

С.Т. Кохан, А.В. Патеюк, Е.М. Кривошеева

**СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ АДАПТОГЕНОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

ФГБОУ ВПО «Забайкальский государственный университет», Чита, Россия

Целью работы явилось исследование возможности повышения стрессоустойчивости и патогенетическое обоснование применения растительных адаптогенов астрагал и «Арура-Тан № 7». Показано, что все исследуемые растительные средства улучшают метаболические процессы в тканях экспериментальных животных и регулируют процессы свободнорадикального окисления. Растительные фитосредства в используемых дозах не обладают токсичностью и, следовательно, могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования.

Ключевые слова: стресс, растительные адаптогены, астрагал, «Арура-Тан №7», перекисное окисление липидов

STRESS-PROTECTIVE ACTION OF HERBAL ADAPTOGENS IN EXPERIMENT

S.T. Kokhan, A.V. Pateyuk, E.M. Krivosheyeva

Transbaikial State University, Chita, Russia

In recent years the main mortality reasons were coronary heart disease, hypertension, cancer, peptic and duodenal ulcers, mental illness. Provoking factor of these diseases is chronic stress. It activates lipid peroxidation, which is one of the damaging factors for the internal organs. In the present study, we investigated the possibility to increase stress resistance and to find pathogenetic grounding of the use of plant adaptogens – astragalus, ginseng, and "Arur-Tan N 7" in experimental stress. We have shown that all herbal remedies improve metabolic processes in the tissues of experimental animals and regulate the processes of free radical oxidation. Studies have shown that phyto remedy "Arur-Tan N 7" shows antiradical activity against NO-binding radicals comparable to that of quercetin, rutin and hydroquinone. On this basis, phyto remedy "Arur-Tan N 7" was more effective in animals in simulation of stress induced by strenuous activity, it restores cells energy potential, normalizes "lipid peroxidation – antioxidant protection" balance and maintains the balance of thiols in animal body. Moreover, all tested herbal remedies at the dosages used are not toxic and therefore can be recommended for further studies.

Key words: stress, herbal adaptogens, astragal, "Arura-Tan N 7", lipid peroxidation

Ишемическая болезнь сердца, гипертония, опухоли, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, психические заболевания являются основными причинами смертности населения [2]. Часто провоцирующим фактором этих заболеваний является хронический стресс. Известно, что при стрессе происходит выброс стресс-гормонов, активизируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), что является одним из повреждающих факторов внутренних органов [1, 4, 7]. Поиск средств снижения последствий стрессовых реакций является актуальной и важной задачей экспериментальной медицины [3, 5].

Целью данной работы было исследование влияния физического стресса на показатели ПОЛ и сравнение стресс протекторного действия растительных адаптогенов в эксперименте.

Эксперименты проведены на крысах линии Wistar обоего пола массой 180–220 г. Стресс вызывали методом плавания животных с грузом, равным 5 % массы тела, до полного утомления. Животным опытной группы внутрижелудочно вводили отвар «Арура-Тан № 7» однократно в объемах 2,5; 5,0; 10,0 мл/кг (конечный объем вводимого водного раствора во всех группах составлял 1,0 мл/100 г) за 1 час до тестирования, а также многократно в течение 7 дней до тестирования в объеме 5,0 мл/кг 1 раз в сутки за 30 минут до кормления. Фитосредство «Астрагал» (Ас) вводили крысам внутрижелудочно однократно

и многократно (в течение 7 дней) в экспериментально-терапевтических дозах 100–150 мг/кг; 1,0–1,5 и 5,0 мл/кг соответственно, конечный объем составил 5,0 мл/кг. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество дистиллированной воды. В качестве препарата сравнения использовали деалкоголизированный водный раствор экстракта элеутерококка (ЭЭ) в объеме 5,0 мл/кг [3, 4, 10]. После этого крыс декапитировали и определяли: содержание АТФ в гомогенате скелетной мышцы, в сыворотке крови – концентрацию молочной и пировиноградной кислот с расчетом окислительно-восстановительного потенциала по отношению МК/ПБК; в гомогенате печени – содержание гликогена. Об интенсивности СРО в сыворотке крови и гомогенате тканей судили по приросту уровня малонового диальдегида (МДА), который определяли в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу И.Д. Стальной и др. (1977) [6].

