

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ РЕПЕЙНИЧКА ВОЛОСИСТОГО

Т. А. Замощина^{1, 2}, Е. А. Краснов¹, В. И. Отмахов², Е. В. Петрова², Я. Е. Решетов¹,
Е. Ю. Просекина², Т. А. Томова³, И. С. Кускова²

В работе установлено накопление лития в надземной части репейника волосистого и выявлена специфическая для лития хронобиологическая активность водного экстракта. Хронобиологическое исследование выполнено в период зимнего солнцестояния на 40 половозрелых крысах-самцах, из которых 3 группы были контрольными (интактные, получавшие воду очищенную, получавшие экстракт, очищенный от лития) и 2 опытные. Опытным животным вводили *per os* водный экстракт репейника в утренние (8:00) или вечерние (19:00) часы суток в дозе, соответствующей дозе лития в 10 мг/кг лития оксибутирата. С 6 по 7 сут, не отменяя указанных препаратов, начинали экспериментальное тестирование ("открытое поле", ректальная температура) в 9 ч утра и далее каждые 4 ч в течение 48 ч. Статистическую обработку первичных хронограмм проводили методами дисперсионного анализа, спектрального и косинор-анализа. Количественное определение лития в надземной части репейника волосистого, его водном экстракте и мозге животных проводили методом пламенной фотометрии на спектрометре "SOLAAR серии S" производства "Thermo-electron" (США) с пламенным атомизатором с усиленной дейтериевой коррекцией фона в режиме эмиссии. Установлено, что в водном экстракте надземной части репейника содержалось до $(8,5 \pm 0,4)$ мкг/г лития, а в экстракте, очищенном от лития с помощью ионообменной хроматографии, это количество снижалось до $1,4 \pm 0,2$ мкг/г. Во всех контрольных группах животных наблюдался внешний и внутренний десинхроноз. Под влиянием водного экстракта репейника суточные динамики поведенческой активности и ректальной температуры у животных приобретали ритмический характер, становились согласованными с внешним светотемновым циклом.

Ключевые слова: литий; растения; циркадные ритмы; поведение; температура тела; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Катион лития в микроколичествах содержится во всех тканях человека, животных и многих растений, однако до настоящего времени его биологическая значимость ни в растениях, ни у животных не изучена. В то же время в медицине литий в виде органических и неорганических солей используется с 1949 г. для нормализации и стабилизации настроения [13, 15, 16]. При назначении препаратов лития в медицинской практике одной из серьезных проблем является необходимость соблюдения узкого терапевтического коридора фармакологических доз, в котором действие лития эффективно и безопасно [15, 16]. Во многих исследованиях показано, что низкие дозы органических солей лития обладают высокой биодоступностью [5, 6, 10]. Кроме того, установлено, что органические соли лития обладают меньшей токсичностью, нежели минеральные его соединения [6, 7]. Исходя из вышеизложенного, весьма рационален и перспективен поиск пре-

паратов естественного комплекса макро- и микроэлементов в виде водных или спиртовых извлечений из растительного сырья, накапливающего литий. Особый интерес представляют растения семейства розоцветных, астровых и пасленовых, некоторые представители которых являются концентраторами лития [3].

Цель настоящего исследования — изучение возможности накопления лития в надземной части репейника волосистого, относящегося к семейству розоцветных, и выявление специфической для лития хронобиологической активности полученного растительного экстракта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 40 крысах-самцах линии Вистар массой 180 – 250 г (виварий НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга ТНЦ СОРАМН, Томск). За 3 недели до эксперимента животных произвольно разделили на 5 групп по 8 особей в каждой и содержали в условиях комфортной температуры (22 °С) при естественном освещении и свободном доступе к корму и воде. В течение этого времени крысы адаптировались к зоосоциальной группе и к экспериментальным условиям. Опыты проводили в период зимнего солнцестояния (свет:темнота = 6:18 ч) при естественном освещении.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Россия, Томск, Московский тракт, 2.

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, Томск, пр. Ленина, 36.

³ Томский государственный педагогический университет, Россия, Томск, Комсомольский проспект, 75.

