

УДК 616.33-085

Т.А. Замощина^{1,2}, Л.А. Никифоров², Е.Ю. Просекина¹, Т.А. Томова³

¹Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

²Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск)

³Институт культуры Томского государственного педагогического университета
(г. Томск)

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ РЯСКИ МАЛОЙ (*Lemna minor* L.) В ОТНОШЕНИИ ПРОЦЕССА ВОСПАЛЕНИЯ

Проведено изучение биологической активности спиртовых извлечений из ряски малой в отношении экспериментального воспаления разного генеза и локализации на самцах мышей и крыс массой 20–23 и 200–250 г соответственно. Показано, что в дозе 100 и 200 мг/кг экстракт ряски при пероральном введении в организм мышей в течение 5 дней оказывал противовоспалительное действие на моделях каррагининового и стрессорного воспаления. Однако на модели пептических десруктивных повреждений стенки желудка крыс экстракт ряски оказался не только неэффективным, но даже увеличивал количество пептических язв. При этом препарат, не изменяя кислотность желудочного сока, значительно повышал его протеолитическую активность.

Ключевые слова: ряска; биологическая активность; воспаление; желудок.

Введение

Из народной медицины известно, что некоторые представители рода ряска (*Lemna* L., семейство рясковых Lemnaceae S.F. Gray) являются лекарственными растениями. Настои из травы ряски издавна использовались в качестве жаропонижающего, мочегонного, желчегонного, противоглистного и антимикробного средства [1]. Особый интерес представляет ряска малая (*Lemna minor* L.). Этот вид достаточно широко распространен в Западной Сибири, в том числе и в Томской области, а сведения о лекарственных свойствах этого растения встречаются в литературе наиболее часто [2, 3].

Кроме того, изучен химический и минеральный состав этого растения в сравнении с другим распространенным в нашем регионе видом рясковой трехдольной (*L. trisulca*) [4]. Установлено, что в растениях рода ряска присутствуют в разных количествах флавоноиды, полисахариды, аминокислоты, алифатические кислоты, фенилкарбоновые кислоты, антоцианы, тритерпеновые соединения [5]. Ряска малая отличается значительно большим содержанием железа, цинка, меди, марганца, магния, кобальта, кремния и йода, чем ряска тройчатая [4].

Результаты изучения химического и минерального состава растений рода ряска позволяют предполагать широкий спектр биологической активности суммарных извлечений из лекарственного сырья. Однако в ранее проведенных исследованиях изучена только противогрибковая активность водных и

спиртовых экстрактов в отношении дерматофитов и показаны сорбционные свойства измельченного сырья, сравнимые с активированным углем [6]. Цель настоящего исследования – изучение биологической активности спиртовых извлечений из ряски малой в отношении воспаления разного генеза.

Материалы и методики исследования

Исследование проведено в зимний период в одинаковом диапазоне температур на самцах мышей и крыс массой 20–23 и 200–250 г соответственно. Высушенный спиртовой экстракт ряски малой на физиологическом растворе вводили перорально с помощью зонда в течение 5 дней до эксперимента однократно в сутки в дозе 100 или 200 мг/кг в утренние часы. В контрольных экспериментах вводили в эквивалентных количествах физиологический раствор (0,2 мл на 100 г массы тела). Сухой экстракт ряски малой представляет собой твердую хрупкую массу темно-коричневого цвета, полученную путем экстракции из травы ряски 40%-ным раствором этанола (методом реперколяции) и дальнейшего высушивания полученного экстракта до сухого состояния.

Изучение влияния экстракта ряски на процесс воспаления изучали на мышцах и крысах на моделях каррагенинового экссудативного отека, острых стрессорных и пептических повреждений стенки желудка (в виде язв).

