болевых синдромов, сопровождающиеся воспалением и отеком может быть использован гумат леонардита. Предполагаемая лекарственная форма - твердая дозированная для приема внутрь.

Изучение регенераторных и противовоспалительных свойств гумата леонардита на модели термического ожога кожных покровов проведены на белых аутбредных крысах самцах общим количеством 75 голов, массой тела $198,5 \pm 20,3$ г. Моделирование экспериментальной ожоговой раны проводили в условиях обезболивания, седативного эффекта и миорелаксации, с использованием электрического устройства, обеспечивающего на поверхности контакта с кожными покровами температуру 100°C . Время аппликации 10 сек. Наносили 2 симметричных ожоговых участка по обе стороны от позвоночника на заднебоковой поверхности тела животного. Один участок - контрольный, заживление ожоговой раны проходило самостоятельно, второй участок являлся опытным, на его поверхность наносили изучаемые вещества. Степень ожога - IIIa, исходная площадь одного участка - 250 ± 50 мм², обоих - около 15% от поверхности тела животного. Площадь ожогов измеряли при помощи «Палетки для планиметрических измерений объектов в биологии и медицине» (Патент РФ №114147). Препарат сравнения - масло облепиховое (ЗАО «Алтайвитамины»), наносили на поверхность ожоговых участков еже-

дневно в количестве 0,15 мл. Мазь гумата леонардита (5%, основа - вазелин с ланолином в равных пропорциях) наносили ежедневно в количестве 0,15 г.

Предварительно проведена оценка регенераторной активности 5% раствора гумата леонардита при аппликационном применении, к 14 дню наблюдений выявлено достоверное улучшение степени заживления на 24,4% по сравнению с контрольной группой. Результаты исследований послужили обоснованием для создания мази на липофильной основе (вазелин с ланолином 1:1), содержащей 5% гумата леонардита. Состав и процентная концентрация мази были подобраны опытным путем.

Установлено, что на фоне применения мази гумата леонардита через 7 суток степень заживления опытных участков являлась на 25,4% лучшей при сравнении с контролем, на 16 сутки - достоверно лучшей на 27,1%. При этом

площадь ожоговых участков на фоне применения мази гумата леонардита за период наблюдения являлась не менее чем в 1,5 раза меньшей, чем в группе масла облепихового, а максимально - в 2,2 раза меньшей на 16 сутки (Рис. 7).

На фоне применения мази гумата леонардита в течение всего периода наблюдений отсутствовали признаки гнойного воспаления, тогда как в контрольной группе у 50% животных выявлено наличие краевой гиперемии, зон глубокого некроза и серозно-гнойного экссудата. К 28-му дню наблюдений на фоне применения мази гумата леонардита произошло полное заживление ожоговых участков по «первичному натяжению», с формированием тонкого рубца вытянутой формы с признаками частичной эпителизации (Рис. №). На фоне применения мази гумата леонардита на 12 сутки выявлено уменьшение СОЭ на 12,5% и лейкоцитоза на 14,3%, что характеризует снижение выраженности воспалительного процесса и согласуется с результатами визуальных наблюдений за заживлением ожоговых участков. При проведении теста «открытое поле» на фоне применения мази гумата леонардита наблюдалась нормализация поведенческой активности животных, наиболее значимым являлось повышение горизонтальной активности - в 5 раз при сравнении с контролем. По данным патолого-анатомических исследований применение мази гумата леонардита обеспечило предотвращение ряда характерных для ожоговой болезни патологических изменений внутренних органов - предотвращение инволюции тимуса (на 63,0% меньше при сравнении с контролем), спле-номегалии (достоверно меньше на 48,0% при сравнении с контролем), гипоплазии надпочечников (на 30,0% больше, чем в контроле).

В целом, доказано, что гумат леонардита при аппликационном применении проявляет регенераторные и противовоспалительные свойства при термических ожогах кожи, превосходит масло облепиховое в 1,5-2 раза по

Площадь ожоговых участков, % к исходному

1 день 7 день 12 день 16 день 20 день -О— Контроль ♦ Масла облепиховое

—11— Гумат леонардита, мазь

Рис. 7. Динамика заживления термических ожогов кожи при применении мази гумата леонардита

скорости заживления, предотвращает развитие гнойного воспаления и обеспечивает нормализацию поведенческой активности животных, в связи с чем перспективна разработка мази, содержащей гумат леонардита, для местного лечения термических ожогов, ран, язвенных поражений кожи. Предполагаемая лекарственная форма - мазь для наружного применения 5%, расчетная доза 30 г/м².

7. ИЗУЧЕНИЕ АДАПТОГЕННОЙ И АКТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СОЛЕЙ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Исследования проведены на 3 экспериментальных моделях, использовано 480 лабораторных животных, их них 190 белых аутбредных конвенциональных крыс и 290 белых аутбредных конвенциональных мышей.

Скрининг адаптогенной и актопротекторной активности на модели принудительного плавания с грузом проведен на 50 белых аутбредных мышах самцах массой тела 21,2±3,4 г, 5 групп - контрольная и 4 опытных, по 10 голов в каждой. Препарат сравнения - элеутерококка экстракт. Соли гу-миновых кислот и элеутерококка экстракт вводили по одинаковой схеме: однократно за 1 ч до проведения первой нагрузки в дозе 10 мг/кг, элеутерококка экстракт - подкожно, лигногумат - внутримышечно, сапропелевый гумат и гумат леонардита - перорально. Плавание мышей осуществляли в цилиндре, заполненном отстоянной водой температуры 20,0±0,5°C, груз - свинцовое кольцо весом 5% от массы тела, закрепленное у корня хвоста. Критерий оценки - продолжительность плавания до момента полного утомления. Рассчитывали степень

изменения выносливости животных (СИБ) по отношению к исходной продолжительности плавания и при сравнении с контролем. Установлено, что лигногумат оказал наибольшее по сравнению с гуматом леонардита и сапропелевым гуматом влияние на динамику изменения выносливости, достоверно повышая продолжительность плавания на 21,9% при второй и на 31,5% при третьей нагрузке относительно контроля, однако степень его эффективности при одинаковых дозах и схеме введения существенно уступает экстракту элеутерококка. (Табл. 14).

Изучение адаптогенных и акгопротекторных свойств лигногумата на модели принудительного плавания мышей с грузом проведено на 120 самцах белых аутбредных мышей массой $18,0 \pm 2,0$ г, 12 групп по 10 животных в каждой. Животным опытных групп вводили лигногумат в дозах 1; 10 и 100 мг/кг однократно внутримышечно за 1, 6 или 24 ч до начала первой нагрузки. Установлено, что схема введения лигногумата за 24 ч до проведения нагрузки обеспечивает проявление достаточной адаптогенной активности, максимальное повышение выносливости наблюдается в дозе 100 мг/кг при третьей нагрузке (через 48 ч после введения лигногумата) - на 55,9% при сравнении с контролем. В дозе 10 мг/кг эффект является менее выраженным, однако не вызывает последующего истощения. Для данной схемы введения произведен расчет ЕД₅₀ (метод пробит анализа), для вычислений выбраны значения эффективности по третьей нагрузке, $ED_{50} = 32,5 \pm 6,7$ мг/кг. В связи с тем, что эф-

32

фективная доза экстракта элеутерококка составляет 10 мг/кг, лигногумат в 3 раза менее эффективен при сопоставимой длительности действия.