Оценку активности ферментов антирадикальной защиты проводили спектрофотометрическими методами. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН при 540 нм по методу Э.Н. Коробейниковой (1989); активность каталазы определяли в цветной реакции образования комплекса пероксида водорода с молибдатом аммония,

поглощающего при 410 нм по методу М.А. Королук, Л.И. Ивановой, И.Г. Майоровой (1988) [6].

Концентрацию восстановленного глутатиона определяли по образованию тионитрофенильного аниона, имеющего максимум поглощения при длине волны 412 нм, в реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой по методике G.L. Ellman (1959) [6].

Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям Международных правил гуманного отношения к животным, отраженным в Санитарных правилах по оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) [11]. Все работы проведены в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [11].

Статистическую обработку материалов осуществляли на ПК, результаты абсолютных значений по всем параметрам представляли в виде среднего \pm среднеквадратичного отклонения от среднего ($M \pm m$) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Однократное введение растительного средства «Арура-Тан № 7» в объеме 2,5 мл/кг не оказывает ста-

тистически значимого влияния на продолжительность плавания мышей, тогда как введение его в объеме 5,0 мл/кг сопровождалось повышением общей физической выносливости животных в среднем на 40 % по сравнению с данными крыс контрольной группы. Увеличение объема испытуемого средства до 10,0 мл/кг оказывало аналогичное актопротекторное действие: продолжительность плавания повышалась на 46 % по сравнению с контролем. Эффективность адаптогенного средства в объемах 5,0 и 10,0 мл/кг была близкой таковой у препарата сравнения – «ЭЭ». Установлено, что актопротекторная активность «Арура-Тан № 7» повышается при его многократном введении, о чем свидетельствует увеличение продолжительности плавания крыс опытной группы на 95 % по сравнению с данными животных контрольной группы.

Следует отметить, что наибольшая эффективность испытуемого средства «Арура-Тан № 7» превосходила таковую препарата сравнения (ЭЭ) только при многократном введении (табл. 1).

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, стресс вызванный интенсивной физической нагрузкой, в группе контроля сопровождается снижением концентрации АТФ на 49,0 % ($p < 0,001$) и повышением уровня пировиноградной и молочной кислот в

Таблица 1
Влияние растительных адаптогенов на продолжительность плавания при экспериментальном стрессе ($M \pm m$)

№	Группы животных	Объем, мл/кг	n	Продолжительность плавания, мин	
				при однократном введении	при многократном введении
1	Контрольная	–	10	4,6 \pm 0,42	5,5 \pm 0,45
2	Арура-Тан № 7	2,5	8	5,2 \pm 0,30	–
3	Арура-Тан № 7	5,0	8	6,4 \pm 0,40*	10,7 \pm 0,35*
4	Арура-Тан № 7	10,0	8	6,7 \pm 0,35*	–
5	Элеутерококк	5,0	8	6,5 \pm 0,52*	8,5 \pm 0,28*

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с данными животных контрольной группы при $p \leq 0,05$.

