РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА “КАРДЕКАИМ” НА МОДЕЛИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

Л. Н. Шантанова[1], Э. А. Алексеева[2], А. А. Торопова[1], С. М. Николаев[1], Е. Н. Карева[3]

В опытах на экспериментальных животных изучено влияние превентивного курсового введения препарата растительного происхождения “кардекаим” на основные проявления стресса. В опытах *in vitro* изучены механизмы антистрессорного эффекта тестируемого препарата. Курсовое превентивное введение кардекаима в дозе 100 мг/кг 7 дней перед острым иммобилизационным стрессом оказывает выраженное стресс-протекторное действие, препятствуя развитию признаков “триады Селье” на 15 – 63 % ($p < 0{,}05$). Преобладающим молекулярно-клеточным механизмом стресс-протекторного действия кардекаима является ингибирование процессов перекисного окисления липидов, что обусловлено наличием соединений фенольной природы, обладающих прямым антирадикальным действием и повышающих мощность эндогенной антиоксидантной системы.

Ключевые слова: фитопрепараты; кардекаим; антистресорное действие; крысы; антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение стресс-индуцированной патологии в современных условиях диктует необходимость поиска и разработки эффективных и безопасных лекарственных средств, способных повышать адаптационные возможности организма и обеспечить адекватный уровень физической, эмоциональной и когнитивной активности в экстремальных условиях без повреждающих последствий для организма [3, 8]. Наиболее перспективным направлением решения этой проблемы является разработка адаптогенных средств на основе сырья растительного происхождения, обладающих рядом преимуществ перед синтетическими препаратами. Растительные средства представляют комплексы биологически активных веществ, которые близки по природе эндогенным соединениям организма, оказывают адекватное корригирующее действие на разных уровнях биологической организации; обладают широким спектром фармакологической активности; характеризуются низкой токсичностью и отсутствием неблагоприятных побочных реакций при длительном приеме. В связи с этим нами разработан комплексный препарат на основе сырья 4 видов растений: *Inula helenium* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Elletaria cardamotum* (L.) Maton., *Caragana spinosa*, (L.) Wall. ex Hornem, условно названный “кардекаим”. Основанием для выбора компонентов послужила рецептурная пропись, описанная в тибетском сборнике “Кунпан-дудзи” [7].

Целью исследования явилось определение стресс-протекторной активности кардекаима на модели иммобилизационного стресса и оценка его антиоксидантной активности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кардекаим представляет собой сухой экстракт, полученный из 4 видов растительного сырья: корневищ *Inula helenium* L., *Zingiber officinale* Roscoe, плодов *Elletaria cardamotum* (L.) Maton. и побегов *Caragana spinosa*, (L.) Wall. ex Hornem. Технология получения сухого экстракта включает трехкратную экстракцию фитомикса с предварительной ультразвуковой обработкой смеси, концентрирование, вакуумную сушку и дополнительное введение в готовый сухой экстракт эфирного масла.

Исследование химического состава сухого экстракта кардекаим с применением УФ-спектроскопии, ВЭТСХ, ВЭЖХ и ГХ/МС выявило присутствие олигофруктанов, полисахаридов, флавоноидов, фенилпропаноидов, фенилалканолов, моно- и сесквитерпенов. Доминирующими группами биологически активных веществ (БАВ) являются фенольные соединения и летучие терпеноиды. Общее содержание фенольных соединений в фитомиксе составляет 1,51 %, флавонои-

[1] Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Россия, Улан-Удэ.
[2] Бурятский государственный университет, Россия, Улан-Удэ, ул. Смолина 24а.
[3] ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

дов — 0,56 %. В составе фенольных соединений установлено наличие представителей групп фенилпропаноидов, флавоноидов и арилгептаноидов. Основными фенилпропаноидами являются 3,5-ди-О-кофеилхинная кислота (90,06 мкг/мл), 3,4-диоксикоричная кислота (86,32 мкг/мл) и 1,5-ди-О-кофеилхинная кислота (77,44 мкг/мл). В составе флавоноидов преобладают маркерные компоненты 3-О-рутинозиды кверцетина (рутин; 186,16 мкг/мл) и изорамнетина (нарциссин; 157,96 мкг/мл) [13, 14]. Стандартизацию сухого экстракта осуществляли с применением метода ВЭЖХ-УФ по содержанию рутина, нарциссина, [6]- и [8]-шогаолов. Соединения детектировали при следующих длинах волн: 280 нм (шогаолы), 330 нм (фенилпропаноиды), 350 нм (флавоноиды) [5].