Хронобиологический эксперимент проводили по следующей схеме: через 3 недели общей адаптации начинали введение в желудок с помощью зонда водного экстракта надземной части репейничка волосистого опытной группе животных в утренние часы (8.00 – 8.30). Учитывая фазовую зависимость хронотропных эффектов лития [6, 9], второй опытной группе такую же дозу вводили в вечерние часы (19.00 – 19.30). Дозу вводимого водного экстракта репейничка волосистого рассчитывали по содержанию лития, которая соответствовала содержанию лития в 10 мг/кг официальной соли лития (лития оксибутирата) [6], и она составляла 7 г/кг. Способ получения водного экстракта *A. pilosa* и стандартизацию полученных экстрактов проводили в соответствии с [12]. Остальные 3 группы были контрольными. Одна из них получала экстракт репейничка, очищенного от лития с помощью ионообменной хроматографии на катионите КУ-2 в эквивалентных опытным группам количествах;

другая группа получала в эквивалентных количествах воду очищенную, на которой изготавливали экстракт, и последняя группа оставалась интактной. С 6 по 7 сут, не отменяя указанных препаратов, начинали экспериментальное тестирование (“открытое поле”, ректальная температура) в 9 ч утра и далее каждые 4 ч в течение 48 ч. Наблюдения за животными в “открытом поле” в одной пробе проводили в течение 5 мин, после чего измеряли ректальную температуру [2]. Для определения ректальной температуры, отражающей температуру ядра тела и, следовательно, интенсивность обменных процессов в организме, пользовались электротермометром заводской конструкции ТПЭМ-1, погружая его датчик в прямую кишку крысы на глубину не более 20 мм. В совокупности на тесты тратили не более 1,5 ч. По окончании последнего тестирования животных выводили из эксперимента с помощью диоксида углерода, извлекали головной мозг и

Влияние экстракта надземной части репейничка волосистого на ритмическую организацию температуры тела и двигательной активности в открытом поле крыс, содержащихся в условиях естественного освещения в период зимнего солнцестояния (СТ6:18 — свет — 6 ч, темнота — 18 ч)

Группа животных и условия эксперимента	Показатель	Параметры ритмов			
		период, ч	мезор ($M \pm m$)	амплитуда (относительные единицы)	акрофаза (ч. мин)
Интактные, $n = 8$	ДА	12	$35,7 \pm 7,2$	10,8	03.17
		23	$35,7 \pm 7,2$	3,1	07.18
		24	$35,7 \pm 7,2$	4,3	01.05
	Т	9	$36,8 \pm 0,1$	2,5 (2,3 – 2,7)	6.09 (5.45 – 6.34)
		18	$36,7 \pm 0,1$	0,5 (0,04 – 0,9)	12.05 (7.49 – 14.05)
		23	$36,9 \pm 0,1$	3,1 (2,7 – 3,5)	11.37 (11.16 – 12.02)
Вода очищенная, 8.00, $n = 8$, контроль 1	ДА	12	$27,9 \pm 5,6$	13,0	03.07
		23	$27,9 \pm 5,6$	6,7	21.16
		24	$27,9 \pm 5,6$	9,2	20.52
		25	$24,4 \pm 6,7$	8,3	20.54
	Т	16	$36,7 \pm 0,06$	0,5 (0,2 – 0,7)	14.00 (12.18 – 0.36)
		23	$36,6 \pm 0,06$	3,2 (2,7 – 3,7)	12.09 (11.48 – 12.33)
Экстракт репейничка без лития, 8.00, $n = 8$, контроль 2	ДА	12	$25,8 \pm 1,6$	2,0	06.03
		23	$25,8 \pm 1,6$	2,1	14.01
		24	$25,8 \pm 1,6$	0,7	14.34
	Т	23	$36,6 \pm 0,7$	3,4 (2,2 – 4,7)	11.38 (9.20 – 12.33)
		25	$36,1 \pm 0,3$	2,6 (2,0 – 3,3)	22.29 (17.49 – 1.19)
		25	$36,8 \pm 0,05$	2,9 (2,3 – 3,6)	22.09 (21.48 – 22.34)
Экстракт репейничка с литием, 8.00, $n = 8$	ДА	12	$28,9 \pm 5,6$	0,2 – 5,2 – 10,3	2.18 (00.17 – 05.49)
		24	$29,1 \pm 6,6$	0,9	02.24
		25	$29,1 \pm 6,6$	4,7	17.00
	Т	16	$36,5 \pm 0,1$	0,7 (0,5 – 0,9)	14.15 (12.58 – 15.22)
		23	$36,5 \pm 0,1$	3,2 (2,7 – 3,7)	11.36 (11.05 – 12.06)
		25	$36,6 \pm 0,1$	2,6 (2,0 – 3,2)	22.45 (21.36 – 23.40)
Экстракт репейничка с литием, 19.00, $n = 8$	ДА	24	$29,3 \pm 3,9$	5,9 (0,5 – 11,3)	15.8 (9.58 – 19.56)
		25	$30,5 \pm 4,5$	9,4	13.57
	Т	24	$37,4 \pm 0,07^*$	0,5 (0,3 – 0,6)	02.34 (01.54 – 05.51)
		25	$37,1 \pm 0,06^*$	2,8 (2,5 – 3,0)	19.19 (18.26 – 20.17)

