

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ЭКСТРАКТОВ ГРИБОВ – ЧАГИ И *GANODERMA LUCIDUM* – НА ФУНКЦИЮ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ПОВЕДЕНИЕ

Экспериментальные животные

Работа проделана на самцах крыс линии НИСАГ с наследственной стресс-чувствительной артериальной гипертонией. Эта уникальная линия животных, воспроизводящих картину гипертонической болезни человека, была получена в Институте цитологии и генетики СО РАН в результате многолетней направленной селекции по уровню артериального давления в условиях мягкого эмоционального стресса. У взрослых крыс линии НИСАГsistолическое артериальное давление в состоянии покоя повышенено до 170 мм рт. ст. Мягкий эмоциональный стресс провоцирует прогрессирование гипертензивного статуса и уровень артериального давления повышается до 200 мм рт. ст. и выше. У крыс НИСАГ с возрастом отмечается развитие всей симптоматики, свойственной больным людям с артериальной гипертонией.

Измерение артериального давления

Использовали неинвазивный метод измерения артериального давления (tail-cuff method). Экспериментальным животным на основание хвоста одевали миниатюрную манжетку. Пульсации хвостовой артерии дистальнее манжетки регистрировали с помощью высокочувствительного датчика (EMT-500, Швеция). Давление в манжетке плавно увеличивали с помощью автоматического компрессора. Момент исчезновения пульса сопоставлялся с уровнем давления в манжетке, которое в этой временной точке соответствует уровню sistолического артериального давления. Динамическую регистрацию пульсовой кривой и кривой давления в манжетке производили на полиграфе Mingograph-34 (Швеция) (рис. 1). Для исключения психологического стресса, связанного с процедурой измерения крысам давали кратковременный эфирный рауш-наркоз.

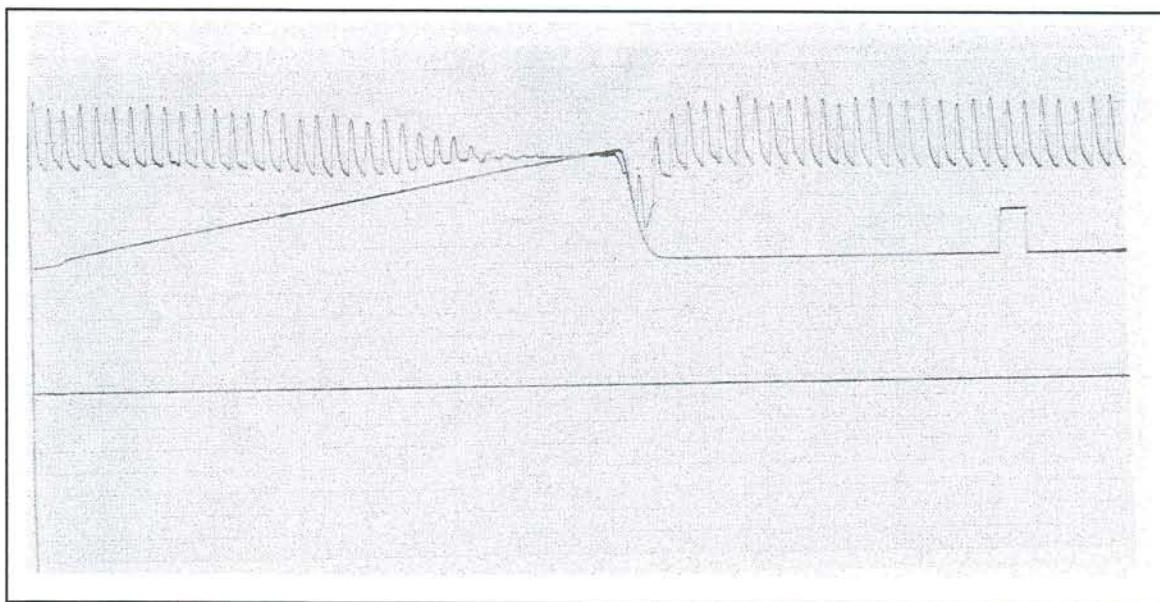


Рис. 1 Пример регистрации артериального давления методом tail-cuff.

Верхняя дорожка – кривая пульсаций хвостовой артерии крысы.

Вторая дорожка – кривая давления в манжетке.

Прямоугольный импульс справа предназначен для калибровки кривой давления в манжетке.

Видно, что по мере увеличения давления в манжетке пульсация хвостовой артерии уменьшается и, наконец, вовсе исчезает.

Момент прекращения пульсации сопоставляется с давлением в манжетке, при котором пульсация прекратилась. Это давление соответствует систолическому артериальному давлению.

В данном примере оно составляет около 200 мм рт. ст.

Электрокардиографическое исследование

Электрокардиограмму (ЭКГ) регистрировали на 3-канальном электрокардиографе Schiller (Австрия) в трех стандартных и трех усиленных от конечностей отведениях. Для этого крысу наркотизировали эфиром. Регистрацию вели в положении крысы на животе, при этом конечности были соединены с электродами кардиографа с помощью специального безигольчатого контактного устройства.