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180 – 220 г. Содержание животных соответствовало "Правилам лабораторной практики" (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. "Об утверждении правил лабораторной практики". Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 "Об утверждении правил лабораторной практики" от 19.06.2003 и Правилами, принятыми "Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123" от 18.03.1986 (Страсбург, 1986). Крыс содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и пище. Иммобилизационный стресс воспроизводили общепринятым методом путем фиксации животных в положении на спине в течение 18 ч. Крысам первой опытной группы внутрижелудочно вводили кардекаим в дозе 100 мг/кг в объеме 5 мл/кг массы в течение 7 дней (однократно за 1 ч до кормления), последнее введение осуществляли за 1 ч до стрессорного воздействия. Животным второй опытной группы вводили препарат сравнения деалкоголизированный экстракт элеутерококка в объеме 5 мл/кг по аналогичной схеме. Животные контрольной группы получали эквиобъемное количество дистиллированной воды. На 7 сут эксперимента животных контрольной и опытных групп подвергали иммобилизационному стрессу, после чего животных декапитировали под легким эфирным наркозом и определяли выраженность "триады Селье": гипертрофию надпочечников, состояние иммунокомпетентных органов и появление деструкций в слизистой оболочке желудка с подсчетом "язвенного индекса Паулса". С целью выявления возможных механизмов антистрессорного действия испытуемых средств определяли содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате печени, концентрацию восстановленного глутатиона в сыворотке крови, активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах и каталазы в сыворотке крови [2]. Для определения роли различных компонентов фитосредства в реализации стресс-протекторной активности исследовали антиоксидантную активность комплексного фитосредства и его компонентов *in vitro*. Антирадикальную активность по отношению к 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил-радикалу (DPPH) определяли бессубстратным методом по [15], по отношению к супероксид-анион радикалу ($O_2^{\bullet-}$) — в неэнзиматической системе феназин-метосульфат/НАДН по методу [9]; по отношению к NO — [11]. Fe^{2+}-хелатирующую активность исследуемых средств определяли с использованием модифицированного *о*-фенантролинового метода [14]. В качестве препарата сравнения использовали гидрохинон и кверцетин (Sigma). Величиной антиоксидантной активности считали концентрацию исследуемых средств, необходимую для ингибирования 50 % реактивных частиц (IC_{50}). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Критерием значимости при статистических расчётах в данной работе являлось значение показателя вероятности ошибки (p) – не более 5 %, то есть $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в результате 18 ч иммобилизации у животных контрольной группы развивается характерная картина стрессорной реакции, т. н. "триада Селье", которая выражается в инволюции иммунокомпетентных органов и значительной гипертрофии надпочечников (табл. 1). Профилактическое введение кардекаима в указанной дозе оказывает выраженное антистрессорное действие, о чем свидетельствует уменьшение степени гипертрофии надпочечников на 15 %; достоверное увеличение относительной массы тимуса и селезенки соответственно на 40 и 63 % по

Таблица 1. **Влияние кардекаима в дозе 100 мг/кг на массу тимуса, селезенки и надпочечников белых крыс при иммобилизационном стрессе ($M \pm m$)**

Группа животных	n	Масса органов, мг/100 г		
		тимус	селезенка	надпочечники
Интактная	6	152,6 ± 12,0	521,0 ± 16,4	17,3 ± 0,8
Контрольная (стресс + H_2O)	6	96,4 ± 8,5	204,6 ± 18,6	27,1 ± 1,4
Опытная 1 (стресс + кардекаим)	6	134,1 ± 10,1*	332,5 ± 20,1*	23,3 ± 1,1*
Опытная 2 (стресс + элеутерококк)	6	99,8 ± 4,1	308,3 ± 3,8*	22,7 ± 1,7

* Здесь и далее различия достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы.

