

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И В ТКАНЯХ КРЫСЫ

Л. И. Андреева, А. А. Бойкова, Д. В. Никифорова<sup>1</sup>

Воздействие различных доз густого экстракта корней и корневищ *Rhodiola rosea* с известным содержанием салидрозида, п-тирозола и розавина на мононуклеарные клетки человека в культуре и при внутрижелудочном введении крысам приводит к увеличению содержания в тканях белков стресса 70. Недельное внутрижелудочное введение экстракта родиолы вызывает увеличение содержания конститутивного белка Hsc70 в печени и увеличение количества гепатоцитов с низкой активностью сукцинатдегидрогеназы. Двухнедельное введение экстракта родиолы вызывает зависимое от дозы увеличение содержания индуцибельного (Hsp70) и конститутивного (Hsc70) белков стресса в печени, гиппокампе и левом желудочке сердца, что свидетельствует о повышении неспецифической устойчивости и активности адаптационных процессов.

**Ключевые слова:** густой экстракт корней *Rhodiola rosea*; белки стресса Hsp70 и Hsc70; крысы Вистар; сукцинатдегидрогеназа гепатоцитов; мононуклеарные клетки крови человека

#### ВВЕДЕНИЕ

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L., семейства толстянковых, *Crassulaceae*) известна как народное средство, обладающее адаптогенными свойствами, которые проявляются в тонизирующем действии на ЦНС при астении и пониженной работоспособности [7]. Воздействие на организм родиолы, как и ряда других растительных препаратов, тонизирующих ЦНС, затрагивает эндокринную регуляцию и обменные процессы, повышая адаптацию организма к неблагоприятным условиям [3]. Данная группа растительных препаратов многочисленна и при первом приближении может быть разделена на две основных подгруппы: препараты с преимущественно общетонизирующим действием и препараты с преимущественно адаптогенным действием. К первой подгруппе, например, относят препараты из лимонника, аралии, левзеи, заманихи, ко второй — родиолы розовой, элеутерококка, женьшеня [3]. Механизмы действия препаратов родиолы розовой до конца не выяснены. Показано, что родиола действует на ЦНС с вовлечением моноаминергической, н-холинергической передачи [10]. Показано также, что родиола розовая может влиять на опиоидергические процессы как в ЦНС, так и на периферии, усиливая синтез эндогенных опиоидных пептидов [6]. Задачей настоящего исследования было оценить адаптогенные свойства различных доз препарата родиолы розовой при курсовом введении крысам и при добавлении к культуре изолированных мононуклеарных клеток крови человека. В качестве критерия оценки клеточной адапта-

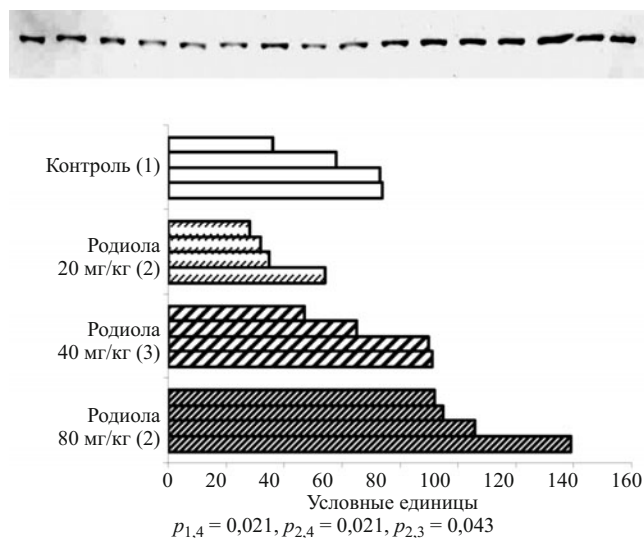
ции выступал уровень содержания в изучаемых клетках и тканях крыс конститутивного и индуцибельного белков стресса семейства 70 кДа (Hsc70 и Hsp70). В гепатоцитах крыс также определяли активность сукцинатдегидрогеназы.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали густой экстракт корней и корневищ родиолы розовой с содержанием салидрозида 1,32 %, п-тирозола 0,16 % и розавина 1,78 %, предоставленный Шведским институтом трав (Vallberga, Швеция).

