

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *CALENDULA OFFICINALIS* НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ

А. А. Торопова^{1, 2}, Н. С. Бадмаев¹, Я. Г. Разуваева^{1, 2}, С. М. Николаев^{1, 2},
З. Г. Самбуева¹, А. Ю. Ерентуева²

Проведено исследование гепатопротекторных свойств экстракта сухого *Calendula officinalis* L. на экспериментальной модели острого токсического гепатита, вызванного введением четыреххлористого углерода. Показано, что экстракт *C. officinalis* при внутривенном введении в дозе 100 мг/кг в течение 13 дней снижает выраженность окислительного стресса, повышая активность каталазы, супероксиддисмутазы и содержание восстановленного глутатиона. Исследуемое фитосредство способствует увеличению активности глутатионпероксидазы на 15 % ($p \leq 0,05$) и глутатионредуктазы на 39 % в ткани печени крыс относительно контроля ($p \leq 0,05$), а также снижает содержание малонового диальдегида на 28 % ($p \leq 0,05$). Установлено, что экстракт *C. officinalis* положительно влияет на энергетический обмен в гепатоцитах, что отражается на повышении содержания АТФ на 28 % ($p \leq 0,05$), снижении содержания лактата на 31 % ($p \leq 0,05$) и нормализации соотношения лактат/пируват в ткани печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом. Полученные результаты позволяют рекомендовать экстракт сухой *C. officinalis* для дальнейших исследований в качестве перспективного растительного гепатопротекторного средства.

Ключевые слова: *Calendula officinalis*; гепатит; оксидативный стресс; гепатопротекторное действие; энергетический обмен, крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Calendula officinalis L., тибет. *гур-гум худший (gurgum dman-ba)* — однолетнее травянистое растение семейства *Asteraceae*, широко используемое в традиционной тибетской медицине в качестве антисептического, противовоспалительного, нейропротекторного и желчегонного средства [1, 11, 13, 14]. Экспериментальными исследованиями в условиях *in vitro* показано, что экстракт *C. officinalis* обладает антиоксидантной активностью [12, 17, 19], а также фенольные соединения, выделенные из *C. officinalis* в условиях *in vivo*, оказывают благоприятное гепатопротекторное действие при хроническом гепатите у белых крыс [7]. Изложенное выше послужило основанием для изучения механизмов гепатопротекторных свойств экстракта *C. officinalis* при остром экспериментальном токсическом поражении печени.

В Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН разработан новый способ получения экстрак-

та *C. officinalis*, при котором отмечается более “полный выход” биологически активных веществ [15].

Целью исследования явилась оценка влияния экстракта *C. officinalis* на антиоксидантный и энергетический статус ткани печени при экспериментальном токсическом гепатите.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сухой экстракт получен в результате экстракции цветков *C. officinalis* спиртом этиловым (50 – 90 %) с последующим фильтрованием, концентрированием и сушкой. Стандартизацию экстракта проводили методом ВЭЖХ по флавоноидам, содержание которых не менее 4 %. В исследуемом сухом экстракте было установлено присутствие различных классов соединений, таких как каротиноиды (антраксантин, виолаксантин, α -каротин, β -каротин, (9Z)-неоксантин); тритерпеноиды (α -амирин, β -амирин, олеаноловая кислота, гелианол); фенольные соединения — авикулярин, изорамнетин-3-О-глюкозид, изорамнетин-3-(2"-рамнозил)-рамнозид, календофлавобиозид, мангаслин, нарциссин, рутин, кверцетин, тифанезид, в том числе новые природные соединения — изорамнетин-3-О-(2"-аце-

¹ ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Россия, 670047, Улан-Удэ.

² ГБОУ ДПО Бурятский государственный университет, Россия, 670000, Улан-Удэ.

тил)-β-D-глюкопиранозид и изорамнетин-3-O-(2",6"-диацетил)-β-D-глюкопиранозид [15].

Экспериментальные исследования выполнены на 26 крысах-самцах Вистар с исходной массой 180–200 г. Содержание животных соответствовало “Правилам лабораторной практики” (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. “Об утверждении правил лабораторной практики”. Перед началом экспериментов животных, отвечающих критериям включения в эксперимент, распределяли на группы с учетом принципа рандомизации. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.), “Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных” (Страсбург, 1986). Протокол исследования согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол № 3 от 07.02.2013).

