

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО АДАПТОГЕННОГО СРЕДСТВА «КАРДЕКАИМ» НА ФОНЕ ОСТРОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Э. А. Алексеева¹, О. Г. Димитров³, Л. Н. Шантанова³,
С. М. Николаев³, Е. Н. Карева^{4, 5}, И. Ю. Малышев²

Изучены адаптогенные свойства растительного средства «Кардекаим», представляющего собой сухой экстракт из сырья *Inula helenium* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Elletaria cardamomum* (L.) Maton., *Caragana spinosa* (L.) Wall. ex Hornem. и содержащего в качестве действующих веществ фенольные соединения и терпеноиды. Курсовое превентивное введение кардекаима в дозе 100 мг/кг в течение 7 дней перед острым эмоциональным стрессом оказывает выраженное стресс-протективное действие, препятствуя развитию признаков «триады Селье»: инволюции вилочковой железы (40 %), язвенным повреждениям слизистой оболочки желудка (в 5 раз) и в меньшей степени — гипертрофии надпочечников ($p \leq 0,05$), полученный эффект не уступает препарату сравнения — экстракту элеутерококка. Показано, что повышение резистентности к стрессу под влиянием кардекаима сопровождается активацией синтеза белков теплового шока (Hsp-70), не связанной со стресс-индуцированной генерацией NO.

Ключевые слова: растительные адаптогены; эмоциональный стресс; белки теплового шока; система NO.

ВВЕДЕНИЕ

Адаптогены — фармакологические средства, повышающие неспецифическую резистентность организма к воздействию стрессоров различной природы: физической, биологической, химической и психоэмоциональной, увеличивающие работоспособность, выносливость, предотвращающие развитие утомления [10, 13]. В настоящее время во всем мире отмечается растущий интерес к стресс-протективным средствам природного происхождения. Известно, что фармакологическая активность растительных адаптогенов связана с ограничением гиперактивации центральных стресс-реализующих систем: симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой. Исследования последних лет показали, что одним из механизмов стресс-протективного действия адаптогенов является активация синтеза молекулярных шаперонов (белков теплового шока) Hsp70 и др., сами Hsp могут быть отнесены к факторам стресс-лимитирующей системы организма [12, 15], а их содержание может являться критерием оценки адаптогенной активности лекарственных растений [8]. Одним из факторов, играющих важную роль в активации экспрессии генов Hsp, является NO. Существует гипотеза, согласно которой NO и Hsp70 образуют единую эндогенную протекторную систему [6]. Показано, что при адаптации организма к таким факторам среды, как ги-

поксия, стресс и физическая нагрузка, синтез Hsp 70 активируется под влиянием NO [5]. В то же время имеются данные о том, что стресс-индуцированная генерация NO ингибирует митохондриальное дыхание, ингибируя цитохром P-450 и гликолиз, что приводит к истощению энергетических ресурсов, нарушению функций белков, развитию утомления и повреждению клеточных структур [15]. В соответствии с вышеизложенным представляется интересным выяснить роль NO и индукции Hsp70 в реализации стресс-протективной активности комплексного растительного адаптогена кардекаима, разработанного на основе тибетской рецептурной прописи, описанной в рецептурном сборнике «Кунпан-дудзи» [7]. Кардекаим обладает выраженной адаптогенной активностью, повышая неспецифическую резистентность организма к действию экстремальных факторов различной природы [2].

Целью настоящего исследования явилось определение роли индукции Hsp-70 и генерации NO в стресс-протективном действии растительного адаптогенного средства кардекаим.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кардекаим представляет собой сухой экстракт, полученный из 4 видов растительного сырья: корневищ *Inula helenium* L., *Zingiber officinale* Roscoe, плодов *Elletaria cardamomum* (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. До-

¹ ФГБОУ «Бурятский государственный университет», Россия, Улан-Удэ, ул. Смолина.

² ГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Россия, Москва.

³ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН», Россия, Улан-Удэ.

⁴ РНИМУ им Н. И. Пирогова, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

⁵ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая ул., 8, стр. 2.