Наряду с этим, превентивное введение кардекаима оказывает гастропротекторное действие, препятствуя развитию глубоких деструкций слизистой оболочки желудка белых крыс (табл. 2). У животных опытной группы 1, получавших исследуемый препарат, образования эрозий не наблюдалось, тогда как у крыс контрольной группы данный вид повреждений отмечался в 66 % случаев. Язвы у животных опытной группы встречались лишь в 25 % случаев при 66 % — в контроле. Соответственно, индекс Паулса для язв у животных, получавших испытуемое средство, был меньше, чем таковой у крыс контрольной группы, и составил 0,125 против 0,4 в контроле. В слизистой желудка крыс, входящих в контрольную группу, наблюдался резко выраженный отек и гиперемия, тогда как у крыс, получавших испытуемое средство, отек и сглаженность рельефа слизистой желудка были умеренными. При этом гастропротекторное действие кардекаима несколько уступало препарату сравнения — экстракту элеутерококка.

Данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют, что 18-часовая иммобилизация сопровождается повышением концентрации ТБК-активных продуктов при значительном снижении активности системы антиоксидантной защиты организма.

Установлено, что превентивное курсовое (7 дней) введение кардекаима в дозе 100 мг/кг внутрижелудочно перед иммобилизационным стрессом оказывает выраженное антиоксидантное действие, что подтверждает достоверное снижение концентрации ТБК-активных продуктов в гомогенате печени на 36 %, увеличение содержания восстановленного глутатиона в крови на 18 %, а также повышение активности каталазы на 17 %, СОД в 3,4 раза по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. При этом антиоксидантная активность испытуемого средства была сопоставима с таковой у препарата сравнения.

В следующей серии экспериментов в условиях *in vitro* оценивали антирадикальную активность кардекаима и входящих в его состав компонентов. Показано, что исследуемое средство обладает выраженной антирадикальной активностью в отношении связывания стабильного DPPH-радикала (IC_{50}^{DPPH} = 87 мкг/мл) (табл. 4). Величина антирадикальной активности исследуемых средств возрастает в ряду *Z. officinalis* (320 мкг/мл) < *E. cardamonum* < *I. helenium* < *C. spinosa* (4,5 мкг/мл). Наибольший вклад в проявление данного вида активности комплексного фитосредства кардекаим вносят *I. helenium* и *C. spinosa*, которые характеризуются высоким содержанием флавоноидов (рутина и нарциссина), а также фенилпропаноидов. При изучении влияния кардекаима на активные формы кислорода ($O_2^{\bullet-}$ и $NO^{\bullet}$) выявлено, что комплексное фитосредство обладает способностью к их инактивации. Наиболее выраженная антирадикальная активность препарата установлена в отношении супероксид-анион радикала (IC_{50} составила 18,2 мкг/мл), что превосходит таковую у препарата сравнения. Данный вид активности кардекаима обусловлен, очевидно, флавонолгликозидами, входящими в состав *C. spinosa* (IC_{50} = 0,32 мкг/мл). В отношении NO у препарата выявлена умеренная активность (IC_{50} = 1650 мкг/мл), уступающая таковой гидрохинона (IC_{50} = 56,2 мкг/мл) и кверцетина (IC_{50} = 150,1 мкг/мл). Установлено, что кардекаим обладает Fe^{2+}-хелатирующей активностью, уровень IC_{50} которой составил 279 мкг/мл, что существенно превосходит железосвязывающую активность у веществ сравнения гидрохинона и кверцетина (IC_{50} > 5000). Из компонентов кардекаима наиболее выраженную хелатирующую активность демонстрируют *Z. officinalis*

Таблица 2. **Влияние кардекаима (100 мг/кг) на выраженность повреждений слизистой оболочки желудка у белых крыс на фоне иммобилизационного стресса**

Показатель		Группа животных			
		интактная, n = 6	контрольная (стресс + H_2O), n = 6	опытная 1 (стресс + кардекаим), n = 8	опытная 2 (стресс + элеутерококк), n = 6
Кровоизлияния	% поражения животных	0	66	25*	0*
	среднее число деструкций на 1 животное	0	0,6	0,5	0*
	индекс Паулса	0	0,4	0,125*	0*
Эрозии	% поражения животных	0	66	0*	33*
	среднее число деструкций на 1 животное	0	1,33	0*	1
	индекс Паулса	0	0,87	0*	0,33*
Язвы	% поражения животных	0	66	25*	0*
	среднее число деструкций на 1 животное	0	0,6	0,5	0*
	индекс Паулса	0	0,4	0,125*	0*