Таблица 2
Влияние фитопрепаратов на биохимические показатели белых крыс при действии стресса, индуцированного повышенной физической нагрузкой ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных				
	Интактная (n = 10)	Контрольная «стресс + H ₂ O» (n = 12)	Опытная 1 «стресс + ЭЭ» (n = 12)	Опытная 2 «стресс + Ас» (n = 12)	Опытная 3 «стресс + АТ» (n = 12)
АТФ в гомогенате скелетной мышцы, мкмоль/мин/г белка	0,55 \pm 0,03	0,28 \pm 0,01	0,39 \pm 0,03*	0,43 \pm 0,06*	0,48 \pm 0,05*
Гликоген в гомогенате печени, г%	1012,0 \pm 76,8	778,5 \pm 52,7	908,0 \pm 40,1*	958,0 \pm 43,2*	1008,0 \pm 47,3
ПВК, ммоль/л	3,21 \pm 0,25	4,22 \pm 0,26	4,03 \pm 0,34*	3,64 \pm 0,30*	3,17 \pm 0,27*
МК, ммоль/л	48,51 \pm 3,63	102,09 \pm 4,50	85,05 \pm 5,52*	73,40 \pm 5,11*	65,04 \pm 5,52*
МК/ПВК	15,1 \pm 1,33	26,1 \pm 2,54	21,15 \pm 1,82*	20,19 \pm 1,14*	20,51 \pm 1,31*
МДА в сыворотке крови, мкмоль/л	3,72 \pm 0,36	12,81 \pm 0,85	7,53 \pm 0,95*	6,02 \pm 0,87*	5,15 \pm 0,79*
МДА в гомогенате печени, мкмоль/г ткани	2,73 \pm 0,15	9,81 \pm 0,46	8,18 \pm 0,38*	7,02 \pm 0,33*	4,42 \pm 0,29*
Каталаза сыворотки, мккат/л	1,91 \pm 0,09	1,05 \pm 0,05*	1,28 \pm 0,11*	1,43 \pm 0,15*	1,73 \pm 0,21*
СОД в гомогенате печени, усл. ед	2,45 \pm 0,12	0,69 \pm 0,04*	0,92 \pm 0,09*	1,23 \pm 0,14*	1,47 \pm 0,28*
Восстановленный глутатион (GSH) в гомогенате печени, мкмоль/г ткани	6,45 \pm 0,47	4,82 \pm 0,41*	4,18 \pm 0,37*	5,34 \pm 0,49*	6,14 \pm 0,71*
Гомоцистеин сыворотки крови, мкмоль/л	5,72 \pm 1,35	9,11 \pm 2,09*	8,02 \pm 1,93	7,32 \pm 1,69	6,17 \pm 2,03

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с данными животных контрольной группы при $p < 0,05$.

1,3 раза ($p < 0,001$) и 2,1 раза ($p < 0,001$) соответственно относительно интактных животных. Отношение МК/ПВК так же выросло в 1,7 раза ($p < 0,001$), что является основным лимитирующим фактором физической работоспособности.

Кроме этого, на фоне стресса наблюдалось истощение углеводных запасов, на что указывает снижение концентрации гликогена в печени на 23,3 % ($p < 0,002$), а также активация процессов свободнорадикального окисления: повышение концентрации МДА в сыворотке крови и гомогенате печени в 3,4 раза ($p < 0,001$) и 3,6 раза ($p < 0,001$) соответственно и снижения ферментативных факторов антирадикальной защиты, каталазы сыворотки на 45,0 % ($p < 0,001$) и СОД гомогената печени на 71,8 % ($p < 0,001$). Концентрация восстановленного глутатиона на фоне стресса уменьшается на 25,3 % ($p < 0,007$), при этом уровень гомоцистеина возрастает в 1,6 раза ($p < 0,001$).

При применении фитосредств «Астрагал» и «Арура-Тан № 7» исследуемые биохимические параметры изменялся однотипно, однако, выраженность этих изменений была больше при применении второго препарата.

Энергетический потенциал клетки возрастал за счет увеличения АТФ и гликогена, так при применении «Арура-Тан № 7» их уровень был выше на 71,43 % ($p < 0,001$) и 29,6 % ($p < 0,003$) соответственно относительно контрольной группы; на 23,1 % ($p < 0,001$) и 11,0 % ($p < 0,011$) соответственно относительно группы с препаратом сравнения; на 11,6 % ($p < 0,017$) и 5,2 % ($p < 0,031$) соответственно по сравнению с группой где применялся «Астрагал».