ДА — двигательная активность; Т — температура тела;

* $p < 0,05$ по отношению к контролю (вода очищенная); n — количество подопытных животных; M — средняя арифметическая; m — ошибка средней арифметической.

определяли содержание в нем (без мозжечка) лития методом пламенной фотометрии.

Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами обращения с лабораторными животными, не противоречившими Женевской конвенции 1985 г. о “Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных”, Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным и приказу Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” [11].

Для количественного определения лития в надземной части репейничка волосистого, его водном экстракте и мозге животных использовали метод пламенной фотометрии. После предварительной пробоподготовки содержание лития измеряли в образцах на спектрометре “SOLAAR серии S” производства “Thermo-electron” (США) с пламенным атомизатором с усиленной дейтериевой коррекцией фона в режиме эмиссии в аккредитованном Томском региональном центре коллективного пользования Национального исследовательского Томского государственного университета (аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.22НН07).

Статистическую обработку первичных хронограмм проводили методами дисперсионного анализа, спектрального и косинор-анализа [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что в водном экстракте надземной части репейничка волосистого содержится до $(8,5 \pm 0,4)$ мкг/г лития, что в сравнении с другими растениями [3] указывает на его высокую концентрацию в растении. В сухом водном экстракте, очищенном от лития с помощью ионообменной хроматографии, количество лития снижалось до $(1,4 \pm 0,2)$ мкг/г.

Согласно дисперсионному анализу, суточные динамики (хронограммы) поведенческой активности и температуры тела 2 групп контрольных и интактных животных не отличались друг от друга. Однако хронограммы аналогичных показателей 2 опытных групп, получавших экстракт репейничка волосистого, различались как между собой, так и каждая отличалась от всех контрольных групп ($p < 0,001$).

Дальнейшие спектральный и косинор-анализы подтвердили и уточнили особенности ритмической организации каждой исследуемой группы.

Как известно, период зимнего солнцестояния в условиях Западной Сибири характеризуется самым коротким днем со слабой интенсивностью естественного освещения. В этих условиях биологические ритмы животных нередко высвобождаются из-под контроля внешнего времязадателя — светотемнового цикла — и становятся аритмичными либо свободнотекущими [1, 14]. В нашем эксперименте у интактных крыс в спектрах ритмов поведенческой активности, действительно, не определялись статистически значимые гармоника, что свидетельствует о полной аритмии (таблица). Однако в спектрах ритмов температуры тела выявлялись 3 статистически значимые

гармоники при доминировании 23 ч ритма, акрофаза которого приходилась на утренние часы. Такое расположение акрофазы температурного ритма соответствует дневному типу ритмической организации животных и нередко обнаруживается у сумеречных грызунов, к которым относятся крысы, при содержании в постоянных условиях освещения (24 ч свет или темнота) [1, 14]. Таким образом, у интактных животных в период зимнего солнцестояния наблюдался мощный внутренний и внешний десинхроноз и дневной тип активности, что соответствует литературным данным [1, 6, 14].

Во всех контрольных группах животных также наблюдали выраженный десинхроноз, по структуре аналогичный наблюдаемому у интактных крыс.