Анализ ЭКГ проводили путем измерения длительности и амплитуды зубцов P, R, S, T, комплекса QRS и длительности интервалов PQ, QRST, RR. Угол альфа (положение электрической оси сердца во фронтальной плоскости) рассчитывали по формуле:

$$\text{Угол альфа} = \arctan \frac{(2 \cdot \text{QRS}_{III} + \text{QRS}_I)}{\sqrt{3} \cdot \text{QRS}_I};$$

$$\text{Систолический показатель: СП} = (\text{QRST}/\text{RR}) \times 100;$$

Исследование поведения

A) Тест «открытого поля»

При проведении этого теста мы исходили из проделанных нами ранее методических разработок, а также из тех представлений, которые имеются в литературе. С каждой крысой проводили один 6-минутный тест. Из домашней клетки на арену аппарата «открытого поля» крысу переносили в специальном деревянном домике размером 14 x 14 x 20 см, пол которого мог свободно выдвигаться наподобие крышки пенала. Домик ставили всегда на одно и то же место аренды, ближе к одному из ее углов, после чего пол домика убирали, а сам домик быстро одним движением поднимали вверх. В результате крыса оказывалась на открытой площадке, и с этого момента начинался отсчет времени теста.

Площадка прямоугольной формы (140 x 70 см) (см. фото ниже) была сделана из фанеры, окрашенной в серый цвет и расчерченной на квадраты (10 x 10 см). 12 центральных квадратов условно считали центром площадки, в середине которого, согласно литературным рекомендациям, ставили незнакомый крысе предмет, в

нашем случае – металлический с выступающими деталями цилиндр, высотой 11 и диаметром 5 см. Площадка была освещена двумя лампами по 100 вт.

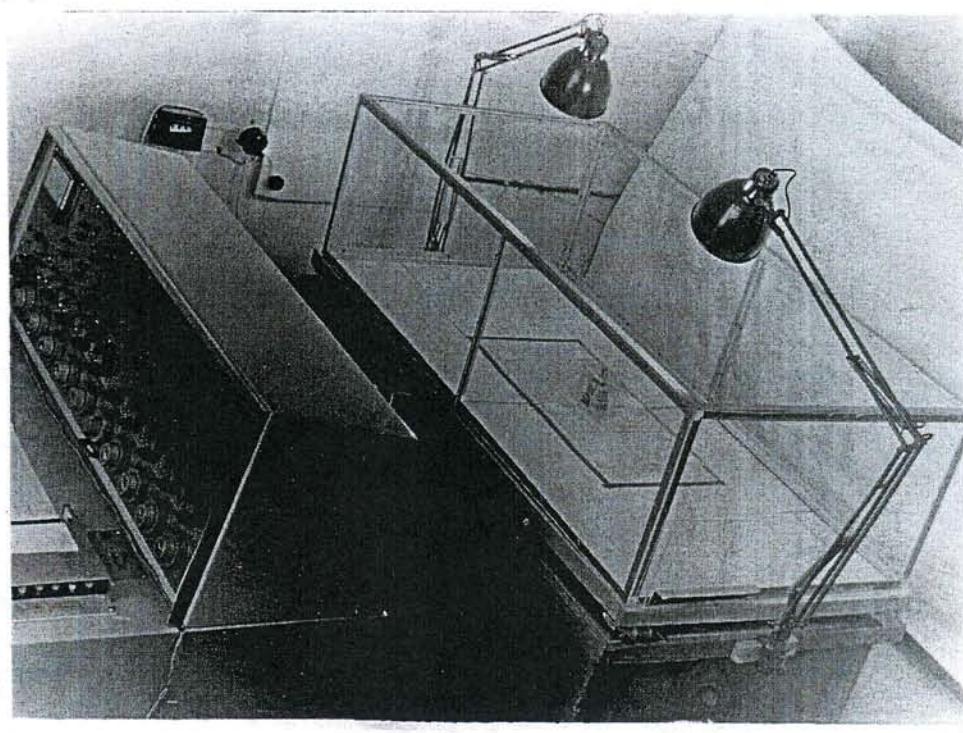


Рис. 2. Установка для проведения теста «открытое поле».

При проведении теста с помощью счетчиков импульсов, подаваемых оператором с пульта управления, регистрировали следующие характеристики поведения:

- Двигательную активность на периферии площадки отдельно за каждую минуту теста и суммарно за весь тест.
- Двигательную активность в центре площадки отдельно за каждую минуту теста и суммарно за весь тест.
- Латентный период – время от момента высадки крысы на площадку до начала локомоции.
- Время пребывания в центре площадки.
- Стойки на задних лапах (*rearing*) – количество и время.
- Поведение «умывания» (*grooming*).

Последующий анализ поведения крыс в teste «открытого поля» позволяет судить о преобладании мотивации страха или исследования в незнакомой пугающей обстановке и об уровне «эмоциональной» реактивности животных.

Б) Исследование поведения в приподнятом крестообразном лабиринте (см. Фото ниже).

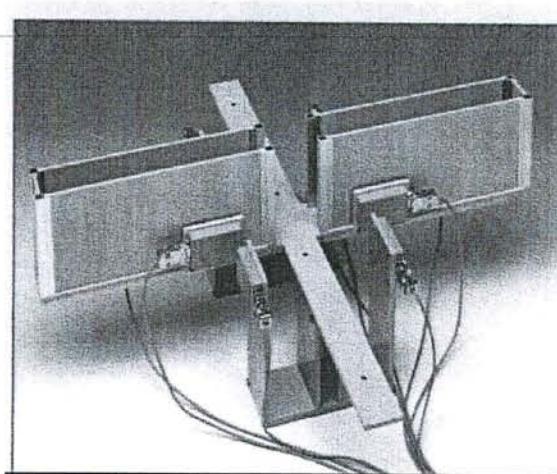


Рис. 3. Установка «приподнятый крестообразный лабиринт».