Острый экссудативный отек вызывали с помощью флогогена каррагенина, который вводили субплантарно в одну из лапок животного (0,05 мл 1%-ного раствора) через 1 ч после последнего введения экстракта ряски [7]. Величину отека определяли через 3,5 ч после введения флогогена по разности масс воспаленной и здоровой конечностей животного, которые определяли после его декапитации под эфирным наркозом. Противовоспалительный эффект, оцениваемый по уменьшению отека, выражали в процентах к контролю. Об интенсивности воспаления судили по процентным показателям прироста и угнетения отека, которые рассчитывали по формулам: 1) % прироста отека = $\{ \text{масса больной конечности} - \text{масса здоровой конечности} / \text{масса здоровой конечности} \} \times 100\%$; 2) % угнетения отека = $[\% \text{ прироста массы конечности (контроль)} - \% \text{ прироста массы конечности (опыт)}] / \% \text{ прироста массы конечности (контроль)} \times 100\%$ [7]. В качестве препарата сравнения использовали официальное нестероидное противовоспалительное средство с выраженным противовоспалительным эффектом – индометацин в дозе 50 мг/кг внутрь.

Деструктивные повреждения стенки желудка мышей стрессорного характера вызывали длительной иммобилизацией животных по методу Ю.И. Добрякова [8]. Иммобилизация мышей осуществлялась на протяжении 18 ч после последнего введения экстракта в дозах 100 или 200 мг/кг, затем проводилась декапитация животных под эфирным наркозом. Желудки извлекали, вскрывали по малой кривизне, промывали холодным физиологическим раствором и макроскопически с помощью лупы при ярком освещении определяли число и площадь деструкций, которые дифференцировали на точечные (менее 1 мм), крупные (более 1 мм) и полосовидные. Подсчитывали среднее количество изъязвлений на одно животное в группе, процент животных с язвами. Индекс Паулса (ИП) определяли как инте-

гральный показатель количества деструкций по формуле: ИП = (среднее количество язв × % животных с язвами)/100%. Противоязвенную активность (ПА) препаратов определяли как отношение индекса Паулса в контрольной группе к индексу Паулса в опытной группе. Исследуемое средство считали активным, если ПА составляло 2 и более единиц [8].

Острые деструктивные повреждения в стенке желудка в виде пептических язв моделировали по методу Н. Shay [9]. В эксперименте были использованы крысы. Моделирование острой пептической язвы проводили в утренние часы после 18 ч голодания при свободном доступе к воде и через 24 ч после последнего введения экстракта ряски в дозе 200 мг/кг. Под эфирным наркозом осуществляли полную перевязку лигатурой пилорического отдела желудка на 18 ч до момента декапитации. После этого извлекали желудок и оценивали состояние его стенки по количеству деструктивных поражений и индексу Паулса, а содержимое желудка подвергали биохимическому анализу, определяли кислотность и протеолитическую активность желудочного сока.

Протеолитическую активность желудочного сока крыс определяли по методу Ансона и Мирского в модификации А.М. Уголева [10]. Принцип метода основан на спектрофотометрическом определении выделившихся в ходе исследования аминокислот тирозина и триптофана, которые при взаимодействии с реактивом Фолина–Чокалтеу окрашивают пробы в синий цвет различной интенсивности. Исследуемый желудочный сок доводили до стандартных условий рН (1,4–2,4) соляно-кислым буфером. Эта величина рН создает оптимальные условия для проявления протеолитической активности пепсинов. Желудочный сок разбавляли буфером в 50 раз. В качестве субстрата для протеолитических ферментов использовали бычий сывороточный лиофилизированный белок альбумин.

К разведенному желудочному соку добавляли раствор альбумина и для лучшего протекания реакции пробирки ставили в баню в штативе при 37–38°C. Через 30 мин процесс переваривания останавливали 0,3N трихлоруксусной кислотой. Белок, который не подвергался гидролизу, выпадал в осадок. Затем к надсадку добавляли 0,5N NaOH, способствующей проявлению интенсивности окраски. К полученным пробам приливали фенольный реактив Фолина–Чокалтеу. Их оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-46 «Ломо» в красной области светового спектра при длине волны 620 нм. Активность пепсинов определяли по калибровочному коэффициенту с учетом разведения проб желудочного сока. Калибровочный коэффициент представляет собой среднюю величину отношения концентрации тирозина в мкмоль/мл к соответствующей оптической плотности.