**Мононуклеарные клетки крови.** Мононуклеарную фракцию клеток (моноциты и лимфоциты) выделяли из крови практически здоровых людей обоего пола в возрасте от 20 до 33 лет методом центрифугирования в градиенте фиколл-урографин. Затем клетки, полученные от каждого донора, ресуспендировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином и в количестве 2 млн/мл рассевали в чашки Петри. В среду добавляли 100 мкг/мл натриевой соли бензилпенициллина, 150 мкг/мл стрептомицина, 25 мМ NEPES, 1:10 часть сыворотки плодов коров по отношению к общему объему среды, а также по 10 мкл экстракта родиолы, разведенного таким образом, чтобы содержание препарата в среде инкубации было от 5 до 80 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 16 ч. После инкубации производили подсчет клеток в камере Горяева, а также определяли количество живых клеток с использованием трипанового синего. Далее из клеток готовили образцы для электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга (Western blotting) из расчета 100 000 клеток в 1 мкл пробы, которые хранили при –20 °С вплоть до определения содержания Hsc70 и Hsp70 [18].

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.



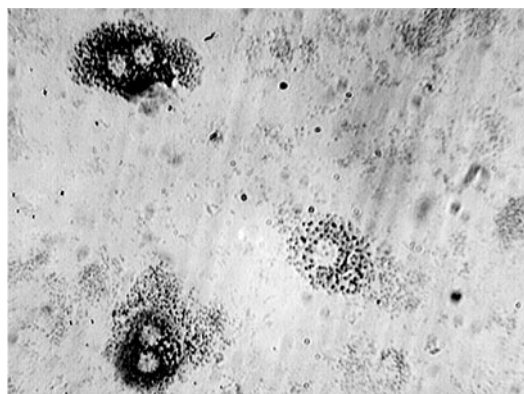
**Рис. 1.** Hsc 70 в печени крыс после 7-дневного курса родиолы.

Вверху слева направо: первые четыре пятна — контроль, далее — родиола в дозе 20 мг/кг, далее — родиола в дозе 40 мг/кг, далее родиола в дозе 80 мг/кг.

Внизу: Гистограмма после перевода изображений в числовые значения с помощью программы анализа изображений. Каждая проба (столбик на гистограмме) — одно животное.

Среды инкубации исследовали на содержание нитрит-иона с помощью реакции Грисса [13].

**Животные.** В эксперименте использовали самцов крыс Вистар массой 200 – 220 г из питомника лабораторных животных “Рапполово” РАМН (Ленинградская область). Крыс содержали в стандартных условиях вивария группами по 7 – 8 животных в клетке. Работу с животными осуществляли согласно правилам лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 2003 г.). Густой экстракт родиолы розовой разводили в воде с таким расчетом, чтобы каждое животное получало утром до кормления 20, 40 или 80 мг/кг препарата в объеме 0,4 мл. Экстракт родиолы вводили крысам утром до кормления через рот с помощью зонда. Животные получали препарат в течение 7 и 14 дней. Контрольная группа получала воду. На следующее утро после последнего введения препарата крыс усыпляли внутривенным вве-



**Рис. 2.** Гистохимическая реакция на сукцинатдегидрогеназу в гепатоцитах печени крысы. Видны гепатоциты с высокой, умеренной и низкой активностью фермента.