Таблица 14

Изучение адаптогенной активности лигногумата, гумата леонардита и сапропелевого гумата на модели принудительного плавания

Группа Продолжительность плавания, сек. СИБ, % к контролю СИБ, л, % к исходному

Первая нагрузка - через 1 ч после введения изучаемых веществ

Контроль $214,3 \pm 17,2$ 100,0 100,0

Элеутерококка экстракт $292,3 \pm 19,7^{**}$ 136,4 100,0

Лигногумат $216,0 \pm 13,5$ 100,8 100,0

Гумат леонардита $210,5 \pm 9,4$ 98,2 100,0

Сапропелевый гумат $207,4 \pm 13,2$ 96,8 100,0

Вторая нагрузка - через 6 часов после первой

Контроль $194,7 \pm 20,3$ 100,0 90,9

Элеутерококка экстракт $301,2 \pm 23,3^{***}$ 154,7 103,0

Лигногумат $237,3 \pm 11,8^*$ 121,9 109,8

Гумат леонардита $220,5 \pm 5,7$ 113,3 102,9

Сапропелевый гумат $219,9 \pm 7,2$ 112,9 106,0

Третья нагрузка - через 24 ч после первой

Контроль $195,5 \pm 8,6$ 100,0 91,2

Элеутерококка экстракт $363,0 \pm 19,6^{++},^{***}$ 185,7 124,2

Лигногумат 257,2±14,7+,*** 131,5 119,1

Гумат леонардита 234,7±15,3* 120,1 111,5

Сапропелевый гумат 209,8±5,4 107,3 101,2

Примечание: +- P< 0,05; ++ - P< 0,01 - достоверность различий показателей опытных и контрольной групп с исходными значениями; * - P< 0,05; ** - P< 0,01; *** - P< 0,001 - достоверность различий показателей опытных групп с контролем; СИВ - степень изменчивости выносливости в опытной группе по отношению к контрольной; СИВ_{н/л} - то же при каждой последующей нагрузке по отношению к исходной первой нагрузке.

Изучение антигипоксикантных свойств лигногумата на модели нор-мобарической гиперкапнической гипоксии проведено на 120 самцах белых аутбредных мышей массой 18,5±2,5 г; 9 опытных групп и 3 контрольных группы, по 10 мышей в каждой. Животным опытных групп вводили лигногумат однократно внутримышечно в дозах 1; 10 и 100 мг/кг за 1, 6 и 24 ч до начала эксперимента. Установлено, что лигногумат (максимально - в дозе 100 мг/кг) достоверно (P<0,001) повышает время переносимости гипоксии не более чем на 23,9% преимущественно при повторных нагрузках, эффект начинает проявляться через 6 ч после введения и сохраняется не более 24 ч, что характеризует наличие антигипоксикантного действия небольшой степени выраженности.

Изучение адаптогенных свойств лигногумата на модели острого иммобилизационного стресса проведено на 190 белых аутбредных крысах самцах массой тела 175,9±15,5 г, по 10 животных в каждой группе. Осуществляли фиксацию животных к иммобилизационным платформам в дорсальном положении длительностью 18 ч. Лигногумат вводили однократно внутримышечно в дозах 1; 10; 100 мг/кг за 1, 6 и 24 ч до проведения иммобилизации.

Препарат сравнения - элеутерококка экстракт, вводили подкожно, однократно в дозе 10 мг/кг за 1 ч до проведения иммобилизации.

Установлено, что наибольшую адаптогенную активность лигногумат проявляет в дозе 10 мг/кг при введении за 1 ч до экстремального воздействия, но длительность эффекта продолжается не более 6 ч. Лигногумат обеспечивает незначительное снижение стрессогенных потерь массы тела, уменьшает выраженность гипертрофии надпочечников на 20,8% (Табл. 15), менее выражено предотвращает инволюцию иммунокомпетентных органов, в целом адаптогенная активность лигногумата является средней по степени выраженности и существенно уступает экстракту элеутерококка по большинству критериев. Однако, при всех схемах введения и во всех дозах лигногумат проявляет выраженные гастропротекторные свойства, обеспечивая снижение частоты встречаемости ульцерогенеза (максимально на 50% в дозе 1 мг/кг) и достоверное снижение суммарной длины стрессогенных язв не менее чем в 4,6 раза (Табл. 16).

Таблица 15

Оценка эффективности лигногумата по критерию гипертрофии надпочечников при иммобилизационном стрессе (доза 10 мг/кг, введение за 1 ч до иммобилизации)

Показатель Интакт Контроль Лигногумат Элеутерококка экстракт

Масса надпочечников, г/кг 0,24±0,02 0,32±0,02-н 0,27±0,01* 0,25±0,01**

гипертрофия надпочечников, разница с интактом, % 33,3 12,5 4,2

предотвращение гипертрофии, разница с контролем, % - - 20,8 29,1

Примечание: ++ - P<0,01 - достоверность различий при сравнении с исходными показателями; * - P<0,05; ** - P<0,01 - достоверность различий при сравнении показателей в опытных группах с контролем.

Таблица 16

Оценка эффективности лигногумата по критерию язвообразование

при иммобилизационном стрессе (доза 10 мг/кг, введение за 1 ч до иммобилизации)

Показатель Контроль Лигногумат Элеутерококка экстракт

Частота встречаемости ульцерогенеза, % 80,0 50,0 50,0

Суммарная длина язв, мм 4,69±0,39 1,01±0,20*** 0,99±0,22***

разница с контролем, % - 78,5 78,8

Примечание: ***- P<0,001 - достоверность различий при сравнении показателей в опытных группах с контролем.

8. ИЗУЧЕНИЕ ГАСТРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЛИГНОГУМАТА, САПРОПЕЛЕВОГО ГУМАТА И ГУМАТА ЛЕОНАРДИТА

Исследования проведены на модели НПВС-гастропатии с использованием 84 белых аутбредных крыс самцов массой тела 215,3±8,2 г; 12 групп — контрольная (18 голов), интактная, 10 опытных групп, по 6 животных в каждой. Экспериментальные язвы слизистой оболочки желудка моделировали путем однократного перорального введения диклофенака натрия (препарат

Диклофенак натрия, раствор в ампулах для внутримышечного введения, 75 мг/3 мл, Nemofarm, A.D., Сербия) в «ульцерогенной дозе» 50 мг/кг. Гумат ле-онардита, сапропелевый гумат или лигногумат вводили однократно перорально в дозах 1; 5 и 10 мг/кг за 50 мин. до диклофенака натрия. Эталон сравнения - фамотидин (препарат Квамател, лиофилизат для приготовления раствора для парентерального введения во флаконах, 20 мг/1 флакон, Gedeon Richter, Венгрия), вводили в дозе, соответствующей максимальной разовой для человека 0,3 мг/кг однократно внутривенно за 50 мин. до диклофенака натрия. Через 3 ч после введения диклофенака натрия всех животных подвергали эвтаназии, определяли количество язв, суммарную площадь язв в мм² при помощи «Палетки для планиметрических измерений объектов в биологии и медицине» (Патент РФ№114147). По формулам рассчитывали Индекс обширности, Индекс Паулса, определяли Противоязвенную активность.