Концентрация ПВК и МК в опытной группе № 3 значимо снижались относительно контрольной группы, так и опытных групп № 1 и № 2. В тоже время соотношение МК/ПВК значимо снижалось только относительно контрольной группы, а относительно опытных групп № 1 и № 2 находилось приблизительно на одном уровне.

Процессы свободнорадикального окисления при использовании «Арура-Тан № 7» замедлялись, уровень МДА в сыворотке, гомогенате печени снижался на 59,8 % ($p < 0,001$) и 44,9 % ($p < 0,001$) относительно контрольной группы; на 31,6 % ($p < 0,001$) и 45,9 % ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с препаратом сравнения «ЭЭ»; на 14,5 % ($p < 0,011$) и 37,0 % ($p < 0,001$) соответственно относительно препарата «Ас».

Уровень антирадикальной защиты возрастал при использовании комплексного препарата «Арура-Тан № 7». Так активность каталазы была выше контрольной группы и опытных групп № 1 и № 2 в 1,6 раза ($p < 0,001$), 1,4 раза ($p < 0,001$) и 1,2 ($p < 0,008$) раза соответственно. Показатели активности СОД также увеличивались.

Содержания восстановленного глутатиона в гомогенате печени при использовании во всех опытных группах возрастало относительно контрольных животных и достигало наибольших значений при использовании «Арура-Тан № 7». Концентрация гомоцистеина в сыворотке крови снижалась во всех опытных группах.

Антирадикальную активность по отношению к супероксидным анион-радикалам исследовали следующим образом. Связывание супероксидных радикалов (ССР) определяли по методу Chen et al. (2003), в котором продукция $O_2^{\cdot-}$ осуществлялась в неэнзиматической системе феназин метосульфат – НАДН с последующей спектрофотометрической регистрацией количества окисленного тетразолия нитросинего. Испытуемое фитосредство исследовали в концентрациях 4,7; 127,0; 255,0 и 507,0 мкг/мл. В качестве препаратов сравнения использовали рутин и кверцетин (Sigma).

Результаты исследования логарифмировались по концентрационной шкале с последующим регрессионным анализом и определением величины 50 % связывания $O_2^{\cdot-}$ (IC50) (табл. 3).

Установлено, что АТ обладает выраженной активностью в отношении связывания супероксидных анион-радикалов (IC50 = 17,5 мкг/мл), сопоставимой с таковой препарата сравнения.

При изучении антирадикальной активности в отношении связывания NO-радикала установлено протекторное влияние АТ. Связывание NO определяли по методу Govindarajan et al., заключающийся в связывании веществом (препаратом) нитрозогруппы (NO) нитропруссидом натрия с последующей спектрофотометрической регистрацией остаточного содержания NO реактивом Грисса. Испытуемое фитосредство исследовали в концентрациях 0,182; 0,455; 0,910; 1,82 и 3,65 мг/мл. В качестве вещества сравнения использовали гидрохинон, аскорбиновую кислоту (АК), кверцетин (Sigma), рутин. Полученные результаты подвергали логарифмированию по концентрационной шкале с последующим регрессионным анализом и определением величины 50 % связывания NO (IC50) (табл. 4).

Таблица 3
Влияние «Арура-Тан № 7» на степень связывания супероксидных анион-радикалов в зависимости от концентрации

Объект	Концентрация, мкг/мл				
	0,58	2,34	9,37	37,5	150
Рутин	54,44	61,49*	66,53	71,98*	82,66*
Кверцетин	34,07	44,76*	50,20*	87,50*	90,53*
«Арура-Тан № 7»	4,7	127*	255*	507*	508,0*
	36,75	72,09*	69,30*	96,28*	100*

Примечание: * – достоверность различий между группами при $p < 0,05$.