Активность протеолитических ферментов выражали в мкмоль/мл желудочного сока крыс. Пересчет производился по формуле $C = E \times 600 \times k$, где C – количество тирозина, характеризующее протеолитическую активность пепсинов желудочного сока; E – экстинция пробы на данной длине волны; k – коэффициент калибровки; 600 – стандартный коэффициент пересчета для желудочного сока. Для определения калибровочного коэффициента использовали различные разведения исходного раствора кристаллического тирозина в 0,1N HCl [10].

Кислотность желудочного сока оценивалась способом П.А. Канищева и Л.Г. Коваленко по активности ионов водорода, определяемой с помощью рН желудочного сока, с последующим вычислением по таблице антилогарифмов и выражалась в мкмоль/мл [11].

Статистическая обработка полученных результатов выполнена в программе StatSoft Statistica 6.0. Рассчитывали среднее арифметическое значение показателя (M), стандартную ошибку среднего арифметического (m). Статистическую значимость различий между сравниваемыми выборками показателей проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни с уровнем значимости $p \leq 0,05$ [12].

Результаты исследования и обсуждение

Воспаление является универсальной патологической реакцией ткани на местное повреждающее воздействие любого происхождения. Оно протекает стереотипно в три фазы, запускается и поддерживается медиаторами воспаления, которые освобождаются из тучных клеток при повреждении. Тучные клетки наиболее плотно располагаются в соединительной ткани [13]. Подкожная соединительная ткань грызунов имеет самую высокую плотность тучных клеток на единицу поверхности [14], поэтому подкожное введение провоспалительных агентов, например каррагенина, сопровождается выраженным отеком [7].

Каррагенин представляет собой полисахарид, выделенный из ирландского морского мха. Это соединение является одним из самых мощных флогогенов и используется для моделирования экссудативного воспаления в эксперименте [7, 14]. Интенсивность каррагенинового отека коррелирует с возрастанием тучноклеточных медиаторов воспаления – гистамина, серотонина, брадикинина, простагландинов, а также резким повышением активности провоспалительных ферментов – кислой фосфатазы, циклоксигеназы, липоксигеназы [7, 13].

У контрольных и опытных животных отек лапки интенсивно развивался в течение 3–4 ч после субплантарного введения флогогена (в подошвенный апоневроз), достигая к этому времени максимального пика экссудации. У контрольных животных поврежденная лапка с каррагенином увеличивалась на 60% в сравнении с интактной лапкой (табл. 1), что достоверно выше (в 3 раза, $p < 0,05$), чем у животных, получавших инъекцию физиологического раствора вместо каррагенина. Введение экстракта ряски опытным мышам в течение 5 дней существенно (в 1,5 раза) уменьшало величину каррагенинового отека в сравнении с контрольными исследованиями ($p < 0,05$), о чем свидетельствуют показатели прироста и угнетения отека (табл. 1). Следует подчеркнуть, что противоотечное действие препарата сравнения индометацина было более выраженным, чем у экстракта ряски, и достоверно не отличалось от контрольных животных, получавших физиологический раствор. Однако достоверных отличий между приростом и угнетением отека под влиянием экстракта ряски и индометацина не было обнаружено. Полученные результаты указывают на то, что на модели каррагенинового отека у экстракта ряски проявились противовоспалительные свойства.