Таблица 17

Изучение гастропротекторного действия лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита (доза 5 мг/кг)_

Показатель Контроль Фамотидин Гумат леонардита Сапропелевый гумат Лигногумат

Кол-во язв, шт./гол. 15,84±2,33 3,20±1,46 *** 3,25±1,60 *** 2,00±1,04 2,50±1,65 ***

разница с контролем, % - -79,8 -79,5 -87,4 -84,2

Площадь язв, мм² 31,34±7,54 6,10±3,75 ** 3,75±1,89 ** 3,80±2,32 ** 2,75±1,60

разница с контролем, % - -80,5 -88,0 -87,9 -91,2

Индекс обширности 2,06±0,53 1,52±0,27 0,75±0,32* 1,13±0,51 0,50±0,33*

разница с контролем, % - -26,4 -63,6 -45,4 -75,5

Кол-во животных в группе, гол. 18 6 6 6 6

Кол-во животных с малой

площадью язв (<15,7 мм²), гол. 6 6

Кол-во животных с малой 38,6 83,3 100,0 100,0 100,0

площадью язв, %

разница с контролем, % - +44,7 +61,4 +61,4 +61,4

Кол-во животных с язвами, % 100,0 100,0 83,33 66,66 50,00

Индекс Паулса, кол-во 15,84 3,20 2,71 1,33 1,25

Противоязвенная активность - 4,95 5,84 11,91 12,67

Индекс Паулса, площадь 31,34 6,10 3,12 2,53 1,37

Противоязвенная активность - 5,14 10,04 12,38 22,87

Примечание: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$ - достоверность различий при сравнении показателей в опытных группах с контролем.

Установлено, что по большинству критериев лигногумат менее эффективен по сравнению с гуматом леонардита и сапропелевым гуматом. Гастро-протекторная активность гумата леонардита и сапропелевого гумата сопоставима между собой и наиболее выражена в дозе 5 мг/кг, однако в высокой дозе эффект гумата леонардита не проявляется, тогда как для сапропелевого гумата сохраняется во всех изученных дозах. Применение сапропелевого гумата в дозе 5 мг/кг являлось наиболее эффективным и обеспечило достоверное снижение количества язв на 87,4%, площади - на 87,9%, индекса обширности на 45,4% (Табл. 17, Рис. 8).

А - интакт (здоровые животные). 1- слизистая оболочка желудка крыс гладкая, без эрозий и язвенных дефектов;

Б - контроль (через 3 ч после ulcerогенной дозы 50 мг/кг дик-лофенака натрия). 2 - множественные полосовидные язвенные дефекты большой площади; В - фамотидин (0,3 мг/кг однократно в/м за 50 мин. до дикло-фенака натрия). 3 - небольшое количество язвенных дефектов 3 округлой и удлиненной формы небольшой площади; Г - сапропелевый гумат (5 мг/кг однократно перорально за 50 мин. до диклофенака натрия). 4 - единичные точечные язвенные де-фекты округлой формы малой площади.

Рис. 8. Внешний вид слизистой оболочки желудка при НПВС-гастропатии

Противоязвенная активность сапропелевого гумата по критерию количеств язв составила 11,91, что превышает эффективность эталона сравнения фамотидина в 2,4 раза; по критерию площадь язв составила 12,38, что превышает эффективность фамотидина в 2,41 раза. Для сапропелевого гумата произведен расчет ЕД50 методом проб ит-анализа, установлено, что $ED_{50} = 2,6 \pm 0,17$ мг/кг.

Таким образом, впервые доказано, что сапропелевый гумат (в дозе 5 мг/кг, перорально) обладает высокой противоязвенной активностью при НПВС-гастропатии, превосходящей фамотидин в 2,4 раза, в связи с чем предложено использовать сапропелевый гумат для разработки противоязвенного средства, применяемого с целью профилактики НПВС-гастропатии и стрессо-генных язв. Предполагаемая лекарственная форма - твердая дозированная для приема внутрь.

9. ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

СОЛЕЙ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

Исследования проведены с использованием 3-х тест-систем клеточного уровня: культуры одноклеточных организмов (*Paramecium caudatum* - инфузория-туфелька) и суспензии мембран эритроцитов белых аутбредных крыс (модели кислотного и гипоосмотического гемолиза).

Скрининг биологической активности солей гуминовых кислот проведен на тест-системе культуры инфузорий *Paramecium caudatum* (лабораторный штамм, полученный от кафедры физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО ВГУ). В каждой серии опытов эксперименты проводили параллельно в контрольных пробах (культура инфузорий с добавлением дистил-

лированной воды в эквивалентных изучаемым веществам объемах) и опытных пробах, которые содержали в культуральной среде исследуемый раствор солей гуминовых кислот (лигногумат, сапропелевый гумат или гумат лео-нардита) различных концентраций. Оценку влияния на жизнедеятельность клеток проводили при помощи светового микроскопа (Биомед-1, Россия), оценивали двигательную активность инфузорий, плотность инокулята, продолжительность жизни инфузорий определяли по остановке всех видов двигательной активности, время засекали при помощи секундомера.

На первом этапе для выявления биоцидного действия лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита осуществляли серию последовательных разведений исходных 10% растворов- 1:100; 1:1000; 1:10000 и 1:100000, т.е. 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001% растворы, что соответствует дозам 1000; 100; 10 и 1 мг/кг. Пробирки с контрольной и опытными пробами термостатировали в течение 24 ч при температуре 25°C. Исходная плотность инокулята в контрольной пробе $58,67 \pm 6,96$ шт./0,1 мл культуральной среды, при наблюдении в течение 3 мин. инфузории совершали равномерно-разнонаправленные движения, что соответствует параметрам нормальной жизнедеятельности данного биологического вида. Установлено, что лигногумат вызывает гибель инфузорий в концентрациях 0,1% и 0,01%, в более низких концентрациях не проявляет биоцидного действия или изменения их двигательной активности (Табл. 18). Гумат леонардита оказывает биоцидное действие только в концентрации 0,1%, сапропелевый гумат в этой же концентрации вызывает гибель 50% инфузорий. Таким образом, БС,« лигногумата и гумата леонардита, БС50 сапропелевого гумата соответствуют дозам 1000 мг/кг, МПК лигногумата соответствует дозе 10 мг/кг, для гумата леонардита и сапропелевого гумата - около 100 мг/кг. Указанные результаты в целом согласуются с данными токсикологических исследований, свидетельствующими, что БО50 изучаемых растворов солей гуминовых кислот находится в интервале от 500 до 1500 мг/кг. В связи с тем, что лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат вызывают гибель инфузорий только в разведениях до 1:1000, их биоцидное действие расценивается как слабое.