Крыса высаживается на открытый «рукав» лабиринта, ближе к его центру. Время теста – 6 мин. Основным результатом наблюдения за поведением животного является оценка времени пребывания крысы в закрытых и открытых «рукавах» лабиринта. Если крыса прячется в закрытых рукавах лабиринта, это расценивается как свидетельство состояния «тревожности», которое не позволяет крысе выходить на открытое пространство и исследовать его.

В). Неврологический статус (рефлексы)

Неврологический статус оценивали в баллах по следующим поведенческим критериям:

- Равновесие на горизонтальном шесте

Оценивали способность крысы сохранять равновесие и балансировать при помещении на горизонтально расположенный деревянный брус шириной 4 см.

- Цепляние

Крыса помещается на проволочную сетку. При попытке поднять ее за хвост крыса цепляется передними лапами за ячейки сетки. При этом можно оценить мышечную силу передних конечностей.

- Сохранение правильного положения головы

Крысы, находясь в любой позе, стараются сохранить нормальное положение головы (вестибулярные рефлексы). Удерживая крысу в руках и искусственно меняя положение ее тела, можно оценить состояние вестибулярных рефлексов.

- Передвижение спонтанное

При наблюдении за передвижением крысы на открытом пространстве оцениваются координационные рефлексы.

- Флексия передних конечностей

При опускании крысы, которую экспериментатор держит за хвост, с высоты на горизонтальную поверхность, она вытягивает (а не подгибает) передние лапы для смягчения удара от «приземления». При нарушении этого рефлекса правильная позиция передних лап изменяется.

- Глазодвигательные рефлексы

Оцениваются по движению глаз вслед за движущимися предметами.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперимент № 1

Задачей первого пилотного эксперимента была проверка наличия гипотензивного эффекта у экстрактов, полученных из грибов и некоторых лекарственных растений. Испытывали смесь высушенных водных экстрактов грибов, чаги и трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*), и растений – солянки холмовой и курильского чая, входивших в состав препарата, получившего название «Чакус». Наши предположения о наличии гипотензивного эффекта основывались на многочисленных литературных данных о применении различных снадобий, приготовляемых в традиционной китайской медицине на основе

трутовых грибов, в качестве нормализующих артериальное давление пищевых добавок.

Смесь препарата «Чакус» (чага – курильский чай – солянка) с высушенным водным экстрактом *Ganoderma lucidum* готовили в виде 4% водного раствора и давали крысам ежедневно на протяжении 12 дней в количестве 0,5 мл с помощью металлической канюли через рот. Артериальное давление измеряли до начала введения препарата и на 7-й и 12-й дни после начала лечения. Результаты представлены в таблице 1 и на рис. 4 (верхняя половина). Среднее по группе из 7 крыс исходное артериальное давление составило $182 \pm 4,25$ мм рт. ст. Незначительное и статистически недостоверное снижение артериального давления отмечено на 7-е сутки введения препарата, когда артериальное давление снизилось до $176 \pm 6,52$ мм рт. ст. Продолжение лечения привело к более значительному эффекту. Через 12 дней введения препарата среднее артериальное давление составило уже $166 \pm 5,41$ мм рт. ст. Разница с исходным уровнем равнялась $16 \pm 6,76$ мм рт. ст. (снижение статистически достоверно, $p < 0,05$).

Параллельно с экспериментальной исследовали контрольную группу гипертензивных крыс, которым вместо грибных и растительных экстрактов давали пить также с помощью канюли растворитель (воду). В этой группе не отмечено существенных изменений артериального давления. Разница величины артериального давления, измеренного на 12-й день, с исходным уровнем составила всего $2,1 \pm 3,09$ мм рт. ст., что не отличается достоверно от нуля.

Таким образом, первая проверка подтвердила наличие гипотензивного эффекта используемого комплекса препаратов.

Эксперимент № 2

Во втором эксперименте планировалось провести более длительный курс лечения препаратом «Чакус» + *Ganoderma* (0,5 мл 4% раствора на крысу ежедневно). 10 крыс-самцов линии НИСАГ весом от 250 до 300 г рассаживались в одиночные клетки и в течение недели проводилось трехкратное измерение исходного уровня артериального давления (табл. 2, рис. 4, нижняя половина).

Динамика АД у гипертензивных крыс линии НИСАГ в процессе их лечения препаратом Чакус



Динамика АД у гипертензивных крыс НИСАГ после лечения препаратом Чакус и спустя 1 мес после его отмены



Рис. 4. Влияние препарата Чакус+ на динамику АД у крыс линии НИСАГ

Динамика АД у гипертензивных крыс линии НИСАГ в процессе их лечения препаратом Чакус



Динамика АД у гипертензивных крыс НИСАГ после лечения препаратом Чакус и спустя 1 мес после его отмены