Таблица 4

Влияние «Арура-Тан № 7» на степень связывания NO-радикалов в зависимости от концентрации препарата

Препарат	Концентрация, мг/мл				
	0,004	0,018	0,075	0,300	2,50
Гидрохинон	43,21	45,65	52,27*	62,37*	100*
Аскорбиновая кислота	0,00	11,60*	18,11*	35,70*	73,31*
Кверцетин	8,71	27,53*	37,28*	75,56*	100*
Рутин	45,60	50,18	60,63*	67,25*	100*
«Арура-Тан № 7»	0,182	0,455*	0,91*	1,82*	3,65*
	17,65	57,52*	84,55*	93,29*	100*

Примечание. * – достоверность различий между группами при $p < 0,05$.

ВЫВОДЫ

1. Растительное адаптогенное фитосредство «Арура-Тан № 7» проявляет выраженную антирадикальную активность в отношении связывания NO-радикалов ($IC_{50} < 405,0$ мкг/мл).

2. При моделировании стресса, индуцированного физическими нагрузками, у животных «Арура-Тан № 7» восстанавливает энергетический потенциал клеток, нормализует баланс в системе «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» и поддерживает баланс тиолов в организме животного.

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

- Горбенко М.В., Попова Т.Н., Шульгин К.К., Попов С.С. и др. Воздействие мелаксена и вальдоксана на интенсивность свободнорадикальных процессов, активность аконитгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при гипертиреозе // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, № 4. – С. 462–468.
- Gorbenko MV, Popova TN, Shulgin KK, Popov SS et al. (2014). Impact of melaxen agomelatine and the intensity of free radical processes, aconitate hydratase activity and citrate content in the tissues of rats with hyperthyroidism [Vozdeistvie melaksena i val'doksana na intensivnost' svobodnoradikal'nykh protsessov, aktivnost' akonitatgidratazy i sodержание tsitrata v tkanyakh krys pri gipertireoze]. *Biomeditsinskaya khimiya*, 4, 462–468.
- Игумнов С.А., Жебентяев В.А. Стресс и стресс-зависимые заболевания. – СПб.: Речь, 2011. – 345 с.
- Igumnov SA, Zhebentyaev VA (2011). Stress and stress-dependent diseases [Stress i stress-zavisimye zabolovaniya], 345.
- Кохан С.Т., Патеюк А.В., Мондодоев А. Протекторное действие биологических активных добавок «Астрагал» и «Женьшень с Астрагалом» при гипоксии и стрессе // Вестник фармации – 2012. – № 4 (58). – С. 59–63.
- Kokhan ST, Pateyuk AV, Mondodoev A (2012). Protective effect of biologically active additives «Astragal» and «Ginseng with astragalus» during hypoxia and stress [Protektornoe deistvie biologicheskikh aktivnykh dobavok «Astragal» i «Zhen'shen' s Astragalom» pri gipoksii i stresse]. *Vestnik farmatsii*, 4, 59–63.
- Кохан С.Т., Патеюк А.В., Шантанова Л.Н. Протекторное влияние многокомпонентного растительного сбора на морфологию некоторых внутренних органов и процессы перекисного окисления липидов при иммобилизационном стрессе // Научные ведомости БелГУ. – 2013. – № 4 (147), Вып. 21. – С. 229–233.
- Kokhan ST, Pateyuk AV, Shantanova LN (2013). The protective effect of multicomponent herbal collection on the morphology of some internal organs and lipid peroxidation during immobilization stress [Protektornoe vliyaniye mnogokomponentnogo rastitel'nogo sbora na morfologiyu nekotorykh vnutrennikh organov i protsessy perekisnogo okisleniya lipidov pri immobilizatsionom stresse]. *Nauchnye vedomosti BelGU*, 4 (21), 229–233.
- Максименко А.В., Ваваев А.В. Современные антиоксиданты следующий этап фармакологического противостояния окислительному стрессу // Молекулярная медицина. – 2010. – № 2. – С. 9–14.
- Maksimenko AV, Wawaev AV (2010). Modern pharmacological antioxidants next stage of confrontation oxidative stress [Sovremennye antioksidanty sleduyushchii etap farmakologicheskogo protivostoyaniya oksislitel'nomu stressu]. *Molekulyarnaya meditsina*, 2, 9–14.
- Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – 364 с.
- Menshikov VV (1987). Laboratory methods of studies in the clinic [Laboratornye metody issledovaniya v klinike], 364.
- Нестеров Ю.В., Теплый Д.Л., Алтуфьев Ю.В., Егоров М.А. и др. Стресс-реактивность разновозрастных беспородных белых крыс на модели острого эмоционально-болевого стресса // Естественные науки. – 2012. – № 1. – С. 156–160.
- Nesterov Y, Warm DL, Altufey YV, Egorov MA et al. (2012). Stress reactivity outbred albino rats of different ages on the model of acute emotional pain stress [Stress-reaktivnost' raznovozrastnykh besporodnykh belykh krys na modeli ostrogo emotsional'no-bolevogo stressa]. *Estestvennye nauki*, 1, 156–160.
- Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М., 2000. – 236 с.
- Sergienko VI, Bondarev IB (2000). Mathematical statistics in clinical trials [Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh], 236.
- Петров В.И., Седова Н.Н. Практическая биоэтика: этические комитеты в России. – М.: Триумф, 2002. – 192 с.