Таблица 18

Оценка биоцидного действия лигногумата, гумата леонардита и сапропелевого гумата

Проба Оценка биоцидного действия в концентрациях. %

0,1 0,01 0,001 0,0001

Лигногумат IX ню 1X50 МПК ИН

Гумат леонардита ГС юо МПК ИН ИН

Сапропелевый гумат 1Xзо МПК ИН ИН

Примечание: МПК - максимальная переносимая концентрация, оказывающая индифферентное воздействие (ИН), т.е. инфузории совершают равномерно-разнонаправленные движения; IXто - концентрация, оказывающая абсолютное биоцидное действие, т.е. все инфузории в пробе погибли; 1X50 - концентрация, вызывающая гибель около 50% инфузорий в пробе.

На втором этапе изучали влияние лигногумата, сапропелевого гумата и гумата леонардита на жизнедеятельность инфузорий при повреждающем воздействии гипертоническим раствором натрия хлорида. Повреждающее

воздействие моделировали путем внесения в 1 мл культуральной среды 0,4 мл раствора натрия хлорида 20%, вызывающего гибель инфузорий контрольной пробы в течение 3-х мин. Повреждающая концентрация и объем раствора натрия хлорида были предварительно подобраны экспериментальным путем. Лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат вносили в опытные пробы в различных концентрациях, для чего осуществляли серию последовательных разведений исходных 0,1% растворов - 1:100; 1:1000; 1:10000 и 1:100000, т.е. 0,001; 0,0001; 0,00001 и 0,000001% растворы, что соответствует дозам 10 мг/кг, 1 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,01 мг/кг. Начальная концентрация растворов 0,1% выбрана на основании результатов предыдущего этапа исследований, т.е. уменьшена для получения максимальной переносимой концентрации. Пробирки с контрольной и опытными пробами термостатировали 24 ч при 25°C. Критерий оценки - продолжительность жизни инфузорий (сек.), эффективность оценивали как разницу с контролем в процентах. Установлено, что лигногумат не увеличивал продолжительность жизни инфузорий при повреждающем воздействии гипертоническим раствором натрия хлорида (Табл. 19). Сапропелевый гумат повышал продолжительность жизни инфузорий только в 0,001% концентрации на 11,1%. Гумат леонардита обеспечил достоверное повышение устойчивости инфузорий к повреждающему воздействию: в концентрациях 0,001% и 0,0001% - на 31,9% ($P < 0,001$) и 21,0%.

Таблица 19

Продолжительность жизни инфузорий при повреждающем воздействии под влиянием растворов солей гуминовых кислот_

Концентрация растворов, % Продолжительность жизни инфузорий, сек.

Контрольная проба Лигногумат Сапропелевый гумат Гумат леонардита

130,3±3,93 - - -

0,001 - 107,5±15,2 144,7±7,9 171,9±5,2***

разница с контролем, % - -17,5 + 11,1 +31,9

0,0001 - 112,0±15,9 120,0±6,0 157,6±9,3*

разница с контролем, % - -14,1 -7,9 +21,0

0,00001 - 120,0±6,3 118,0±4,7 137,8±5,9

разница с контролем, % - -7,9 -9,5 +5,7

0,000001 - 126,2±10,3 119,0±5,4 131,2±6,2

разница с контролем, % - -3,1 -8,7 +0,7

Примечание: * - $P < 0,05$; *** - $P < 0,001$ - достоверность различий при сравнении между показателями в опытных и контрольной пробах.

Таким образом, лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат оказывают слабое биоцидное действие (в Сьюне менее 0,1%, что соответствует дозе 1000 мг/кг), при этом гумат леонардита обеспечивает значительное повышение устойчивости клеток к повреждающему воздействию, наиболее выраженное в концентрации, меньшей, чем биоцидная в 100 раз, что соответствует дозе 10 мг/кг. На основании полученных данных для следующего этапа исследований по оценке мембранопротекторной активности (тест-система — мембраны эритроцитов) выбраны только гумат леонардита и сапропелевый гумат.

Изучение мембранопротекторных свойств солей гуминовых кислот на тест-системе мембран эритроцитов проведено при помощи модифицированного метода регистрации химических (кислотных) эритрограмм по Тер-скову И.А., Гительзону И.И. (1957), основанного на фотометрической регистрации процесса гемолиза во времени. Эритроциты получали из крови белых аутбредных крыс самцов, 30 голов массой тела 210,0±9,5 г. Забор крови осуществляли методом резекции дистальной части хвоста. Измерение величин светорассеяния проводили на спектрофотометре (модель ПЭ-5400 ВИ, производства «Группа компаний Экрос», Россия) при светофильтре (№5) с максимумом пропускания в области 490 нм. Индуцирование кислотного гемолиза осуществляли путем добавления в рабочую кювету к 5 мл суспензии эритроцитов (в изотоническом 0,9% растворе NaCl) 100 мкл 0,1 Н раствора соляной кислоты. Показатели регистрировали через каждые 15 сек. в течение 735 сек. Индуцирование гипотонического гемолиза проводили путем создания в рабочей кювете с суспензией эритроцитов раствора, содержащего 0,55% NaCl , который получали методом половинного разведения исходного объема клеток (0,9% NaCl , $\text{O} = 0,8$) при $\lambda = 490$ нм гипотоническим раствором хлорида натрия (0,2% раствор). В соответствии с методикой рассчитывали константу максимальной скорости гемолиза ($K_{\text{тах}}$, отн. ед.) - параметр, характеризующий долю эритроцитов одновременно вступивших в стадию гемолиза; относительное количество гемолизированных клеток (Oп , %) в различные моменты времени наблюдения; относительное количество сфероцитоза (Oс? , %) — показатель, отражающий количество эритроцитов (в основном низкостойкой популяции), вовлекаемых в начальную стадию процесса гемолиза - стадию сфероцитоза. Определяли максимальное количество гемолизированных эритроцитов в процентах ($\text{O}_{\text{тах}}$, %); время латентного периода гемолиза (^a! , сек) - период времени от момента добавления в пробу гемолитического агента до начала регистрации фазы собственно гемолиза. Эксперименты для каждой дозы проведены в 3-х сериях опытов, в каждой серии исследования проводили в параллельных пробах, одна из которых являлась контрольной (эритроциты + гемолитик), вторая опытной (эритроциты + раствор изучаемого вещества + гемолитик).