Таблица 1. Влияние кардекаима на выраженность признаков “триады Селье” при остром эмоциональном стрессе ($M \pm m$)

Группа животных	n	Относительный вес, мг/100 г массы		Количество разрушений в слизистой желудка на 1 животное
		надпочечников	тимуса	
Интактная (дистиллированная вода)	6	17,39 ± 0,83	242,61 ± 9,18	0,0
Интактная (кардекаим)	6	17,15 ± 1,12	221,12 ± 21,5	0,0
Контрольная 1 (стресс)	6	22,05 ± 1,42*	173,44 ± 19,53*	3,16 ± 0,52*
Опытная 1 (стресс + кардекаим)	6	19,63 ± 1,14**	213,18 ± 18,12**	1,30 ± 0,73**
Опытная 2 (стресс + элеутерококк)	6	20,37 ± 2,19**	234,67 ± 23,77**	1,18 ± 0,10**

Здесь и далее: * $p < 0,05$ по сравнению с интактом (дистиллированная вода); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем; n — число животных.

минирующими группами БАВ являются фенольные соединения и летучие терпеноиды. Общее содержание фенольных соединений в фитомиксе составляет 1,51 %, а флавоноидов — 0,56 %. В составе фенольных соединений установлено наличие представителей групп фенилпропаноидов, флавоноидов и арилгептаноидов. Основными фенилпропаноидами являются 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (90,06 мкг/мл), кофейная кислота (86,32 мкг/мл) и 1,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (77,44 мкг/мл). В составе флавоноидов преобладают маркерные компоненты 3-*O*-рутинозиды кверцетина (рутин; 186,16 мкг/мл) и изорамнетина (нарциссин; 157,96 мкг/мл) [9]. Стандартизацию сухого экстракта осуществляют с применением метода ВЭЖХ-УФ по содержанию рутина, нарциссина, шогоалов [6, 8]. Соединения детектировали при следующих длинах волн: 280 нм (шогоалы), 330 нм (фенилпропаноиды), 350 нм (флавоноиды) [3].

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Wistar массой 160 – 180 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 МЗ РФ № 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. Модель острого эмоционального стресса воспроизводили методом водной иммерсии путем однократного помещения животных в клетку с водой (22 °С) на 30 мин и 4 ч [11]. Животным опытной группы 1 превентивно в течение 7 дней до стрессорного воздействия внутрижелудочно

вводили водный раствор кардекаима в дозе 100 мг/кг за 1 ч до кормления (доза, проявляющая оптимальный фармакотерапевтический эффект, установлена опытным путем). Последнее введение испытуемого вещества осуществляли за 1 ч до стрессорного воздействия. Животным опытной группы 2 вводили препарат сравнения — деалкоголизированный экстракт элеутерококка в объеме 5 мл/кг по аналогичной схеме. Животные интактной группы получали эквивалентное количество дистиллированной воды в течение 7 дней. Последнее введение дистиллированной воды осуществляли за 4 ч до забоя. Контрольной группе аналогично вводили дистиллированную воду. Последнее введение дистиллированной воды осуществляли за 1 ч до стрессорного воздействия. Интактной группе 2 внутрижелудочно вводили раствор кардекаима в течение 7 дней. Последнее введение раствора осуществляли за 4 ч до забоя. Вводимый объем 1 мл на 100 г массы. Через 2 ч после стрессорного воздействия животных декапитировали под легким эфирным наркозом и определяли выраженность “триады Селье”: гипертрофию надпочечников, появление язвенных повреждений в слизистой оболочке желудка, а также определяли массу вилочковой железы, который затем замораживали и хранили в замороженном виде при – 70 °С до электрофореза. Лейкоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в термостате при 37 °С в течение 7 ч: через 1 ч после начала инкубации часть лейкоцитов подвергали воздействию теплового шока (1-часовой прогрев в термостате при 42 °С), затем продолжали инкубировать при 37 °С. Оценивали синтез Hsp-70 в тимусе и лейкоцитах (индуцированный тепловым шоком) методом Вестерн-блот анализа с использованием антител к Hsp-70, реактивов и оборудования фирмы “Bio-Rad” (USA). Базальный уровень Hsp-70 в лейкоцитах не определяли. Количественную обработку полученных иммуноблотов проводили с