Рис. 4. Влияние препарата Чакус+ на динамику АД у крыс линии НИСАГ

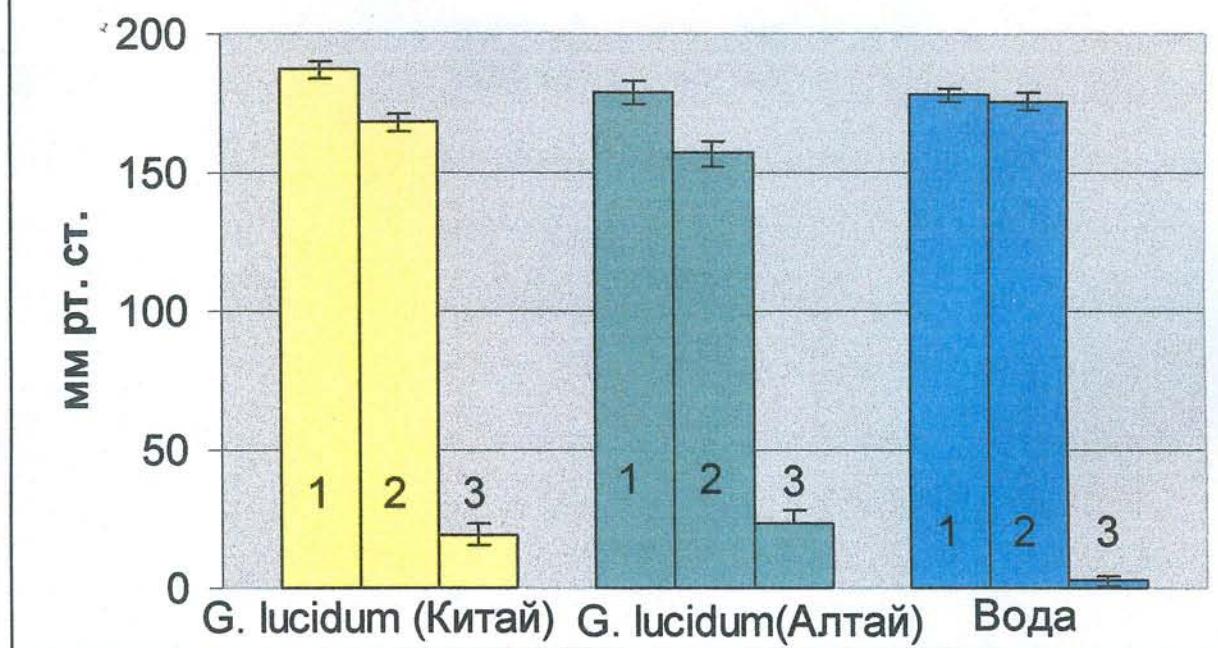
Затем на протяжении 21-го дня ежедневно крысы получали препарат в указанной дозе. По истечении этого времени на 22-й день измеряли артериальное давление и в течение 40 дн лечение больше не проводилось. Последнее измерение артериального давления делали через 40 после отмены курса терапии. Из полученного материала можно сделать совершенно четкий вывод. Смесь препаратов «Чакус» + Ganoderma обладает явным гипотензивным действием. Введение препарата начали на фоне очень стабильного исходного уровня (сравните средние величины исходного уровня АД при его трехкратном измерении – 176,9–176,7–176,9 мм рт. ст.). Лечение в течение 21 дня привело к снижению артериального давления до 155 мм рт. ст. Отмена препарата привела к возвращению артериального давления практически к исходному уровню. Оно выросло до 175,6 мм рт. ст.

Позднее в специальной серии экспериментов была проведена проверка возможного влияния экстрактов *G. lucidum* на крыс с нормальным артериальным давлением. С этой целью крысам линии WAG в течение 40 дней давали пить раствор экстракта *G. lucidum*, также как это делали в эксперименте с крысами линии НИСАГ. Нормальное артериальное давление у крыс линии WAG при этом не претерпевало каких-либо существенных изменений

Эксперимент № 3

В третьем эксперименте проведена сравнительная оценка эффективности экстрактов *G. lucidum*, полученных из Китая (места традиционного использования *G. lucidum* для лечения различных заболеваний) с экстрактами, полученными из Алтайского сырья. Гипертензивные крысы линии НИСАГ были разделены на три группы. Первая группа (9 самцов) получала в течение 40 дн экстракт *G. lucidum*, полученный из Китая, вторая (10 крыс-самцов) – экстракт *G. lucidum*, полученный из алтайского сырья, третья группа (7 крыс) получала воду. По истечении срока лечения измеряли артериальное давление и регистрировали электрокардиограмму.

Влияние экстрактов *G. lucidum* на АД крыс НИСАГ



1 – до лечения

2 – после лечения (40 дней)

3 – величина снижения АД

Рис. 5. Влияние экстрактов *G. lucidum* на АД у гипертензивных крыс линии НИСАГ

Из рис. 5 видно, что прием *G. lucidum* как китайского, так и алтайского происхождения был одинаково эффективен относительно снижения артериального давления. Артериальное давление снижалось примерно на одинаковую величину – 17-19 мм рт. ст. Прием растворителя (вода) крысами контрольной серии, как и следовало ожидать, не приводил к заметному изменению уровня артериального давления.

Интересные результаты получены при анализе электрокардиографической картины у крыс сравниваемых групп (табл. и рис. 6). Во-первых, можно отметить, что картины ЭКГ у крыс, получавших экстракт *G. lucidum*, независимо от его происхождения, имели гораздо больше сходства, чем с ЭКГ крыс, получавших воду. Причем, отмечаемые различия можно интерпретировать как показатель улучшения сердечной функции у получавших грибные экстракти крыс. Так, суммарная величина комплекса QRS в первом и втором стандартных отведениях у экспериментальных крыс положительна, а в контрольной группе - отрицательна (главным образом за счет глубокого зубца S). На ЭКГ крыс, в отличие от человеческой, практически отсутствует зубец Q и сигнальное значение показателя ухудшения коронарного кровоснабжения переходит к зубцу S (своеобразный S-тип электрокардиограммы, встречающийся и в человеческой практике). Неблагоприятным признаком, который отличает ЭКГ крыс, получавших воду, является нарушение инверсии комплекса QRS в отведении aVR. В экспериментальных группах это нарушение не выглядит статистически достоверным.