На первом этапе проводили предварительную оценку влияния растворов солей гуминовых кислот на проницаемость биологических мембран на модели гипотонического гемолиза, позволяющей оценить скрытые повреждения мембран; исследовали активность предполагаемой минимальной терапевтической дозы 1 мг/кг. Установлено, что эритрограмма в контрольной пробе имела типичную форму - процесс гемолиза резко нарастал в промежутке с 0 по 15 сек., достигал максимума на 60 сек. и выходил на плато на 120 сек., при этом общее количество гемолизированных клеток составляло 51,46±5,69% (Табл. 20). Под влиянием гумата леонардита наблюдается повышение $K_{\text{тах}}$ на 50,1%, что свидетельствует о повышении

проницаемости мембраны. Выявлено повышение С60 на 0,72% и О^а на 2,17%, что характеризует тенденцию к повышению количества эритроцитов, вступивших в стадию собственно ге-

молиза (Табл. 21). На фоне влияния сапропелевого гумата наоборот произошло достоверное снижение Ктах в 2 раза (на 50,1%), что характеризует значительное уменьшение скорости гипоосмотического гемолиза. Выявлено снижение вбо на 5,52% и в^а на 1,77%, что свидетельствует о тенденции к уменьшению количества эритроцитов, подвергшихся гемолизу. В связи с тем, что модель гипоосмотического гемолиза позволяет выявить влияние на скрытые повреждения мембран, указанные изменения следует интерпретировать как способность сапропелевого гумата обеспечивать уменьшение проницаемости мембраны при наличии ее незначительных повреждений.

Таблица 20

Влияние гумата леонардита и сапропелевого гумата на

показатели гипоосмотического гемолиза_

Показатель Контроль Гумат леонардита Сапропелевый гумат

Кцах 19,08±0,66 28,64±0,60*** 9,51±0,54***

разница с контролем, % - +50,1 -50,2

вбо (%) 52,52±5,81 53,24±6,14 47,00±2,68

разница с контролем, % - +0,72 -5,52

Отах12о(%) 51,46±5,69 53,63±6,55 49,69±2,15

разница с контролем, % - +2,17 -1,77

Примечание: * - P<0,05; ** - P<0,01, *** - P<0,001-достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями.

На втором этапе изучали дозозависимость мембранопротекторной активности гумата леонардита и сапропелевого гумата в дозах 1; 5; 10 и 20 мг/кг на модели кислотного гемолиза. Кинетическая кривая процесса гемолиза в контрольной пробе соответствовала параметрам нормы и характеризовалась Б-образной формой. На фоне присутствия в среде гумата леонардита кривая смещалась вправо и становилась более полой, что свидетельствует о повышении устойчивости эритроцитов среднестойкой и высокостойкой популяции к повреждающему действию, причем при повышении дозы эффект становится более выраженным (Рис. 9). На фоне воздействия сапропелевого гумата в дозе 1 мг/кг выявлено смещение кривой гемолиза влево и признаки повышения проницаемости мембраны, напротив, при повышении концентрации (дозы 5 и 10 мг/кг) — способность повышать осмотическую резистентность, однако выраженность эффекта является меньшей по сравнению с гу-матом леонардита. Гумат леонардита проявляет наибольшую активность в дозе 10 мг/кг, инкубация в течение 40 мин. не приводит к повышению эффективности, что свидетельствует о высокой скорости развития модифицирующего влияния на структурно-функциональные свойства биологических мембран. Гумат леонардита в дозе 10 мг/кг не оказывал влияния на повышал Осф на 2,17% и достоверно снижал Ктах на 82,0%, что свидетельствует о замедлении скорости гемолиза эритроцитов среднестойкой и высокостойкой субпопуляции и характеризует увеличение резистентности мембран к повреждающему воздействию. Начиная с 165 сек. выявлено достоверное снижение количества гемолизированных клеток по сравнению с контрольной пробой — на 52,85% (О27о) и на 51,08% (6375). Общее количество гемолизированных клеток (0735) являлось достоверно на 37,7% меньшим, чем в контроле (Табл. 21).

Рис. 9. Дозозависимость влияния гумата леонардита и сапропелевого гумата на динамику кислотного гемолиза

Таким образом, впервые доказано что гумат леонардита (оптимально - в дозе 10 мг/кг) обладает мембранопротекторным действием, увеличивая продолжительность жизни инфузорий при повреждающем воздействии и достоверно снижая скорость деструкции клеток в 5,5 раз при кислотном гемолизе. Способность изменять структурно-функциональные свойства биологических мембран при действии повреждающих факторов может являться одним из механизмов реализации фармакологической активности солей гуминовых кислот.

Таблица 21

Влияние сапропелевого гумата и гумата леонардита на показатели кислотного гемолиза

Показатель Контроль Сапропелевый гумат Гумат леонардита

K-max (отн. ед.) 7,П5±0,75 3,271+0,40** 1,280+0,25***

разница с контролем, % - -54,0 -82,0

t [al (сек.) 5,0±0,0 60,0±15,0*** 5,0+0,0

разница с контролем, % - + 12 раз 0

Gс,i, (%) -0,25+0,436 -3,41±1,966 -2,42+1,793

разница с контролем, % - +3,16 +2,17

G,5(%) 1,05+0,54 -1,26+1,83 -0,64+0,668

G,65(%) 1,35+0,527 -2,05+2,155 0,99+0,831

G27o(%) 59,82±16,795 21,83+6,465 6,97+0,631*

разница с контролем, % - -37,99 -52,85

G375 (%) 77,76±3,430 44,28+1,727** 26,68+1,498***

разница с контролем, % - -33,48 -51,08

G,,,735 (%) 78,51+2,879 58,45+2,616* 40,81+1,699**

разница с контролем, % - -20,06 -37,7

Примечание: * - P<0,05; ** - P<0,01, *** - P<0,001- достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями.

выводы

1. Доказано, что лигногумат, гумат леонардита и сапропелевый гумат являются умеренно токсичными (3 класс токсичности и опасности), не кумулируют, индекс широты терапевтического действия >45, не обладают органотропной токсичностью; при нанесении на кожные покровы и слизистые оболочки оказывают слабое раздражающее действие (1 класс) при концентрации растворов более 5%; не обладают эмбриотоксическим и тератогенным действием.

2. Установлено, что гумат леонардита обладает противовоспалительным и анальгетическим действием, сопоставимым по эффективности с диклофе-наком натрия, при этом является в 2,8 раза менее токсичным и не проявляет ульцерогенного действия.

3. Сапропелевый гумат (в дозе 5 мг/кг, перорально) обладает высокой противоязвенной активностью при НПВС-гастропатии, превосходящей фамотидин в 2,4 раза.

4. Выявлено, что 5% мазь гумата леонардита проявляет регенераторные и противовоспалительные свойства при термических ожогах кожи, превосходит масло облепиховое в 2 раза по скорости заживления, предотвращает развитие гнойного воспаления и обеспечивает нормализацию поведенческой активности животных.

5. Определено, что лигногумат (в дозе 1 мг/кг, внутримышечно) обладает адаптогенным действием средней степени выраженности и уступает экстракту элеутерококка, но при этом обеспечивает достоверное снижение суммарной длины стрессогенных язв не менее чем в 4,6 раза.

6. Лигногумат обладает дезинтоксикационными и гепатопротекторными свойствами при острых интоксикациях психотропными средствами, про-оксидантами и гепатотоксичными веществами, повышая выживаемость (на 30-60%), уменьшая выраженность цитолиза и холестаза и способствуя нормализации клинического состояния животных.