Таблица 2. Влияние кардекаима на базальную концентрацию Hsp70 в тимусе и индуцированный тепловым шоком синтез Hsp70 в лейкоцитах; ОДЕ ($M \pm SD$)

Группа	Содержание Hsp-70	
	в тимусе	в лейкоцитах после теплового шока
Интактная (дистиллированная вода)	5,55 ± 0,55	0,67 ± 0,04
Интактная (кардекаим)	5,14 ± 0,54	0,56 ± 0,03
Контрольная (стресс)	4,88 ± 0,58	2,99 ± 1,32*
Опытная 1 (стресс + кардекаим)	9,80 ± 1,16**	1,00 ± 0,16**

помощью компьютерной программы Photoshop. Активность системы NO оценивали по концентрации метаболитов NO нитратов/нитритов с использованием специального редулятора для восстановления нитратов до нитритов [4]. Концентрацию нитритов оценивали с помощью реакции Грисса с последующим спектрофотометрическим анализом. Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Достоверность различий 2 выборок проводили с использованием *U* критерия Манна — Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных в табл. 1, курсовое профилактическое введение кардекаима в дозе 100 мг/кг оказывает стресс-протективное действие, задерживая развитие признаков “триады Селье”. Об этом свидетельствует уменьшение степени гипертрофии надпочечников на 11 %; достоверное увеличение относительной массы вилочковой железы — на 23 % по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. Кроме того, введение испытуемого средства задерживает развитие геморрагически-язвенных дефектов в слизистой оболочке желудка белых крыс. Так, у животных опытной группы 1 имелись лишь единичные эрозии, тогда как у животных контрольной группы повреждений было почти в 2,5 раза больше. При этом стресс-протективное действие кардекаима не уступало препарату сравнения — экстракту элеутерококка.

Установлено, что острое стрессорное воздействие вызывало незначительное снижение базального уровня Hsp70 в вилочковой железе крыс контрольной группы по сравнению с таковым intactных животных (табл. 2). В то же время уровень Hsp70 в лейкоцитах, индуцированных тепловым шоком, резко повышался (в 4,5 раза по сравнению с контролем).

Как следует из табл. 2, курсовое введение кардекаима intactным животным не оказывает влияния на уровень Hsp70 в вилочковой железе, в то же время введение кардекаима при стрессорном воздействии значительно повышает его содержание на 56 %, по сравнению с данными контрольной группы. Содержание Hsp-70 в лейкоцитах после теплового шока животных intactной группы, получавших кардекаим, имеет некоторую тенденцию к снижению. Тогда как у животных опытной группы 1 данный показатель снизился почти в 3 раза по сравнению с данными крыс контрольной

группы. Таким образом, экспериментально установлены различия в отношении индукции Hsp-70 под влиянием кардекаима *in vivo* и *in vitro*. Это, по-видимому, означает, что механизм стресс-протективного эффекта кардекаима реализуется на уровне организма в целом, а уровень Hsp70 в лейкоцитах, индуцированных тепловым шоком *in vitro*, не всегда изменяется строго параллельно уровню Hsp-70 в организме. Эти данные требуют дальнейшего изучения.

Как следует из результатов, представленных в табл. 3, стрессорное воздействие сопровождалось активацией системы NO, о чем свидетельствует повышение концентрации метаболитов NO в плазме крови на 48 % по сравнению с данными intactных животных. По мнению некоторых авторов [13], стресс-индуцированная генерация NO ингибирует митохондриальное дыхание, блокирует окислительное фосфорилирование и, тем самым, вызывает развитие стадии истощения стресса. Установлено, что курсовое введение кардекаима на фоне острого эмоционального стресса препятствовало активации данной системы, концентрация метаболитов NO в плазме крови соответствовала их физиологическому уровню. При этом показано, что введение кардекаима intactным животным сопровождалось выраженной активацией системы NO, концентрация нитратов/нитритов была на 66 % выше, чем у intactных крыс. Можно предположить, что введение кардекаима по своему влиянию на систему NO аналогично действию стрессорного фактора.