В то же время в группах животных, получавших экстракт надземной части, двигательная активность приобретала ритмический характер, о чем свидетельствует появление хорошо выраженных 12 и 24 ч составляющих в спектрах ритмов этого показателя после утреннего и вечернего назначения экстракта, соответственно. При этом температурный спектр ритмов не отличался от такового контрольной группы как по представленности ритмических компонент, так и по их выраженности. Кроме того, сохранялся внутренний десинхроноз между изучаемыми ритмами, наиболее выраженный при вечернем назначении, поскольку акрофаза 24 ч гармоник не совпадали и приходились на разное время суток. Следует отметить, что среднесуточная температура тела была выше в опытной группе, получавшей экстракт вечером, в сравнении как со своей контрольной, получавшей экстракт утром ($p < 0,05$), так и интактной группой ($p < 0,05$). Это указывает на активацию обменных процессов под влиянием экстракта, вводимого в вечерние часы. Вряд ли это связано с литием, скорее другие составляющие растительного экстракта явились тому причиной. Во всяком случае для органических и неорганических солей лития в эквивалентных дозах такие свойства не известны [6, 8].

Таким образом, наши эксперименты свидетельствуют о том, что водный экстракт надземной части репейничка волосистого, содержащий повышенные концентрации лития, обладал ритмомодулирующим действием как при утреннем, так и вечернем назначении. Этот эффект проявлялся в виде синхронизации поведенческого и температурного ритмов животных с внешним датчиком времени, что ранее было отмечено для органических и неорганических солей лития как в наших работах [6], так и в работах других авторов [15]. Вряд ли другие биологически активные соединения растения могли стать причиной ритмомодулирующей активности водного экстракта, поскольку такие свойства для них не были нами обнаружены и не известны в литературе (см. в таблице очищенный от лития экстракт).

Исследование содержания лития в мозге животных, получавших экстракт, позволило нам с большей долей вероятности полагать, что ритмомодулирующее действие экстракта репейничка связано, скорее всего, с литием. Было установлено, что, действительно, мозг животных, получавших водный экстракт репейничка, содержит больше лития ($0,76 \pm 0,063$) мкг/г, чем мозг тех крыс, которые его не получали ($0,68 \pm 0,037$) мкг/г, хотя статисти-

ческой значимости различий между группами обнаружить не удалось. Возможно, это связано с тем, что в период зимнего солнцестояния литий активно выводится из организма, в то время как в период летнего, наоборот, аккумулируется [7, 8, 10]. Выведение же животных из эксперимента проводилось нами через 2 ч после последнего тестирования, т.е. через 1 сут после последней утренней инъекции или через 12 – 14 ч после последней вечерней инъекции, т.е. к этому времени часть лития могла вывестись из организма. Кроме того, не совсем ясно с какими органическими соединениями растения литий поступает в организм. Известно, что одни анионы могут способствовать его накоплению в мозге, а другие — наоборот, выведению [6, 7, 10]. Наконец, существует суточная динамика содержания эндогенного лития в мозге, причем экзогенный литий может менять эту динамику [5 – 7, 10], поэтому определение содержания катиона лития в мозге только в одной временной точке может не отражать истинной картины.

Таким образом, в исследовании установлено накопление лития в надземной части репейничка волосистого и выявлена специфическая для лития хронобиологическая активность полученного растительного экстракта при введении последнего крысам. Под влиянием водного экстракта репейничка суточные динамики поведенческой активности и ректальной температуры у животных приобретали ритмический характер и становились согласованными с внешним светотемновым циклом.

ВЫВОДЫ

1. В водном экстракте надземной части репейничка волосистого (*Agrimonia pilosa* L.) содержится до $(8,5 \pm 0,4)$ мкг/г лития.