Т а б л и ц а 1

Влияние экстракта ряски на каррагениновое воспаление

Экспериментальные серии	Масса здоровой конечности ($M \pm m$), г	Масса конечности с воспалением, ($M \pm m$), г	% прироста отека	% угнетения отека
Физиологический раствор внутрь + каррагенин под кожу, $n = 8$	$0,17 \pm 0,023$	$0,25 \pm 0,031$	$50,9 \pm 12,1$	–
Физиологический раствор под кожу, $n = 7$	$0,16 \pm 0,014$	$0,18 \pm 0,024$	$16,0 \pm 7,6^*$	–
Экстракт ряски внутрь 200 мг\кг + каррагенин под кожу, $n = 8$	$0,15 \pm 0,017$	$0,20 \pm 0,023$	$28,9 \pm 3,0^{**}$	$43,3 \pm 5,8^{**}$
Индометацин внутрь 50 мг/кг + каррагенин под кожу, $n = 7$	$0,15 \pm 0,018$	$0,18 \pm 0,023$	$20,7 \pm 6,6^{***}$	$59,3 \pm 13,1^{***}$

Примечание. M – среднее арифметическое значение; m – стандартная ошибка среднего арифметического; n – количество животных; * $p_{2-1} \leq 0,05$ при $U = 0$; ** $p_{3-1} \leq 0,05$ при $U = 0$; *** $p_{1-4} \leq 0,05$ при $U = 0$.

Иммобилизационный стресс, создаваемый по методу Ю.И. Добрякова [8], нередко используется для оценки адаптогенных возможностей новых биологически активных соединений, а также для создания острого нейрогенного эрозивного или язвенного воспаления слизистой или стенки желудка. Механизмы этих повреждений полностью определяются стрессорными нейрогуморальными факторами [15, 16]. Исследовали спиртовой экстракт ряски, который вводили мышам в дозах 100 и 200 мг/кг. Согласно полученным данным экстракт ряски дозозависимо уменьшал в стенке желудка количество изъязвлений ($p < 0,05$; табл. 2), что отразилось на индексе Паулса. Если в контроле последний составлял 5,8 балла, то в опытах с экстрактом ряски он был в 2 раза меньше. Следовательно, экстракт ряски продемонстрировал способность ослаблять нейрогенные деструктивные повреждения в стенке желудка в условиях иммобилизационного стресса.

Острые деструктивные повреждения в стенке желудка моделировали также по методу Shay [9] на крысах. В отличие от предыдущей серии такая модель воспалительных язвенных поражений сочетает в своем генезе нейрострофический процесс и пептический фактор [15] и является более жесткой моделью язвенного воспаления. В контрольных исследованиях было обнаружено по 2–3 язвы у каждого животного, причем в основном полосовидные и точечные, размером менее 1 мм. У крыс, получавших 5 дней подряд экстракт ряски, количество точечных язв было увеличено в 2 раза ($p < 0,05$) и индекс Паулса – также в 2 раза (табл. 3). Таким образом, экстракт ряски не способен подавлять деструктивный воспалительный процесс в стенке желудка, связанный с острым пептическим повреждением.

В условиях острой пептической язвы определяли кислотность желудочного сока по концентрации свободных ионов водорода. Согласно результатам, представленным в табл. 4, экстракт ряски существенно не изменял кислотность желудочного сока крыс в указанных условиях.

Т а б л и ц а 2

**Влияние экстракта ряски на деструктивные повреждения в стенке желудка
в условиях иммобилизационного стресса**

Препарат	Доза, мг/кг	Количество изъязвлений ($M \pm m$)	Индекс Паулса	Противоязвенная активность
Интактная группа, n = 6		–	–	–
Физиологический раствор внутри, n = 8		5,8 ± 1,7	5,8	–
Экстракт ряски внутри, n = 9	100	2,0 ± 0,7*	2	2,88
Экстракт ряски внутри, n = 10	200	1,8 ± 1,8**	1,3	4,56

Примечание. М – среднее арифметическое значение; m – стандартная ошибка среднего арифметического; n – количество животных; * $p_{3-2} \leq 0,05$ при U=0; ** $p_{4-2} \leq 0,05$ при U=5.