Таким образом, курсовое превентивное введение кардекаима на фоне острого эмоционального стресса оказывает выраженное стресс-протективное действие, препятствуя развитию признаков “триады Селье”. При этом его эффект не уступает препарату сравнения — экстракту элеутерококка. Эффекты адаптогенов, таких как родиола розовая, элеутерококк, связывают с присутствием в них фенольных соединений, фенилпропаноидов, таких как салидрозид, розавин, элеутерозид E, шизандрин B, имеющих сходную химическую структуру с катехоламинами — медиаторами симпато-адреналовой системы, а также с тетрациклическими тритерпеноидами и фитостерол-гликозидами (элеутерозид A), имеющими структурное сходство с глюкокортикоستيоидами, стресс-реализующими гормонами [13]. Кроме того, монотерпеновые гликозиды, выделенные из родиолы розовой, ингибируют моноаминоксидазы A и B. Таким образом можно предположить, что стресс-протективный эффект кардекаима обусловлен присутствием фенилпропаноидов, фенилалканолов, моно- и сесквитерпеноидов в растительном экстракте.

Показано, что повышение резистентности к эмоциональному стрессу на фоне курсового введения кардекаима сопровождается выраженной активацией у животных экспрессии Hsp-70, которые, как известно, являются шаперонами, способными ограничивать стрессорные повреждения за счет ренатурации белков, поврежденных в результате стресса, дезагрегации аномальных белковых молекул, участия в утилизации поврежденных белков и увеличения мощности антиокси-

Таблица 3. Влияние кардекаима на состояние системы NO в плазме крови при остром стрессорном воздействии ($M \pm SD$)

Группа	Концентрация метаболитов NO (нитратов и нитритов), мкмоль/л
Intactная ($n = 6$)	35,5 \pm 3,43
Опытная 1 (кардекаим) ($n = 6$)	58,3 \pm 6,23*
Контрольная ($n = 6$)	52,06 \pm 5,06*
Опытная 2 (стресс + кардекаим) ($n = 6$)	32,29 \pm 3,36**

дантных систем [1, 12]. Мы предполагаем, что активация экспрессии Hsp-70 в клетках является одним из механизмов реализации стресс-протективного действия указанного фитоадаптогена. Установлено также, что введение испытуемого фитосредства на фоне стрессорного воздействия предупреждало стресс-индуцированную генерацию NO. Ранее аналогичные результаты получены для растительного адаптогена АДАРТ-232 форте, содержащего экстракты элеутерококка колючего, шизандры китайской и родиолы розовой, на модели с физической нагрузкой и эмоционального стресса [12]. Кроме того, моноэкстракты этих растений и еще ряд растительных адаптогенов продемонстрировали значительную стимуляцию экспрессии Hsp-70 на модели глиальных клеток *in vitro* [8], в связи с чем выдвинуто предположение о том, что активация экспрессии белков теплового шока является ключевым моментом в механизме действия адаптогенов. Можно полагать, что молекулярно-клеточный механизм стресс-протективного действия кардекайма обусловлен наличием в его составе фенилпропаноидов, флавоноидов и арилгептаноидов, активирующих экспрессию Hsp-70 [8, 12].

ВЫВОДЫ

1. Курсовое профилактическое введение кардекайма (100 мг/кг, 7 дней) перед острым эмоциональным стрессом оказывает выраженное стресс-протективное действие, препятствуя развитию признаков “триады Селье” (11 – 23 %, в 2,5 раза) ($p \leq 0,05$).

2. Стресс-протективный эффект кардекайма не уступает препарату сравнения — экстракту элеутерококка.

3. Повышение резистентности к эмоциональному стрессу на фоне курсового введения кардекайма сопровождается активацией у животных экспрессии Hsp-70 на 56 % ($p \leq 0,05$), что выявляется в условиях *in vivo*, но не *in vitro*.