Животных разделили на 3 группы: интактная, контрольная, опытная. Для моделирования острого токсического гепатита использовали органоспецифический токсин — четыреххлористый углерод (CCl₄), который вводили животным контрольной и опытной групп в виде 50 % масляного раствора подкожно в течение 4 дней в дозе 1 мл/кг [9].

Предварительно было изучено влияние полученного экстракта *C. officinalis* на холеретическую реакцию у интактных белых крыс при введении *per os* в дозах 50, 100, 150 и 200 мг/кг. Установлено, что наиболее выраженный холеретический эффект обеспечивается при введении животным экстракта в дозах 100, 150 и 200 мг/кг. При этом применение экстракта в дозах 150 и 200 мг/кг значимых преимуществ по скорости секреции желчи и количеству выделенных желчных кислот не имело. На этом основании в последующих экспериментах использовали экстракт сухой в дозе 100 мг/кг, который вводили внутрижелудочно животным опытной группы в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг, начиная со 2 дня эксперимента, в течение 13 дней. Животные интактной и контрольной групп полу-

чали воду очищенную. На 14 сут эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом и проводили оценку антиоксидантного и энергетического статуса печени. Определяли содержание АТФ, лактата и пирувата в гомогенате исследуемого органа [6]. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) в гомогенате печени [9]. О состоянии антиоксидантной системы судили по активности каталазы [3], глутатионпероксидазы (ГП) [6], глутатионредуктазы (ГР) [16] и содержанию восстановленного глутатиона (GSH) [18] в гомогенате печени, а также по активности супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах [5]. Количественное содержание белка в гомогенате печени определяли методом Бредфорда. В ходе пробоподготовки были использованы высокоскоростная центрифуга Avanti J-301 (Beckman Coulter, USA), Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA). Количественное определение исследуемых показателей проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия).

Значимость различий указанных параметров между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при помощи пакета статистических программ Microsoft Exel 2006. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных на фоне введения CCl₄ отмечается развитие окислительного стресса, интенсификация свободно-радикального окисления и угнетение антиоксидантной системы организма, что согласуется с данными литературы [4]. Так, в ткани печени животных с экспериментальным гепатитом повышено содержание МДА в 1,7 раза, по сравнению с интактными животными (табл. 1). Наблюдается угнетение компонентов эндогенной антиоксидантной системы: активность каталазы, СОД и содержание GSH снижены на 37, 43 и

Таблица 1. Влияние экстракта *C. officinalis* (100 мг/кг) при введении внутрь 1 раз в сутки в течение 13 дней на состояние антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления липидов в печени белых крыс при остром токсическом гепатите ($M \pm m$)

Показатель, ед. измерения	Группа животных		
	интакт (H ₂ O) <i>n</i> = 8	контроль (CCl ₄ + H ₂ O) <i>n</i> = 9	опыт (CCl ₄ + <i>C. officinalis</i>) <i>n</i> = 9
МДА, мкмоль/г ткани	4,1 ± 0,2	7,2 ± 0,2*	5,2 ± 0,3**
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мин/г ткани	101,5 ± 5,4	63,6 ± 4,8*	77,5 ± 4,5**
СОД в эритроцитах, усл. ед.	3,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1*	2,3 ± 0,1**
GSH, мкмоль/мг белка	124,2 ± 6,5	91,2 ± 4,9*	114,0 ± 9,3**
Глутатионпероксидаза, мкмоль НАДФН/мин/мг белка	84,2 ± 4,2	69,8 ± 5,1*	80,7 ± 4,1**
Глутатионредуктаза, нмоль НАДФН/мин/мг белка	21,3 ± 1,1	11,1 ± 0,9*	15,5 ± 1,0**

Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы, по сравнению с данными:

* интактной группы животных; ** — контрольной группы животных при $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Влияние экстракта *C. officinalis* (100 мг/кг) при введении внутрь 1 раз в сутки в течение 13 дней на энергетический метаболизм в печени белых крыс при остром токсическом гепатите ($M \pm m$)