Т а б л и ц а 3

**Влияние экстракта ряски на деструктивные повреждения в стенке желудка крыс
с перевязкой пилорического отдела**

Экспериментальные серии	Количество изъязвлений $M \pm m$	Индекс Паулса	Противоязвенная активность
Контроль, n = 6 (с лигатурой)	2,2 ± 0,48	1,8	
Физиологический раствор внутри + лигатура, n = 7	2,3 ± 0,66	1,9	0
Экстракт ряски 200 мг /кг внутри + лигатура, n = 7	4,5 ± 0,76*	4,5	0

Примечание. М – среднее арифметическое значение; m – стандартная ошибка среднего арифметического; n – количество животных; * $p_{3-1} \leq 0,05$ при U=2; ** $p_{3-2} \leq 0,05$ при U=1.

Т а б л и ц а 4

**Влияние экстракта ряски на протеолитическую активность и концентрацию
свободных ионов водорода в желудочном соке крыс с перевязкой пилорического
отдела желудка**

Экспериментальные серии	[aH ⁺], мкМ/мл, ($M \pm m$)	Протеолитическая актив- ность мкМ/мл, ($M \pm m$)
Контроль (с лигатурой), n = 6	0,08 ± 0,004	83,1 ± 18,56
Физиологический раствор внутри + лигатура, n = 7	0,09 ± 0,004	82,3 ± 17,46
Экстракт ряски 200 мг/кг внутри + лигатура, n = 7	0,08 ± 0,004	184,4 ± 5,79**#

Примечание. М – среднее арифметическое значение; m – стандартная ошибка среднего арифметического; n – количество животных; ** $p_{3-1} \leq 0,05$; # $p_{3-2} \leq 0,05$ при U = 2.

Однако, как свидетельствуют полученные данные, экстракт ряски увеличивал на 121% протеолитическую активность желудочного сока у крыс с перевязкой пилорического отдела, что объясняет механизм возникновения деструктивных поражений слизистой (табл. 3, 4). Таким образом, экстракт ряски в исследуемой дозе, не оказывая влияния на кислотность желудочного сока, увеличивал его протеолитическую активность.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования биологической активности экстракта ряски показали, что в дозе 100 и 200 мг/кг препарат при пероральном введении в организм мышей в течение 5 дней оказывал противовоспалительное действие на моделях каррагенинового и стрессорного воспаления. Однако на модели пептических деструктивных повреждений стенки желудка крыс экстракт ряски оказался не только неэффективным, но даже увеличивал количество пептических язв. При этом препарат, не изменяя кислотность желудочного сока, значительно повышал его протеолитическую активность.

С одной стороны, это объясняет механизм увеличения под его влиянием количества деструктивных повреждений стенки желудка в условиях перевязки пилорического отдела и накопления протеолитических ферментов в желудочном соке.

С другой стороны, полученные результаты указывают на стимуляцию препаратом главных клеток желудка, вырабатывающих пепсиноген. Возможно, экстракт ряски усиливал гастриновый контроль секреции пепсиногена [13, 14]. На основании проведенных исследований трудно сказать что-либо более определенное относительно механизма такой стимуляции. Это требует дальнейших всесторонних исследований.

Статья посвящена памяти декана фармацевтического факультета Сибирского государственного медицинского университета профессора С.Е. Дмитрука.