Характерным для нарушений сердечной функции у крыс НИСАГ, которые отмечались нами и ранее, является возникновение аритмий. Исследованные в данной серии экспериментов крысы не являются исключением. Однако, наиболее выраженным и серьезным нарушением явился случай, отмеченный только у крыс, получавших воду. Наблюдалась полная поперечная блокада сердца с диссоциацией предсердных и желудочковых сокращений. Частота последних была существенной снижена (рис. 7). У двух крыс, получавших экстракти *G. lucidum*, также отмечались моменты ухудшения предсердно-желудочковой проводимости, но они

	I QRS	II QRS	III QRS	aVR QRS	aVL QRS	aVF QRS
Экстракт <i>G. lucidum</i> (Китай)	0,44± 0,87 (9)	1,25± 1,47 (9)	-0,64± 1,218 (9)	-0,06± 0,93 (9)	0,83± 0,86 (9)	0,78± 1,261 (9)
Экстракт <i>G. lucidum</i> (Алтай)	1,75± 2,462 (9)	2,11± 1,646 (9)	0,72± 0,71 (9)	-1,194± 1,845 (9)	-0,33± 0,851 (9)	0,31± 1,23 (9)
Вода	-3,00± 1,534 (7)	-0,893± 1,256 (7)	2,107± 0,754 (7)	2,643± 1,439 (7)	-2,536± 1,067 (7)	0,929± 0,810 (7)

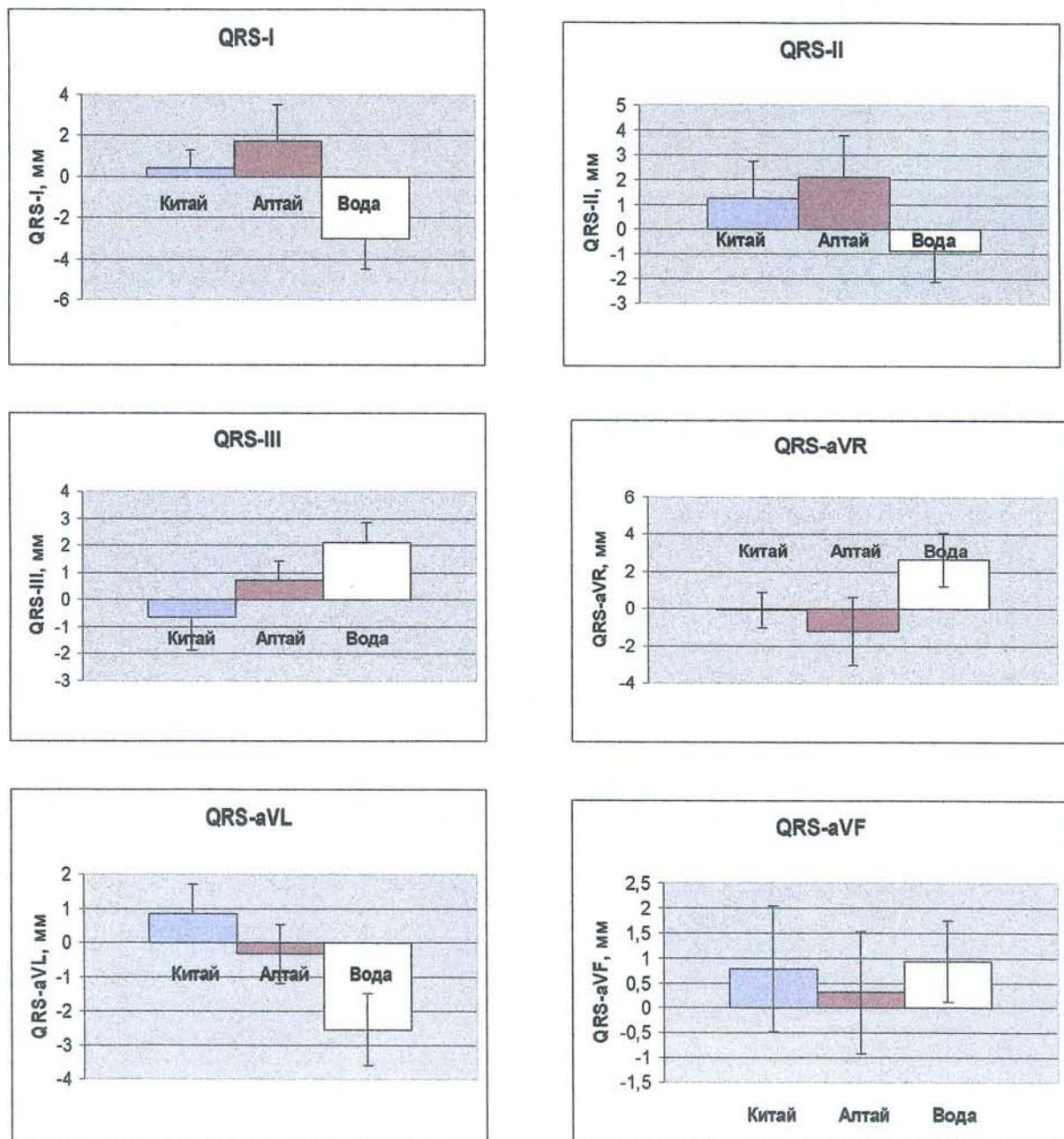
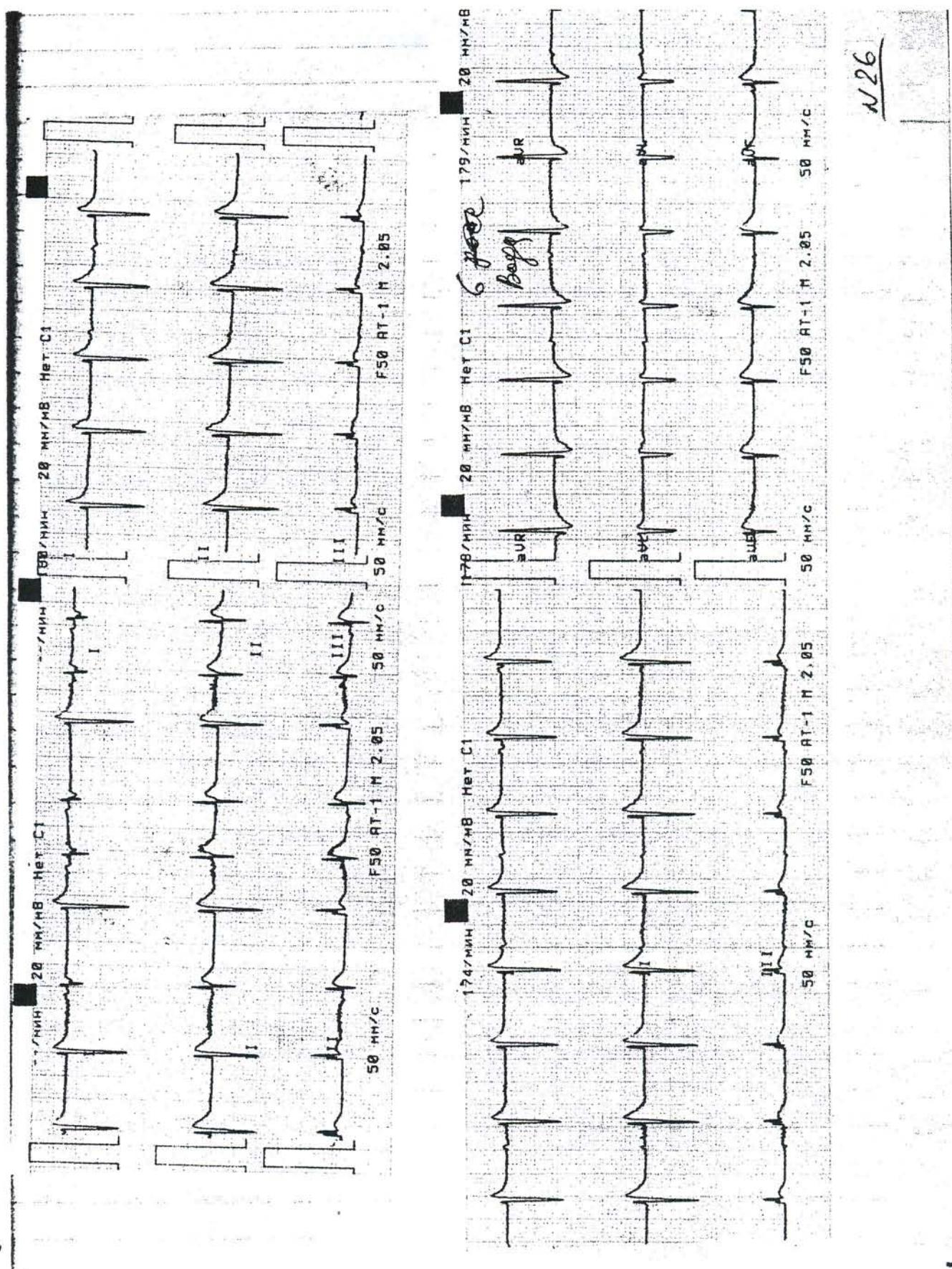