Показатель, ед. измерения	Группа животных		
	интакт (H_2O) $n = 8$	контроль ($CCl_4 + H_2O$) $n = 9$	опыт ($CCl_4 + C. officinalis$) $n = 9$
АТФ, мкмоль/г ткани	4,3 ± 0,3	2,5 ± 0,2*	3,2 ± 0,1**
Лактат, мкмоль/г ткани	2,1 ± 0,1	6,2 ± 0,3*	4,3 ± 0,2**
Пируват, мкмоль/г ткани	0,31 ± 0,02	0,24 ± 0,01*	0,22 ± 0,02**
Лактат/пируват	6,9 ± 0,4	26,1 ± 1,1*	19,4 ± 0,8**

27 %, активность ГП и ГР — в 1,2 и 1,9 раза, соответственно, по сравнению с интактом, $p \leq 0,05$.

Развивающийся на фоне интоксикации дисбаланс между про- и антиоксидантными системами сопровождается разобщением процессов окисления и фосфорилирования, что отразилось на снижении содержания АТФ в 1,7 раза в ткани печени, по сравнению с аналогичным показателем у животных интактной группы (табл. 2). Кроме того, выявлено повышенное содержание лактата в 2,9 раза по сравнению с интактом. При этом отношение лактат/пируват при использовании гепатотоксиканта возросло в 3,8 раза, что указывает на дисбаланс между анаэробным и аэробным метаболизмом. Изменение указанного равновесия в сторону лактата свидетельствует о переходе клеток ткани на анаэробный гликолиз, что может способствовать снижению рН среды, оказывать ингибирующее действие на фосфофруктокиназу и глицеральдегид-3-фосфатдегидрагеназу, разобщать процессы дыхания и фосфорилирования, а также ингибировать креатинкиназу. Вместе с тем содержание пирувата изменялось незначительно, что характеризует его как нестабильное соединение, участвующее во многих метаболических процессах живой клетки [2].

Установлено, что курсовое введение экстракта *C. officinalis* в дозе 100 мг/кг, оказывает положительное влияние на состояние антиоксидантной системы и способствует снижению выраженности окислительного стресса, вызванного введением CCl_4 (табл. 1). Содержание МДА уменьшалось на 28 %, активность каталазы и СОД повышалась в среднем на 21 % по отношению к контролю, $p \leq 0,05$. Кроме того, отмечена коррекция глутатионового звена антиоксидантной защиты организма, что выражалось в повышении содержания GSH на 25 % и увеличении активности ГП и ГР на 15 и 39 %, соответственно, по сравнению с данными животных контрольной группы.

Экстракт *C. officinalis* снижает негативное воздействие CCl_4 на энергетический обмен в печени (табл. 2). Содержание АТФ повышалось на 28 %, концентрация лактата снижалась на 31 %, по сравнению с аналогичными показателями у крыс контрольной группы, $p \leq 0,05$. Соотношение лактат/пируват в опытной группе животных снизилось в 1,3 раза и составило 19/1 против 26/1 для контрольной группы животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии у экстракта сухого *C. officinalis* антиоксидантных свойств в условиях острого токсического поражения печени, что способствует восстановлению редокс-статуса, а также препятствует реализации более глубокого повреждения клеточных структур органа реакционноспособными продуктами метаболизма CCl_4 . Кроме того, исследуемое средство обладает способностью восстанавливать и поддерживать энергетический обмен в печени, вероятно, за счет “разгрузки” дыхательной цепи и НАД-зависимых дегидрогеназ гепатоцитов от избытка электронов [10]. Восстановление системы ресинтеза АТФ на фоне введения экстракта *C. officinalis* обусловлено его способностью повышать активность антиоксидантной системы организма за счет широкого комплекса биологически активных веществ, содержащихся в его составе [2, 8, 12, 14].

ВЫВОДЫ

1. Экстракт сухой *Calendula officinalis* в дозе 100 мг/кг при введении 1 раз в сутки в течение 13 дней оказывает антиоксидантное действие в условиях острого токсического поражения печени, снижая интенсивность развития окислительного стресса, корректируя дисбаланс между про- и антиоксидантными системами: содержание МДА снижает на 28 %, активность каталазы, СОД и содержание GSH повышает в среднем на 23 %; активность ГП и ГР возрастает на 15 и 39 %, $p \leq 0,05$.