* Различия достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Таблица 3. **Влияние кардекаима (100 мг/кг) на показатели свободнорадикального окисления и состояние антиоксидантной системы белых крыс на фоне 18 ч иммобилизационного стресса ($M \pm m$)**

Показатель	Группа животных			
	интактная (n = 6)	контрольная (стресс + H_2O), (n = 6)	опытная 1 (стресс + кардекаим), (n = 6)	опытная 2 (стресс + элеутерококк), (n = 6)
ТБК-продукты в гомогенате печени, мкмоль/г ткани	10,73 ± 1,64	16,37 ± 1,842	10,40 ± 0,11*	11,53 ± 0,428*
СОД в эритроцитах, ед. активности	13,12 ± 1,28	2,02 ± 0,304	7,02 ± 0,518*	6,65 ± 0,45*
Каталаза в сыворотке крови, мкат/л	13,51 ± 0,698	10,43 ± 1,13	12,20 ± 0,69*	13,65 ± 1,113*
Восстановленный глутатион, мкмоль/мл	707,0 ± 0,01	591,0 ± 0,024	698,0 ± 0,067*	715,0 ± 0,007*

* Различия достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0{,}05$.

(IC_{50} = 245 мкг/мл) и *E. cardamonum* (IC_{50} = 302 мкг/мл).

Таким образом, курсовое превентивное введение кардекаима оказывает выраженное стресс-протекторное действие в модели острого иммобилизационного стресса, препятствуя развитию признаков “триады Селье”. Установлено, что одним из основных молекулярно-клеточных механизмов его стресс-протекторного действия является наличие выраженной антиоксидантной активности, так как известно, что универсальным механизмом повреждения биомакромолекул при стрессе является индукция процессов свободнорадикального окисления вследствие повышенной генерации свободных радикалов, нарушения нормального соотношения про- и антиоксидантов [4, 6]. Показано, что выраженная антиоксидантная активность фитопрепарата обусловлена доминирующими в составе испытуемого средства соединениями фенольной природы — флавоноидами (рутином, нарциссином), фенилпропаноидами, обладающими прямым радикал-перехватывающим действием, путем образования феноксильных радикалов и стабилизации мембран вследствие способности фенолов проникать в липидный бислой [1, 12]. Установлено, что реализация антиоксидантной активности кардекаима связана также с его способностью связывать ионы металлов переменной валентности и тем самым предотвращать развитие свободнорадикальных реакций. При этом Fe^{2+}-хелатирующая активность кардекаима и его компонентов коррелировала с содержанием полисахаридов и обусловлена, очевидно, присутствием в его составе *Z. officinalis* и *E. Cardamonum*, обладающих данным видом активности [10]. Кроме того, биологически активные соединения, входящие в состав испытуемого средства, оказывают опосредованное антиокислительное действие, выражающееся в способности защищать от окислительной деструкции важнейшие эндогенные соединения, участвующие в антиоксидантной защите: СОД, каталазу и тиоловые соединения, способствуя тем самым повышению антиокислительной защиты организма. В результате совокупного действия биологически активных веществ кардекаима, обладающих прямым и опосредованным антиоксидантным действием, обеспечивается структурная и функциональная целостность биологических мембран при стресс–индуцированных патологических состояниях.

ВЫВОДЫ

1. Курсовое превентивное введение кардекаима (100 мг/кг, 7 дней) перед острым иммобилизационным стрессом оказывает выраженное стресс-протекторное действие, препятствуя развитию признаков “триады Селье” на 15 – 63 % ($p < 0{,}05$).

Таблица 4. **Антиоксидантная активность кардекаима и входящих в его состав компонентов в стандартных модельных системах ($M \pm m$)**

Компонент	IC_{50}, мкг/мл			
	DPPH [a]	$O_2^{\bullet-}$ [a]	$NO^{\bullet}$ [a]	Fe^{2+}
Кардекаим	87,0 ± 2,2	18,2 ± 0,3	1650,0 ± 11,0	279,0 ± 11,2
Zingiber officinale	320,0 ± 5,1	42,0 ± 1,7	> 5000	245,0 ± 9,1
Caragana spinosa	4,5 ± 0,1	0,32 ± 0,01	190,0 ± 9,0	652,0 ± 10,3
Inula helenium	42,0 ± 1,2	63,6 ± 0,2	478,0 ± 11,2	1120,0 ± 12,6
Elletaria cardamonum	320,0 ± 5,1	319,0 ± 10,8	352,0 ± 10,9	302,0 ± 11,9
Гидрохинон[в]	3,7 ± 0,1	251,1 ± 8,2	56,2 ± 1,3	> 5000
Кверцетин[в]	9,9 ± 0,2	32,0 ± 1,4	150,1 ± 4,1	> 5000