7. Доказано, что лигногумат достоверно снижает концентрацию глюкозы при аллоксановом диабете (на 8-й день в 4,6 раза) и диабетическую полиурию, обладает сопоставимой с глибенкламидом постпрандиальной гипогликемической активностью (в дозе 10 мг/кг - на 26,8% через 60 мин.) и отличается низким риском развития гипогликемического состояния при применении натошак.

8. Гумат леонардита (оптимально - в дозе 10 мг/кг) обладает мембранопротекторным действием, увеличивая продолжительность жизни инфузорий *P. caudata* при повреждающем воздействии (на 31,9%) и достоверно снижая скорость деструкции клеток в 5,5 раз при кислотном гемолизе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Предложено использовать сапропелевый гумат для разработки противоязвенного средства, применяемого с целью профилактики НПВС-гастропатии и стрессогенных язв. Предполагаемая лекарственная форма - твердая дозированная для приема внутрь.

2. Возможно создание лекарственного средства, содержащего лигногумат, для коррекции прандиальной гликемии при декомпенсации сахарного диабета 2 типа. Предполагаемая лекарственная форма - раствор 5% для внутримышечных инъекций.

3. Для создания лекарственного средства, обладающего противовоспалительными свойствами для симптоматической терапии посттравматических болевых синдромов, сопровождающиеся воспалением и отеком, может быть использован гумат леонардита. Предполагаемая лекарственная форма - твердая дозированная для приема внутрь.

4. Представляется возможным создание дезинтоксикационного средства, содержащего лигногумат, для комплексной фармакотерапии острых интоксикаций психотропными средствами, прооксидантами и гепатотоксичными веществами. Предполагаемая лекарственная форма - раствор 5% для внутримышечных инъекций.

5. Перспективна разработка мази, содержащей гумат леонардита, для местного лечения термических ожогов, ран, язвенных поражений кожи. Предполагаемая лекарственная форма - мазь для наружного применения 5%.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ РАБОТ

1. Патент РФ на изобретение №2232024; МКИ 7 А 61 К 33/42. Способ оптимизации терапии отравления нейролептиком азалептином в эксперименте /Ю.Н. Чернов, В.С. Бузлама, Г.А. Батищева, Ю.М. Дронова, М.А. Астанина, А.В. Бузлама, заявл. 22.09.2003; опубл. 10.07.2004, Бюл. №19.

2. Клиническая фармакология препаратов, применяемых для лечения сахарного диабета: учебно-методическое пособие / Ю.Н. Чернов, В.И. Золоедов, О.А. Мубаракшина, А.В. Бузлама, Ю.А. Дейнека, А.И. Гиндлер // под ред. Ю.Н. Чернова, В.И. Золоедова. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 2005. - 82 с.

3. Бузлама А.В. Антиульцерогенные свойства гуминовых соединений в эксперименте /А.В. Бузлама //Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармация): научно-практическая конференция, Ростов-на-Дону, 16-17 октября 2006 г.: сб.науч.тр. - Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. - С. 67-68.

4. Бузлама А.В. Изучение регенераторных свойств раствора солей гуминовых кислот леонардита на модели экспериментальной ожоговой раны /А.В. Бузлама, И.В. Фролова //Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: всероссийская научно-методическая конференция, Воронеж, 22-24 марта 2007 г.: сб.науч.тр. - Воронеж, 2007. - С. 86-88.

5. Бузлама А.В. Исследование регенераторных и противовоспалительных свойств мази, содержащей гуматы /А.В. Бузлама, И.В. Фролова //Сибирский консилиум: медико-фармацевтический журнал. - 2007. - №7 (62).-С. 166-167.

6. Клиническая фармакология препаратов, применяемых для лечения сахарного диабета и заболеваний щитовидной железы: учебно-методическое

пособие / Ю.Н. Чернов, В.И. Золоедов, О.А. Мубаракшина, Д.И. Есауленко, Ю.А. Дейнека, А.В. Бузлама / под ред. Ю.Н. Чернова, В.И. Золоедова. - Воронеж, 2006. - 176 с.

7. Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты): методические рекомендации / В.С. Бузлама, С.В. Шабунин, С.В. Бузлама, Н.П. Мещеряков, А.В. Бузлама [и др.]. -Москва-Воронеж, 2006. - 51 с.

8. Бузлама А.В. Комплексная оценка эффективности мази, содержащей гу-миновые вещества, при экспериментальных ожогах /А.В. Бузлама, И.В. Фролова /Достижения и перспективы в области создания новых лекарственных средств: Российская научно-практическая конференция, посвященная 70-летию ПФГА, Пермь, 27-28 ноября 2007 г.: сб.науч.тр. -Пермь, 2007. - С. 255-259.

9. Бузлама А.В. Оценка антиоксидантных свойств раствора лигногумата при введении полулетальных доз окисленной олеиновой кислоты лабораторным животным /А.В. Бузлама //Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: всероссийская научно-методическая конференция, Воронеж, 22-24 марта 2007 г.: сб.науч.тр. - Воронеж, 2007. - С. 83-85.

10.Бузлама А.В. Способ определения фармакологической эффективности изучаемых препаратов с использованием бальной шкалы оценки на модели иммобилизационного стресса /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, С.В. Бузлама //Системный анализ и управление в биомедицинских системах. -2007. - Т. 6, №3. - С. 718-722.

11.Бузлама А.В. Гипогликемизирующая активность раствора гуминовых веществ леонардита при проведении глюкозо-толерантного теста на здоровых животных /А.В. Бузлама //Проблемы здоровьесбережения школьников и студентов. Новые научные тенденции в медицине и фармации: Межрегиональная научно-практическая юбилейная конференция, Воронеж, 6-7 февраля 2008 г.: сб.науч.тр. - Воронеж, 2008. - С. 88-90.

12.Бузлама А.В. Состояние гуморального звена иммунитета при применении лигногумата на фоне острого асептического воспаления /А.В. Бузлама //Проблемы здоровьесбережения школьников и студентов. Новые научные тенденции в медицине и фармации: Межрегиональная научно-практическая юбилейная конференция, Воронеж, 6-7 февраля 2008 г.: сб. науч. тр. - Воронеж, 2008. - С. 94.

13.Бузлама А.В. Изучение анальгетических свойств лигногумата на модели химического перитонита, вызываемого уксусной кислотой /А.В. Бузлама, И.В. Фролова //Проблемы здоровьесбережения школьников и студентов. Новые научные тенденции в медицине и фармации: Межрегиональная научно-практическая юбилейная конференция, Воронеж, 6-7 февраля 2008 г.: сб.науч.тр. - Воронеж, 2008. - С. 91-93.

14. Бузлама А.В. Метаболический статус при экспериментальном токсическом гепатите на фоне применения растворов гуминовых веществ /А.В. Бузлама, И.В. Фролова //Человек и лекарство: VI российский национальный конгресс, Москва, 14-18 апреля 2008 г.: сб. науч. тр.-М., 2008. - С. 597.

15. Бузлама А.В. Противовоспалительные свойства гуминовых веществ сапропеля при экспериментальном экссудативном воспалении /А.В. Бузлама, И.В. Фролова, Е.А. Твердохлеб //Инновации в медицине: I международная дистанционная научная конференция, КГМУ, Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН, Общерос. общест. организация Рос. союз молодых ученых /Под ред. проф. А.И. Лазарева, проф. В.А. Лазаренко. - Курск, 2008. - С. 39-41.