Рис. 6. Оценка изменений функции сердца по данным ЭКГ-исследования под влиянием экстрактов *G. Lucidum*, выделенных из грибов, полученных из Китая и из Алтайского края

Рис. 7. ЭКГ крысы линии НИСАГ с полной атрио-вентрикулярной блокадой



не достигали степени полной блокады (так называемые периоды Самойлова-Венкебаха), как это случилось у крысы из контрольной серии.

В другой серии опытов, проделанной на 10 крысах линии НИСАГ, electrocardiogrammu регистрировали как до, так и после 40-дневного лечения экстрактом *G. lucidum*, полученным из алтайского сырья. Наблюдаемая динамика соответствовала тем различиям ЭКГ, которые были обнаружены при сравнении групп гипертензивных крыс, получавших экстракт *G. lucidum* или воду (рис. 8). То есть, после лечения отмечено увеличение положительных компонентов комплекса QRS в стандартных отведениях и исчезновение выраженного нарушения инверсии комплекса QRS в отведении aVR. В стандартных отведениях конкордантно комплексу QRS происходит также некоторое увеличение зубца Т. Все это указывает на положительную динамику изменения функции сердца под влиянием лечения экстрактом *G. lucidum*.

Эксперимент № 4

Характеристики поведения и неврологический статус

В этом эксперименте сравнивали результаты, полученные при оценке поведенческих тестов, у крыс линии НИСАГ в течение 40 дней получавших экстракт *G. lucidum* (экспериментальная серия) или воду (контрольная серия). Надо признать, что существенных отличий в картине поведения крыс сравниваемых групп отмечено не было. Тем не менее некоторые тенденции изменения поведения под влиянием лечения необходимо отметить (рис. 9). Так, имеется отчетливая тенденция к повышению двигательной активности крыс экспериментальной группы в teste «открытого поля» как на периферии, так и в центре арены. Это может указывать на снижение мотивации страха в незнакомой обстановке. Уровень тревожности, оцененный по поведению в крестообразном лабиринте, под влиянием лечения имеет тенденцию к понижению, также как уменьшается время необходимое для решения задачи по избеганию неприятной ситуации, что обусловлено некоторым повышением способности к обучению. Правда, все эти изменения носят характер тенденций и не достигают степени статистической

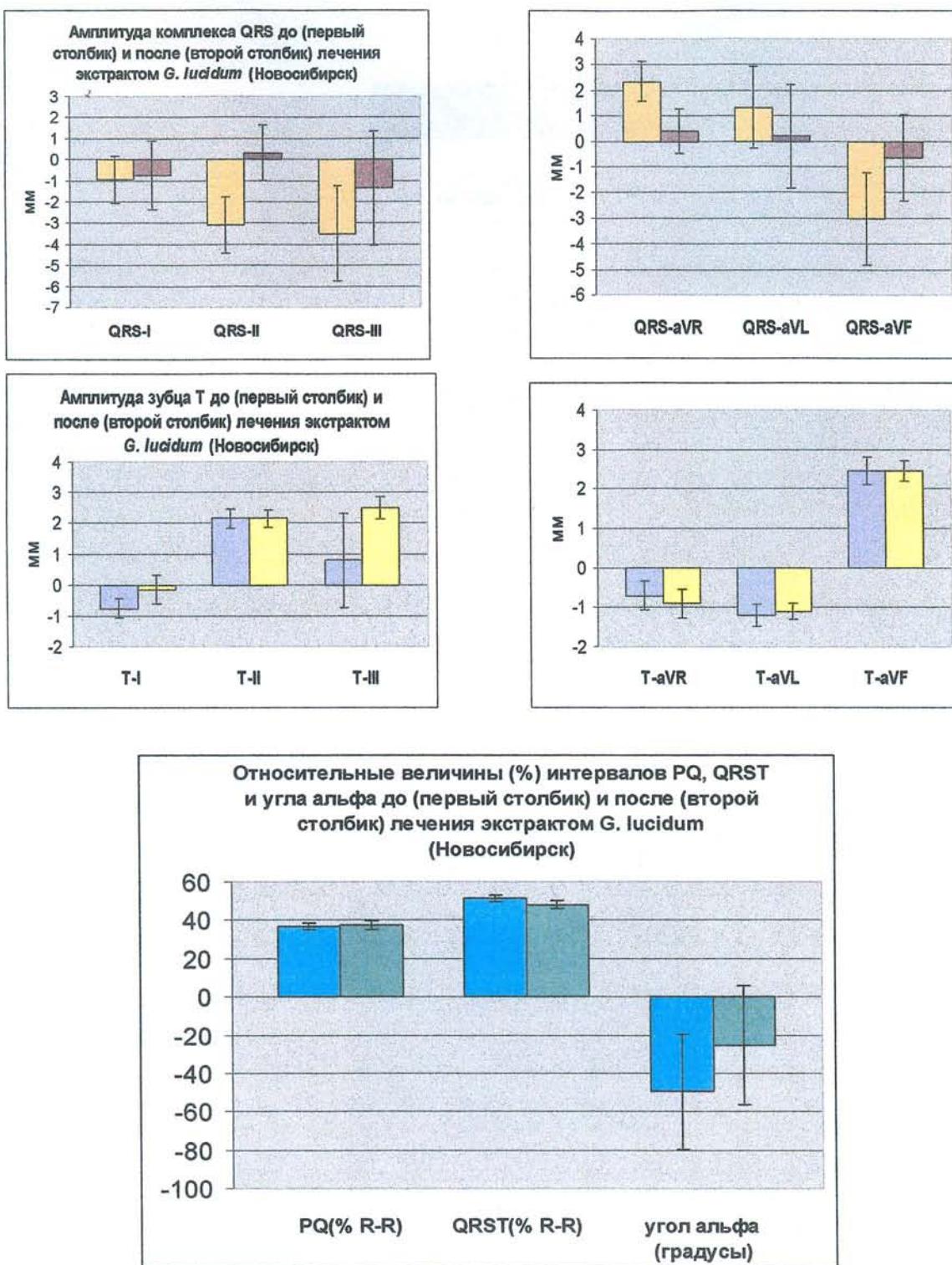
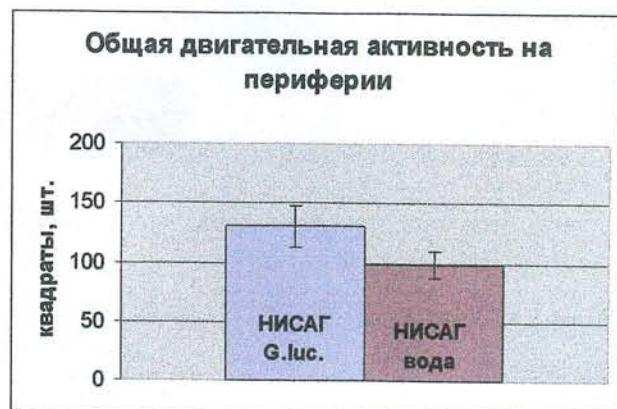


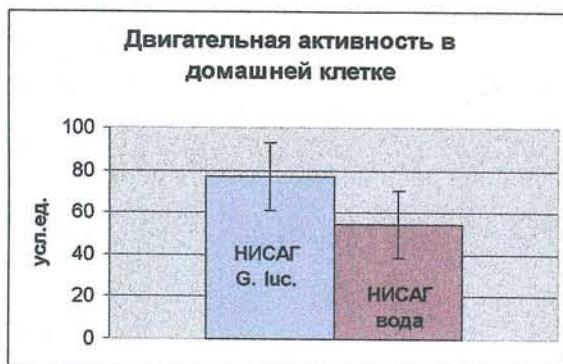
Рис. 3. Динамика изменений функции сердца по данным ЭКГ-исследования под влиянием экстрактов *G. lucidum*, полученных в лаборатории А.В.Троицкого (ИЦиГ СО РАН)