2. Исследуемый экстракт при остром токсическом поражении печени увеличивает в ткани печени содержание АТФ на 28 %, снижает концентрацию лактата на 31 %, а соотношение лактат/пируват уменьшает в 1,3 раза, $p \leq 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Асеева, Н. А. Кузнецова, Л. В. Михневич и др., *Болезни органов пищеварения: симптоматика и лечение (по материалам тибетских медицинских сочинений XII – XVII вв.)*, Наука, Новосибирск (2016).
2. В. А. Кашуро, В. Б. Долго-Сабуров, В. А. Башарин и др., *Medline*, **11**, 611 – 634 (2010).
3. М. А. Корольюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др., *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
4. В. А. Куркин, О. Л. Кулагин, Н. С. Додонов и др., *Растит. ресурсы*, **44**(1), 122 – 130 (2008).

5. Е. В. Макаренко, *Лаб. дело*, № 11, 48 – 50 (1988).
6. *Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен*, М. И. Прохорова (ред.), Ленинград (1982).
7. С. М. Николаев, *Растительные лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы*, Наука, Новосибирск (1992).
8. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, В. П. Фисенко (ред.), ИИА “Ремедиум”, Москва (2000), сс. 228 – 231.
9. И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили, *Современные методы в биохимии*, Москва (1977), сс. 66 – 68.
10. В. А. Хазанов, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **72**(4), 61 – 64 (2009).
11. М. Asadi-Samani, N. Kafash-Farkhad, N. Azimi, et al., *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **5**(2), 146 – 157 (2015).
12. P. C. Braga, M. Dal Sasso, M. Culici, et al., *Pharmacol.*, **83**(6), 348 – 355 (2009).
13. H. Z. Huo, B. Wang, Y. K. Liang, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **12**(10), 6529 – 6543 (2011).
14. M. U. Khan, A. Rohilla, D. Bhatt, et al., *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.*, **3**, 173 – 177 (2011).
15. D. N. Olennikov, N. I. Kashchenko, *Chem. Nat. Comp.*, **49**(5), 717 – 723 (2013).
16. R. E. Pinto, W. Bartley, *Biochem. J.*, **112**(1), 109 – 115 (1969).
17. K. C. Preethi, G. Kuttan, R. Kuttan, *Pharm. Biol.*, **44**(9), 691 – 697 (2006).
18. I. H. Shaik, R. Mehvar, *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**(1), 105 – 113 (2006).
19. B. D. Shivasharan, P. Nagakannan, B. S. Thippeswamy, et al., *Drug Chem. Toxicol.*, **36**(4), 466 – 473 (2013).

Поступила 27.04.17

INFLUENCE OF *CALENDULA OFFICINALIS* EXTRACT ON THE ANTIOXIDANT AND ENERGY STATUS OF LIVER IN RATS WITH EXPERIMENTAL HEPATITIS

A. A. Toropova^{1,2}, N. S. Badmaev¹, Ya. G. Razuvaeva^{1,2}, S. M. Nikolaev^{1,2}, Z. G. Sambueva¹, and A. Yu. Erentueva²

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Sakhyanova 6, Ulan-Ude, Buryat Republic, 670047 Russia

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

The hepatoprotective effect of *Calendula officinalis* L. extract was studied on the experimental model of acute toxic hepatitis induced by administration of CCl₄ in rats. Administration of the *C. officinalis* extract in a dose of 100 mg/kg (p.o.) for 13 days decreased the severity of oxidative stress by increasing the activity of key enzymes (catalase, SOD, GSH). The phytopreparation increased the activity of hepatocytic enzymes as glutathione peroxidase by 15% ($\delta < 0.05$) and glutathione reductase by 39% in the rat liver tissue (relative to control) as well as reduced the content of malondialdehyde by 28% ($\delta < 0.05$). It was also found that the extract of *C. officinalis* positively influenced the energy metabolism in hepatocytes as manifested by increasing the ATP content by 28% ($p < 0.05$), decreasing lactate level by 31% ($p < 0.05$), and normalizing lactate/pyruvate ratio in the liver tissue of rats with experimental toxic hepatitis. The obtained results allow the proposed extract of *C. officinalis* to be recommended for further investigation as a promising plant hepatoprotector.

Keywords: *Calendula officinalis*; hepatitis; oxidative stress; energy status; hepatoprotective effect; rats.