16.Бузлама А.В. Антидиабетические и гипогликемические свойства раствора лигногумата при экспериментальном аллоксановом диабете /А.В. Бузлама

//Инновации в медицине: I международная дистанционная научная конференция, КГМУ, Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН, Общерос. общест. организация Рос. союз молодых ученых /Под ред. проф. А.И. Лазарева, проф. В.А. Лазаренко. - Курск, 2008. - С. 41-43.

17. Бузлама А.В. Состояние белкового обмена под влиянием гуминовых веществ сапропеля при моделировании токсического гепатита /А.В. Бузлама, И.В. Фролова //Фармация и общественное здоровье: конференция, Екатеринбург, 18-19 февраля 2008 г.: сб. науч. тр. - Екатеринбург, 2008. - С. 39-42.

18. Бузлама А.В. Экспериментальное изучение антиэкссудативных и жаропонижающих свойств гумата леонардита /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, И.В. Фролова //Системный анализ и управление в биомедицинских системах. - 2008. - Т. 7, №4. - С. 892-895.

19. Бузлама А.В. Исследование противовоспалительной активности раствора гуминовых веществ леонардита /А.В. Бузлама, И.В. Фролова, Ю.В. Ляпи-на //Naukowy potencjal swiata - 2008: materialy IV międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji, Przemysl, 12-20 wrzesnia 2008 roku. Тут 8. Medycyna. Nauk biologicznych. Weterynaria.: - Przemysl: Nauka I studia, 2008. -P. 10-11.

20. Бузлама А.В. Гастропротекторные свойства гумата леонардита в эксперименте /А.В. Бузлама, И.В. Фролова //Науки о человеке: X конгресс молодых ученых и специалистов, Томск, 28-29 мая 2009 г.: сб. науч. тр. -Томск, 2009.-С. 116-117.

21. Изучение биологически активных соединений облепихового масла и экспериментальной зависимости его противовоспалительной активности от срока хранения /О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.В. Бузлама, А.И. Сливкин, А.П. Арзамасцев //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2009. - №4. - С. 44-49.

22. Экспериментальное доклиническое исследование регенераторной активности субстанции растительных полифенолов / А.В. Бузлама, А.И. Сливкин, Ю.Н. Чернов, И.В. Фролова //Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация.-2009.-№ 1.-С. 101-106.

23. Бузлама А.В. Анализ фармакологических свойств, механизмов действия и перспектив применения гуминовых веществ в медицине /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов // Экспер. и клин, фармакол. - 2010. - Т. 73, № 9. - С. 43-48.

24. Бузлама А.В. Влияние лигногумата на гуморальные и клеточные компоненты естественной резистентности организма при экспериментальном воспалении /А.В. Бузлама //Вестник РУДН. Сер. Медицина. - 2010. - №4. - С. 179-181.

25. Бузлама А.В. Изучение влияния гумата леонардита на проницаемость мембран эритроцитов в модельных условиях /А.В. Бузлама //Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ : материалы 4-й всеросс. с междунар. участием на-уч.-метод. конф. «Фармообразование-2010», 20-22 апр. 2010 г., Воронеж. -Воронеж, 2010. - Ч. 2 : Научные основы создания новых лекарственных средств. - С. 86-89.

26. Бузлама А.В. Изучение гипогликемических и антидиабетических свойств гуматов различного происхождения в эксперименте /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин //Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. - Воронеж, 2010. -№ 1.-С. 140-145.

27. Бузлама А.В. Изучение проницаемости мембран эритроцитов под влиянием сапропелевого гумата /А.В. Бузлама, В.А. Старое //Здоровье и образование в XXI веке. Научные и прикладные аспекты концепции здоровья и здорового образа жизни: XI международный конгресс, РУДН, Москва, 8-12 декабря 2010 г.: сб. науч. тр. - М., 2010. - С. 262-263.

28. Бузлама А.В. Изучение противовоспалительной и анальгетической активности солей гуминовых кислот леонардита /А.В. Бузлама //Вестник РУДН. Сер. Медицина.-2010. -№3. - С. 150-152.

29. Бузлама А.В. Изучение мембранотропной активности солей гуминовых кислот леонардита /А.В. Бузлама // Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова: тезисы всероссийской на-уч.-практич. конф. с междунар. участием «От фундаментальных исследований - к инновационным медицинским технологиям», Санкт-Петербург, 2010.-СПб, 2010.-№4.-С. 15-16.

30. Бузлама А.В. Оценка влияния сапропелевого гумата на динамику гликемической кривой по данным глюкозотолерантного теста на здоровых животных /А.В. Бузлама // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ: материалы 4-й всеросс. с междунар. участием науч.-метод. конф., 20-22 апреля 2010 г., Воронеж. - Воронеж, 2010. - Ч. 2 : Научные основы создания новых лекарственных средств. - С. 83-85.

31. Бузлама А.В. Модулирующее влияние лигногумата на интенсивность процессов перекисного окисления и активность компонентов антиоксидантной защиты организма в экспериментальных условиях /А.В. Бузлама //Фундаментальные исследования. - 2010. -№9. - С. 36-40.

32. Бузлама А.В. Экспериментальный анализ адаптогенной активности лигногумата /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин //Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. - Воронеж, 2010. -№ 2. - С. 135-139.

33. Бузлама А.В. Биологическая активность гумата леонардита в отношении одноклеточных организмов и изучение взаимодействия в модельной системе гумат леонардита - активированный уголь / А.В. Бузлама, Е.Ф. Сафонова, Я.В. Дубова //Традиции и инновации фармацевтической науки и практики: Всероссийская науч.-практич. конференция с международн. участием, 27 октября 2011 г., КГМУ, Курск: сб.науч.тр. - Курск, 2011. - С. 238-241.

34. Бузлама А.В. Оценка влияния гумата леонардита на осмотическую резистентность мембран эритроцитов /А.В. Бузлама, О.В. Горских //Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье: XIV Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием): сб.науч.тр. - Т. 14. - СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. - С. 35-36.

35. Бузлама А.В. Фармакологическое исследование противовоспалительных и анальгетических свойств лигногумата на экспериментальных моделях боли и воспаления /А.В. Бузлама, АЛ. Проскурня, Ю.Н. Чернов //Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб.науч.тр. /под ред. М.В. Гаврилина. - Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2011. - Вып. 66. - С.487—488.

36. Изучение антиоксидантных свойств солей гуминовых кислот в экспериментальных исследованиях /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, Ю.М. Дронова, М.А. Астанина //Научные ведомости БЕЛГУ, серия Медицина, Фармация. - 2011. -№22 (117). - Вып. 16. - С. 214-221.

37. Бузлама А.В. Поиск перспективных антидиабетических средств среди солей гуминовых кислот /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов //Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. -Приложение 1 /тезисы Всеросс. науч.-практич. конференции, 24-26 мая 2012 г., Санкт-Петербург «Инновационные технологии в диabetологии и гематологии». - С. 14—15.