Литература

1. Елина Г.А. Аптека на болоте: путешествие в неизвестный мир. СПб.: Наука, 1993. 322 с.
2. Кортиков В.Н., Кортиков А.В. Лекарственные растения. М.: Рольф; Айрис-пресс, 1998. 768 с.
3. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. М.: Медицина, 1988. 464 с.
4. Никифоров Л.А., Дмитрук С.Е. Изучение биоэлементного состава *Lemna minor* и *Lemna trisulca* // Микроэлементы в медицине. 2008. Т. 9, № 12. С. 23–24.
5. Никифоров Л.А., Охотина Н.С., Дмитрук С.Е. Сравнительный анализ изучения химических и фармакологических свойств растений рода *Lemna* // VII Межрегиональная научно-практическая фармацевтическая конференция «Биологически активные соединения в профилактике заболеваний и укреплении здоровья нации». Новосибирск, 2007. С. 24–26.
6. Никифоров Л.А. Изучение противогрибковой активности, сорбционных свойств и биоэлементного состава *Lemna minor* и *Lemna trisulca* // Медицина в Кузбассе. 2009. № 7 (Спецвыпуск). С. 59–60.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В.П. Фисенко, Е.В. Арзамасцев, Э.А. Бабаян, В.М. Булаев и др. М.: Ремедиум, 2000. С. 234–242.
8. Добряков Ю.И. Скрининговый метод оценки антистрессорного действия препаратов // Стресс и адаптация. М., 1978. С. 33–36.
9. Shay H., Komarov S.A., Fells S.S. A single method for the uniform production of gastric ulceration on the rats // Gastroenterologie. 1945. Vol. 5, № 1. P. 43–61.

10. Уголев А.М. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. 216 с.
11. Канищев П.А., Коваленко Л.Г. О темпе желудочной секреции водородных ионов // Лабораторное дело. 1977. № 12. С. 707–710.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
13. Гайтон А.К., Холл Д.Э. Медицинская физиология. М.: Логосфера, 2008. 1256 с.
14. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы. Москва; Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.
15. Комаров Ф.И., Заводская И.С., Морева Е.В. Нейрогенные механизмы гастродуоденальной патологии. М.: Медицина, 1984. 239 с.
16. Кузнецов А.П. Желудочно-кишечный тракт и стресс. Курган: Изд-во Курган. гос. ун-та, 2004. 254 с.

Поступила в редакцию 25.01.2011 г.

**Tatiana A. Zamoshchina^{1,2}, Leonid A. Nikiforov², Elena Ju. Prosekina¹,
Tatiana A. Tomova³**

¹*Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia*

²*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

³*Institute of culture of Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia*

BIOLOGICAL ACTIVITY SPIRIT EXTRACTION FROM THE DUCKWEED SMALL (*Lemna minor* L.). CONCERNING INFLAMMATION PROCESS

*Results of studying of chemical and mineral structure of a duckweed small (*Lemna minor* L.), extended in the Tomsk region, allow to assume a wide spectrum of biological activity of total extraction from the given medicinal raw materials. In the present research studying of biological activity spirit extraction from a duckweed small concerning an experimental inflammation of a miscellaneous genesis is spent. Research is spent to the winter period on mice and rats males in weight 20–23 g and 200–250 g accordingly. The dried up spirit extract of a duckweed small on a physiological solution was entered an animal per os by means of a probe within 5 days before experiment unitary a day in a dose by of 100 or 200 mg/kg in the morning. In check experiments entered a physiological solution (0,2 ml on 100 g weights of a body). Influence of an extract of a duckweed on process of an experimental inflammation studied on models carragenin hypostasis, sharp stress induced and ulcerogenic damages of a wall of a stomach (bandaging of pylorus stomach on 18 h). Intensity of an inflammation judged on percentage indicators of a gain and oppression of a hypostasis of finiteness of an animal; a condition of a wall of a stomach estimated by quantity of destructive defeats and Pauls's index, and, defining acidity and proteolytic activity, estimated aggression of a contained stomach in relation to its mucous. Statistical procedures spent by means of applied package STATISTIC 6.0 with use of average value of an analyzed indicator (M), a standard error of average (m) and nonparametric criterion Mann-Whitney (U-test). Thus, in experiment biological activity spirit extraction from a duckweed small concerning inflammatory process of a miscellaneous genesis and localisations is shown. The extract had anti-inflammatory an effect on models carragenin and stress induced inflammations. However on model ulcerogenic destructive damages of a wall of a stomach the duckweed extract has appeared not only inefficient, but even increased quantity ulcers. Thus a preparation, without changing acidity of gastric juice, considerably raised it proteolytic activity.*

Key words: *Lemna minor*; biological activity; miscellaneous; stomach; rats.

Received January 25, 2011