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВЕДЕНИЯ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ НИСАГ

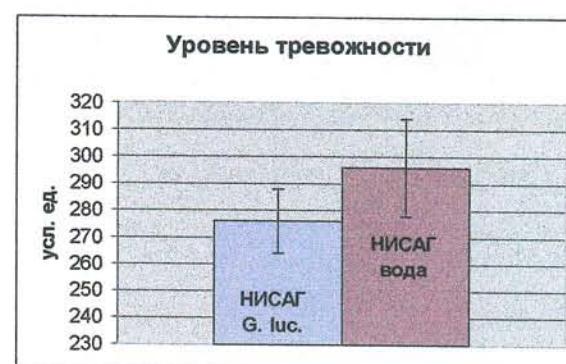
Тест открытого поля



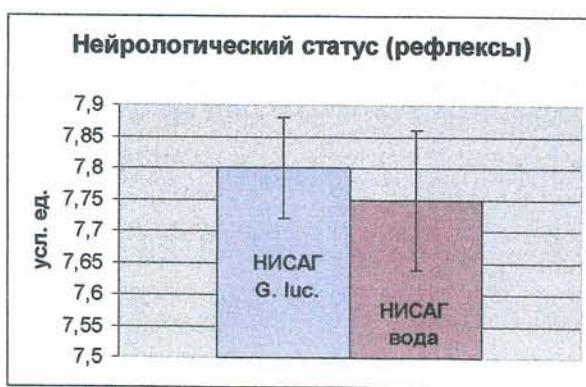
Домашняя клетка



Приподнятый лабиринт



Оценка рефлексов



Тест на обучение

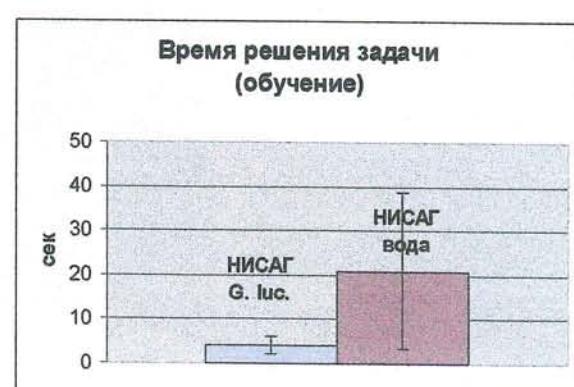


Рис. 9. Сравнение характеристик поведения крыс НИСАГ, получавших экстракт *G. lucidum* (синие столбики) или растворитель (вода – фиолетовые столбики).

достоверности, однако согласованный характер этих, хотя и небольших изменений, заставляет обратить на них внимание. Неврологический статус крыс экспериментальной и контрольной групп практически одинаков и близок к нормальному уровню.

ВЫВОДЫ

1. Экстракты *G. lucidum* и препарат «Чакус» обладают выраженным гипотензивным эффектом, который проявляется на фоне повышенного артериального давления у крыс с наследственной артериальной гипертонией (линия НИСАГ).
2. Экстракты *G. lucidum*, приготовленные из китайского или алтайского сырья, проявляют примерно одинаковое гипотензивное действие и оказывают некоторое кардиопротективное действие у крыс с наследственной артериальной гипертонией.
3. Заметных эффектов на поведение экспериментальных животных и на их неврологический статус исследованные препараты не оказывали.

Таблица 1

Эффект ежедневного введения раствора гриба ("чакус+ганодерма" 0.5 мл/крысу per os) на величину систолического артериального давления у гипертензивных крыс линии НИСАГ

№ п/п	Исходный уровень АД	Через 7 дней после лечения	Разница с исходным уровнем (2-1)	Через 12 дней после лечения	Разница с исходным уровнем (4-1)
1	178	190	12	182	4
2	186	175	-11	175	-11
3	200	185	-15	150	-50
4	180	174	-6	155	-25
5	190	200	10	185	-5
6	175	150	-25	155	-20
7	165	160	-5	160	-5
X ± m	182,0 ± 4,25	176,2±6,52	-5,71±4,99	166,0±5,41	-16,0±6,76
p 1,2		NS			
p 3			NS		
p 1,4				p < 0.05	
p 5					p = 0.05

Эффект ежедневного введения растворителя (вода 0.5 мл/крысу per os) на величину систолического артериального давления (мм рт.ст.) у гипертензивных крыс линии НИСАГ

№ п/п	Исходный уровень АД	Через 7 дней после лечения	Разница с исходным уровнем (2-1)	Через 12 дней после лечения	Разница с исходным уровнем (4-1)
8	170	167	-3	160	-10
9	160	177	17	160	0
10	175	175	0	185	10
11	182	182	0	180	-2
12	165	160	-5	165	0
13	178	190	12	180	2
14	165	165	0	150	-15
X ± m	170,7±3,00	173,7±3,95	3,0±3,10	168,6±4,96	-2,1 ± 3,09
p 1,2		NS			
p 3			NS		
p 1,4				NS	
p 5					NS

Таблица №2

Таблица 5.2
Эффект длительного ежедневного введения раствора гриба ("чакус+гандерма" 0,5 мл/крысу раз в сутки) и последующей отмены препарата на величину системического артериального давления у гипертензивных крыс линии НИСАГ