Примечание: [a] DPPH — антирадикальная активность в отношении DPPH радикала, $O_2^{\bullet-}$ — связывание супероксидного радикала, $NO^{\bullet}$ — связывание молекул оксида азота (II), Fe^{2+} — Fe^{2+}-хелатирующая активность; [в] — вещества сравнения.

2. Основным молекулярно-клеточным механизмом стресс-протекторного действия кардекаима является ингибирование процессов перекисного окисления липидов, что обусловлено наличием соединений фенольной природы, обладающих прямым антирадикальным действием и повышающих мощность эндогенной антиоксидантной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Азам, О. А. Горошко, В. П. Пахомова, *Традиционная медицина*, № 1, 35 – 38 (2009).
2. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина, *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма*, Санкт-Петербург (2000).
3. Э. Б. Арушанян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **71**(6), 58 – 66 (2008).
4. Е. Б. Бурлакова, *Рос. хим. журн.*, **2**(1), 3 – 12 (2007).
5. Н. И. Кащенко, Д. Н. Оленников, *Бутлеровские сообщ.*, **36**(12), 66 – 74 (2013).
6. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин и др., *Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания*, Наука, Новосибирск (2008).
7. Сумати Праждня, Кунпан-Дудзи, *Большой рецептурный справочник Агинского дацана*, пер. с тибет. яз. Д. Б. Дашиева, Москва (2008).
8. К. В. Яременко, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **5**(4), 1086 – 1092 (2005).
9. A. S. Chen, T. Taguchi, K. Sakai, et al., *Biol. Pharm. Bul.*, **26**(9), 1326 – 1330 (2003).
10. H. Chen, Y. Ju, J. Li, M. Yu, *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**(1), 214 – 218 (2012).
11. R. Govindarajan, S. Rastogi, M. Vijayakumar, *Biol. Pharm. Bul.*, **26**(10), 1424 – 1427 (2003).
12. R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. C. van Hoorn, et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**(4), 418 – 425 (2001).
13. D. N. Olennikov, V. V. Partilkhaev, *J. Planar Chromatogr.*, *Modern TLC*, **25**(1), 30 – 35 (2012).
14. D. N. Olennikov, L. M. Tankhaeva, S. V. Agafonova, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **47**(4), 462 – 468 (2011).
15. A. Seyoum, K. Asres, F. K. El-Fiky, *Phytochemistry*, **67**(18), 2058 – 2070 (2006).

Поступила 23.02.15

ANTISTRESS ACTIVITY OF COMPLEX PHYTOPREPARATION KARDEKAIM ASSESSED ON THE MODEL OF IMMOBILIZATION STRESS IN RATS

L. N. Shantanova[1], E. A. Alekseeva[2], A. A. Toropova[1], S. M. Nikolaev[1], and E. N. Kareva[3]

[1] Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Sakh'yanova 6, Ulan-Ude, Buryat Republic, 670047 Russia

[2] Buryat State University, ul. Smolina 24a, Ulan-Ude, Buryat Republic, 670000 Russia

[3] Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

The effect of preventive administration of the complex phytopreparation kardekaim on the main manifestations of stress has been studied in experiments on rats. Basic mechanisms of antistress action of the test drug have been experimentally studied *in vitro*. The preventive course introduction of kardekaim in a dose of 100 mg/kg for 7 days before the acute immobilization stress test has a pronounced protective effect preventing the development of Selye triad signs by 15 – 63% ($p < 0.05$). The main molecular mechanism of the cellular antistress action of kardekaim is the inhibition of lipid peroxidation, which is related to the presence of compounds of phenolic nature that exhibit direct antiradical activity and increase capacity of the endogenous antioxidant system.

Keywords: phytopreparations; kardekaim; antistress action; rats; antioxidants.