4. Концентрация метаболитов NO в плазме крови стрессированных животных на фоне введения карде-

кайма снижалась до физиологического уровня. Введение кардекайма интактным животным сопровождалось выраженной активацией системы NO (на 66 %) ($p \leq 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. И. Андреева, А. А. Бойкова, Б. А. Маргулис, *Естествознание и гуманизм*, **3**(4), 12 – 15 (2006).
2. Е. Я. Каплан, О. Д. Цыренжапова, Л. Н. Шантанова, *Оптимизация адаптивных реакций организма*, Москва (1990).
3. Н. И. Кашенко, Д. Н. Оленников, *Бутлеровские сообщения*, **36**(12), 66 – 74 (2013).
4. С. В. Круглов, В. Г. Амелин, Н. П. Ларионов, *Официальный бюл. Изобрет. Полезные приспособления*, Патент РФ № 2161303 от 27.12. 2000, № 36 (2000).
5. И. Ю. Мальшев, Е. Б. Манухина, *Биохимия*, **63**(7), 992 – 1006 (1998).
6. М. Г. Пшеничкова, О. М. Зеленина, С. В. Круглов и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **142**(12), 614 – 617 (2006).
7. Сумаги Праждня, Кунпан-Дудзи, *Большой рецептурный справочник Агинского дацана*, пер. с тибет. яз. Д. Б. Дашиева, Москва (2008).
8. А. Asea, P. Kaur, A. Panossian., K. G. Wikman, *Phytomedicine*, No 20, 1323 – 1329 (2013).
9. D. N. Olennikov, V. V. Partilkhaev, *J. Planar Chromatogr., Modern TLC.*, **25**(1), 30 – 35 (2012).
10. E. M. D. Olsson, B. von Scheele., A. G. Pannossian, *Planta Med.*, **75**, 105 – 112 (2009).
11. J. Overmier, R. Murison, H. Ursin, *Behav. Neural. Biol.*, **46**, 372 – 386 (1986).
12. A. Panossian, G. Wikman, P. Kaur, A. Asea, *Phytomedicine*, № 16, 617 – 622 (2009).
13. A. Panossian, G. Wikman, *Pharmaceuticals*, № 3, 188 – 224 (2010).
14. E. K. Park, Y. W. Shin, H. U. Lee, et al., *Biol. Pharm. Bul.*, № 28, 652 – 666 (2005).
15. F. A. Wiegant, S. Surinova, E. Ytsma, *Biogerontology*, № 10, 27 – 42 (2009).

Поступила 07.09.16

MOLECULAR AND CELL MECHANISMS OF THE STRESS-PROTECTIVE ACTIVITY OF ADAPTOGENIC PHYTOPREPARATION KARDECAIM ON THE BACKGROUND OF EMOTIONAL STRESS

E. A. Alekseeva¹, I. Yu. Malyshev², L. N. Shantanova³, S. M. Nikolaev³, and E. N. Kareva^{4,5}

¹ Buryat State University, ul. Smolina 24a, Ulan-Ude, Buryatiya, 670000 Russia

² Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

³ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Sakhyanovoi 6, Ulan-Ude, Buryatiya, 670047 Russia

⁴ N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

⁵ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

We have studied the adaptogenic properties of Kardecaim phytopreparation based on dry extracts derived from *Inula helenium* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Elletaria cardamomum* (L.) Maton., and *Caragana spinose* (L.) Wall. ex Hornem, which contain phenolic compounds and terpenoids. A course of preventive administration of Kardecaim to white rats in a dose of 100 mg/kg for 7 days before the induction of acute emotional stress produced stress-protective effect by preventing the development of catabolic signs of Selye's triad in animal inner organs, including the thymus involution (40% lower than in control); degree of hemorrhagic and ulcerative defects in the stomach mucosa (5 times less than reference gastroprotector effect), and somewhat less pronounced effect on the stress-induced hypertrophy of adrenal glands, yet comparable to the effect of reference preparation (eleutherococcus extract). It was shown that the increase in the resistance to stress under the action of Kardecaim was due to the activation of synthesis of heat shock proteins (Hsp). The Hsp-70 content in the thymus of white rats undergoing emotional stress was 56% higher than in the control. The introduction of Kardecaim to intact animals had no effect on the basal level of Hsp-70. It was established that the expression of Hsp under the drug action was not connected with NO system, since the administration of Kardecaim on the background of stress impact was followed by a decrease in the NO metabolite yield.

Keywords: plant based adaptogens; emotional stress; heat shock proteins; NO system.