38. Выбор лекарственной формы для реализации анальгетической активности гумата леонардита /А.В. Бузлама, С.И. Провоторова, О.В. Горских, А.И. Слив-

кин, Ю.Н. Чернов //Современная медицина и фармацевтика: анализ и перспективы развития: IV международн. науч.-практич. конференция, Москва, 25 июня 2012: сб.науч.тр. - М.: Спутник+, 2012. - С. 15-17.

39. Клиническая фармакология лекарственных средств для инфузионной терапии и вопросы комплексного лечения критических состояний. Учебное пособие /Ю.Н. Чернов [и др.] /под ред. А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернова. -Воронеж: Истоки, 2012.-176 с.

40. Патент РФ на полезную модель №114147; МПК G01B 5/26 (2006/01). Палетка для планиметрических измерений объектов в биологии и медицине / А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВГУ; заявл. 26.08.2010, опубл. 10.03.2012, Бюл. №7.

41. Бузлама А.В. Доклиническая оценка безопасности и репродуктивной токсичности солей гуминовых кислот /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин //Научные ведомости БЕЛГУ, серия Медицина, Фармация. -2013. -№25(168). - Вып. 24. - С. 192-197.

42. Бузлама А.В. Доклиническая оценка острой токсичности и антиульцero-генной активности солей гуминовых кислот растительного лигнина /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов //Проблемы разработки новых лекарственных средств: Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых, 3-5 июня 2013 г.: сб.науч.тр. - М: ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, 2013. - С. 17.

43. Бузлама А.В. Изучение гастропротекторных свойств раствора солей гуминовых кислот, получаемых из растительного лигнина в экспериментальных исследованиях /А.В. Бузлама //Фундаментальная наука и клиническая медицина

— человек и его здоровье: тезисы XVI всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием); 20 апреля 2013 г.: сб.науч.тр.-СПб.: Изд-во СПбГУ, 2013.-С. 71-72.

44. Бузлама А.В. Элементы дозозависимости противовоспалительной активности сапропелевого гумата в эксперименте /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов //Пути и формы совершенствования фармацевтического

образования. Создание новых физиологически активных веществ : материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2013» 16-18 апреля 2013 г.: сб.науч.тр. - Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2013.- С. 201-204.

45.Гепатиты в клинической практике и их фармакологическая коррекция / Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов, Г.А. Батищева, А.В. Бузлама //Системный анализ и управление в биомедицинских системах. - 2013. - Т. 12, №2. - С. 537-547.

46.Патент РФ на изобретение №2481111, МПК А61К 35/02, А61Р 1/04. Способ профилактики язвообразования на слизистой оболочке желудка / А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВГУ, заявл. 07.11.2011, опубл. 10.05.2013, Бюл. №13.

47.Бузлама А.В. Гастропротекторная активность солей гуминовых кислот /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов // XXI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», Москва, 7-14 апреля 2014 г.: сб.науч.тр. - М., 2014. -С. 214.

48.Лекарственно-индуцированные поражения печени и вопросы их фармакологической коррекции /М.Н. Сомова, Е.Н. Музалевская, В.А. Николаевский, А.В. Бузлама, Г.А. Батищева, Ю.Н. Чернов // Экспер. и клин, фар-макол. - 2013. - Т. 76, №9. - С. 38^3.

49.Экспериментальная фармакология — принципы, модели, анализ. Монография. /А.В. Бузлама, В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин.

- Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2013. - 363 с.

50.Бузлама А.В. Параметры острой токсичности солей гуминовых кислот /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, А.И. Сливкин //Вестник Воронежского го-

сударственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. -2014.-№1. —С. 111-115.

51.НПВС-гастропатия: проблема и возможные пути решения / В.А. Николаевский, Ю.Н. Чернов, Д.Б. Холодов, А.В. Бузлама //Системный анализ и управление в биомедицинских системах. — 2014. - Т. 13, №2. - С. 290-299.

52. Патент РФ на изобретение №2506649, МПК G09B 23/28; А61В5/11. Способ выявления психотропной активности лекарственных и нелекарственных веществ / Ю.Н. Чернов, А.В. Бузлама, Г.А. Батищева, М.В. Васин, В.А. Николаевский, А.И. Сливкин, Е.Н. Музалевская; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВГУ, заявл. 28.08.2012, огтубл. 10.02.2014, Бюл. №4.

53.Решение о выдаче патента РФ на изобретение от 11.12.2014 по заявке №2013133363. Способ профилактики повреждения биологических мембран / А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, В.А. Николаевский, А.И. Сливкин, Г.А. Батищева; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВГУ, заявл. 17.07.2013, опубл. 27.01.2015, Бюл. №3.

54.Решение о выдаче патента РФ на изобретение от 24.09.2014 по заявке №2013133380. Мембранопротекторное средство /А.В. Бузлама, Ю.Н. Чернов, В.А. Николаевский, А.И. Сливкин, Г.А. Батищева; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВГУ заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВГУ, заявл. 17.07.2013, опубл. 27.01.2015, Бюл. №3.

БЛАГОДАРНОСТИ Автор выражает благодарность научному консультанту д.м.н., профессору Чернову Ю.Н. за всестороннюю поддержку, оригинальные идеи, ценнейшие советы и помощь в работе над диссертационным исследованием и обсуждении результатов; д.б.н., проф. Рецкому М.И., к.фарм.н., доц. Сафоновой Е.Ф., к.б.н. Водолазскому Ю.В., к.б.н. Жаркому Б.Л., к.м.н. Дроновой Ю.М., к.м.н. Мубаракшиной О.А. и другим сотрудникам организаций, в которых проводились исследования — за помощь и совместный труд при проведении экспериментальной части работы; заведующему кафедрой фармакологии ФГБОУ ВПО ВГУ д.м.н., профессору Николаевскому В.А. - за понимание и неоценимую помощь при проведении экспериментов и обсуждении результатов; отдельную признательность за поддержку и помощь заведующей кафедрой клинической фармакологии ГБОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко д.м.н., профессору Батищевой Г.А; особую благодарность - декану фармацевтического факультета ФГБОУ ВПО ВГУ д.фарм.н., профессору Сливкину А.И. - за поддержку и организационную помощь.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

II УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ - аланинаминотрансфераза АСТ — аспартатаминотрансфераза ГГТ - гамма-глутамилтранспептидаза ГТТ - глюкозо-толерантный тест ЕД50 — доза, вызывающая эффект у 50%

МПД — максимальная переносимая доза СОЭ — скорость оседания эритроцитов ТИ - терапевтический индекс ТХМ - тетрахлорметан, син. четыреххло-

ристый углерод ЧДД - частота дыхательных движений в

животных ЖКТ - желудочно-кишечный тракт ЛД50 - доза, вызывающая гибель 50%

минуту

ЧСС - частота сердечных сокращений,

подопытных животных НПВС - нестероидные противовоспали-

тельные средства

ударов в минуту ЩФ — щелочная фосфатаза ЭКГ - электрокардиограмма