2. Суточная динамика поведенческой активности и ректальной температуры у крыс под влиянием водного экстракта надземной части репейничка волосистого

(7 г/кг, 7 дней, внутрь) приобретала ритмический характер и становилась согласованной с внешним светотемновым циклом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Ашофф, *Биологические ритмы*, т. 1 – 2, Мир, Москва (1984), сс. 54 – 69.
2. Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высшая школа, Москва (1991).
3. И. В. Гоголева, О. А. Громова, *Практика педиатра*, октябрь (2007).
4. В. М. Ерошенко, А. А. Сорокин, *Алгоритмы и программы. Информатизационный бюллетень ГФАП СССР*, № 70 (1980).
5. Т. А. Замощина, Л. Н. Новицкая, Е. В. Иванова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **39**(6), 3 – 5 (2005); *Pharm. Chem. J.*, **39**(6), 283 – 285 (2005).
6. Т. А. Замощина, *Бюл. Сиб. мед.*, № 5, 26 – 29 (2006).
7. Т. А. Замощина, Л. Н. Новицкая, Е. В. Иванова, *Вестник Оренбургского гос. университета. Приложение: Биоэлементология*, **62**(12), 104 – 107 (2006).
8. Т. А. Замощина, Е. В. Иванова, *Микроэлементы в медицине*, **11**(2), 32 – 33 (2010).
9. Т. А. Замощина, М. В. Мелешко, С. В. Логвинов и др., *Бюл. Сиб. мед.*, № 5, 50 – 56 (2011).
10. Л. Н. Новицкая, Т. А. Замощина, Е. В. Иванова и др., *Бюл. СО РАМН*, № 4, 103 – 107 (2002).
11. *Принципы надлежащей лабораторной практики РФ ГОСТ Р-53434-2009*, Стандартинформ, Москва (2010).
12. М. Г. Ханина, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Самара (2013).
13. M. Alda, *Mol. Psychiatry*, **20**(6), 661 – 670 (2015).
14. C. Dibner, U. Schibler, U. Albrecht, *Annu Rev Physiol.*, **72**, 517 – 549 (2010).
15. P. Geoffroy, B. Etain, S. Sportiche, et al., *Int. J. Bipolar Disord.*, № 2, 2 – 5 (2014).
16. J. K. Rybakowski, *CNS Drugs*, **27**(3), 165 – 173 (2013).

Поступила 19.03.16

CHRONOBIOLOGICAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF THE ABOVE-GROUND PART OF *AGRIMONIA PILOSA* L. IN RATS

T. A. Zamoshchina^{1,2}, E. A. Krasnov¹, V. I. Otmakhov², E. V. Petrova², Ya. E. Reshetov¹, E. Yu. Prosekina², T. A. Tomova³, and I. S. Kuskova²

¹ Siberian State Medical University, Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050 Russia;

² Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia;

³ Tomsk State Pedagogical University, Komsomolskii prosp. 75, Tomsk, 634041 Russia

It is established that lithium is accumulated in the above-ground part of agrimony (*Agrimonia pilosa* L.), the aqueous extract of which exhibits lithium-specific chronobiological activity in rats. The chronobiological study was carried out during the winter solstice on 40 adult male rats divided into three groups: control (intact animals treated with purified water and the extract purified from lithium) and two test groups. Animals in the test groups were administered the aqueous extract of *A. pilosa* in the morning (8.00 am) and evening (19.00 pm) in amount corresponding to receiving lithium hydroxybutyrate in a dose of 10 mg/kg (p.o.). From the sixth to seventh day of experiment, without canceling this treatment, pilot testing (open field test, rectal temperature measurement) was started at 9 am and continued every 4 h over a period of 48 hours. The primary chronograms were statistically processing by analysis of variance, spectral analysis, and cosinor analysis. The quantitative determination of lithium in the above-ground part of *A. pilosa* L., its extract and brain of animals was carried out by flame photometry on a SOLAAR Series S spectrometer (Thermo Scientific Co., United States) equipped with a flaming atomizer operating in increased deuterium background correction emission mode. It was found that aqueous extract of the above-ground part of *A. pilosa* L. contained up to 8.5 ± 0.4 µg/g lithium; in the extract purified by ion-exchange chromatography, this amount was reduced to 1.4 ± 0.2 µg/g. All control animals exhibited external and internal desynchronism. Under the action of herbal extract, the daily dynamics of behavioral activity and rectal temperature in animals acquired a rhythmic character and became consistent with the external day-night cycle.

Keywords: lithium; agrimony plant; herbal extract; circadian rhythms; body temperature; behavior; rats.