Petrov VI, Sedov NN (2002). Practical Bioethics: ethical committees in Russia [Prakticheskaya bioetika: eticheskie komitety v Rossii], 192.

10. Шантанова Л.Н., Кохан С.Т., Патеюк А.В. Коррекция иммуносупрессивного состояния фитосредством «Арура-Тан № 7» в эксперименте // Российский аллергологический журнал. – 2013. – № 2, Ч. 2. – С. 318–320.

Shantanova LN, Kokhan ST, Pateyuk AV (2013). Correction of an immunosuppressive state fitosredstv «Arur Tan N 7» in the experiment [Korreksiya immunosupres-

sivnogo sostoyaniya fitosredstvom «Arura-Tan №7» v eksperimente]. *Rossiiskii allergologicheskii zhurnal*, 2 (2), 318-320.

11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд., перераб. и доп. // под общей ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 455 с.

Habrieu RW (ed.) (2005). Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv], 455.

Сведения об авторах Information about the authors

Кохан Сергей Тихонович – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий научно-образовательным центром «Экология и здоровье человека» Забайкальского государственного университета (672039, г. Чита, ул. Александрo-Заводская, 30; тел.: 8 (3022) 44-14-97, 89144562454; e-mail: ispsmed@mail.ru)

Kokhan Sergey Tikhonovich – Candidate of Medical Sciences, Docent, Head of the Scientific and Educational Center "Ecology and Human Health" of Transbaikal State University (672039, Chita, ul. Aleksandro-Zavodskaya, 30; tel.: +7 (3022) 44-14-97, 89144562454; e-mail: ispsmed@mail.ru)

Патеюк Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник научно-образовательного центра «Экология и здоровье человека» Забайкальского государственного университета (e-mail: pateykand@yandex.ru)

Pateyuk Andrey Vladimirovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Scientific and Educational Center "Ecology and Human Health" of Transbaikal State University (e-mail: pateykand@yandex.ru)

Кривошеева Евгения Михайловна – кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник научно-образовательного центра «Экология и здоровье человека» Забайкальского государственного университета

Krivosheeva Yevgenia Mikhaylovna – Candidate of Medical Sciences, Docent, Senior Research Officer of the Scientific and Educational Center "Ecology and Human Health" of Transbaikal State University