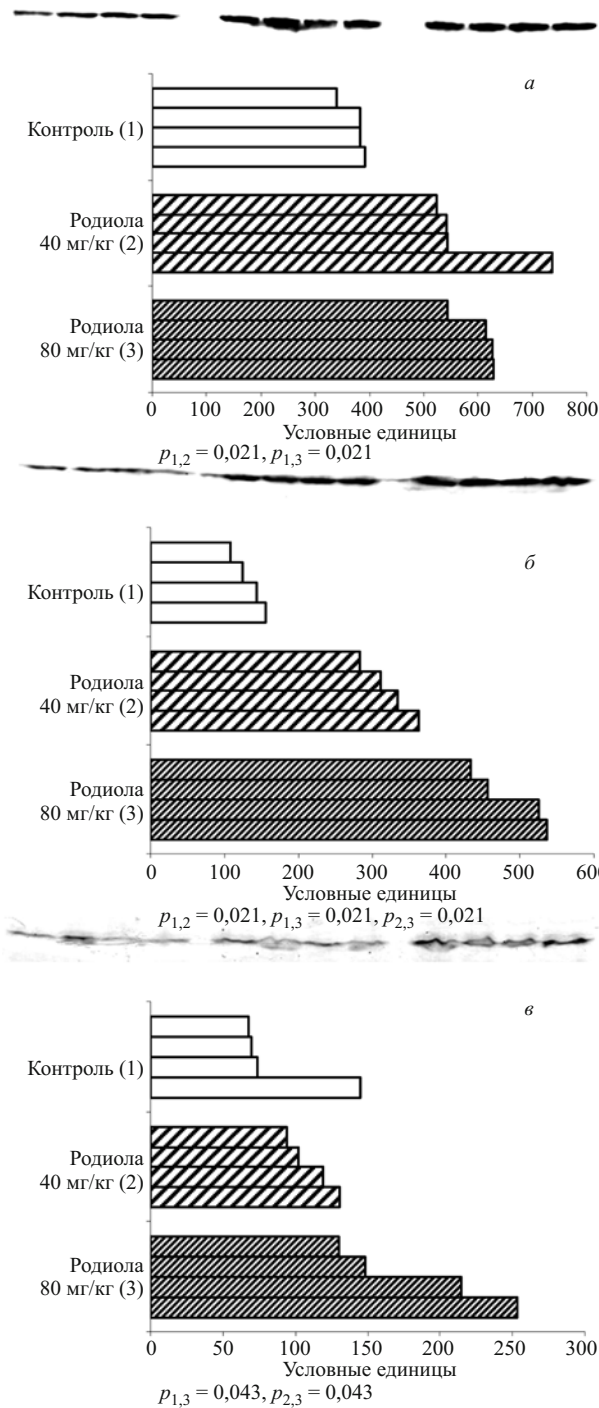
дением тиопентала натрия (40 мг/кг), отбирали тканей печени, сердца (левый желудочек) и головного мозга (гиппокамп), сразу готовили пробы, которые хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  вплоть до определения содержания белков стресса Hsp70 и Hsc70 [18]. Для электрофоретического разделения на каждую дорожку наносили пробу, полученную из ткани одного животного, с одинаковым для каждой ткани содержанием общего белка, который определяли по методу М. Bradford [12].

Параллельно из кусочков печени получали гепатоциты, которые путем отпечатков наносили на покровные стекла [4] и гистохимически определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [9]. Изображения окрашенных клеток каждого образца с микроскопа МБИ-15 (ЛОМО) выводили на монитор компьютера с помощью видеоокуляра НВ-35 (ООО “НВ-лаб”). Используя программу анализа изображений, производили подсчет активности СДГ в 50 клетках каждого образца. Результат выражали в условных единицах, полученных по формуле [9]:  $I = (a + 2b + 3c)/100$ , где  $I$  — показатель активности СДГ,  $a$ ,  $b$  и  $c$  проценты клеток с низкой, умеренной и высокой активностью. Клетки распределяли по степени активности фермента, ориентируясь на полученные значения: низкая активность (432 – 1332), умеренная активность (1333 – 2233), высокая активность (2234 – 3124).

**Таблица 1.** Жизнеспособность мононуклеарных клеток крови людей, содержание в них Hsp70 и Hsc70, накопление в среде нитрит иона после 16-часовой инкубации с добавлением различных количеств густого экстракта родиолы (% по отношению к данным показателям без добавления родиолы)

Среда инкубации	Hsp70					Hsc 70					Жизнеспособность					Нитрит ион				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Без добавок	100	100				100	100				100	100				100	100			
0,4 % этанол			100		100			100		100			100	100	100			100	100	
Родиола, 5 мкг/мл					90					106				114	100					113
Родиола, 10 мкг/мл	92				100	109				120	71				98	86	<b>108</b>			105
Родиола, 20 мкг/мл	76	<b>141</b>	<b>131</b>		<b>135</b>	85	146	<b>341</b>		<b>136</b>	<b>105</b>	<b>104</b>	<b>102</b>	<b>122</b>	94	100	102	118	<b>145</b>	
Родиола, 40 мкг/мл	80	127	56		67	<b>116</b>	<b>152</b>	35		104	85	90	97	98	83	80	116	<b>140</b>	105	
Родиола, 80 мкг/мл	40	70				69	116				56	93				94	<b>127</b>			

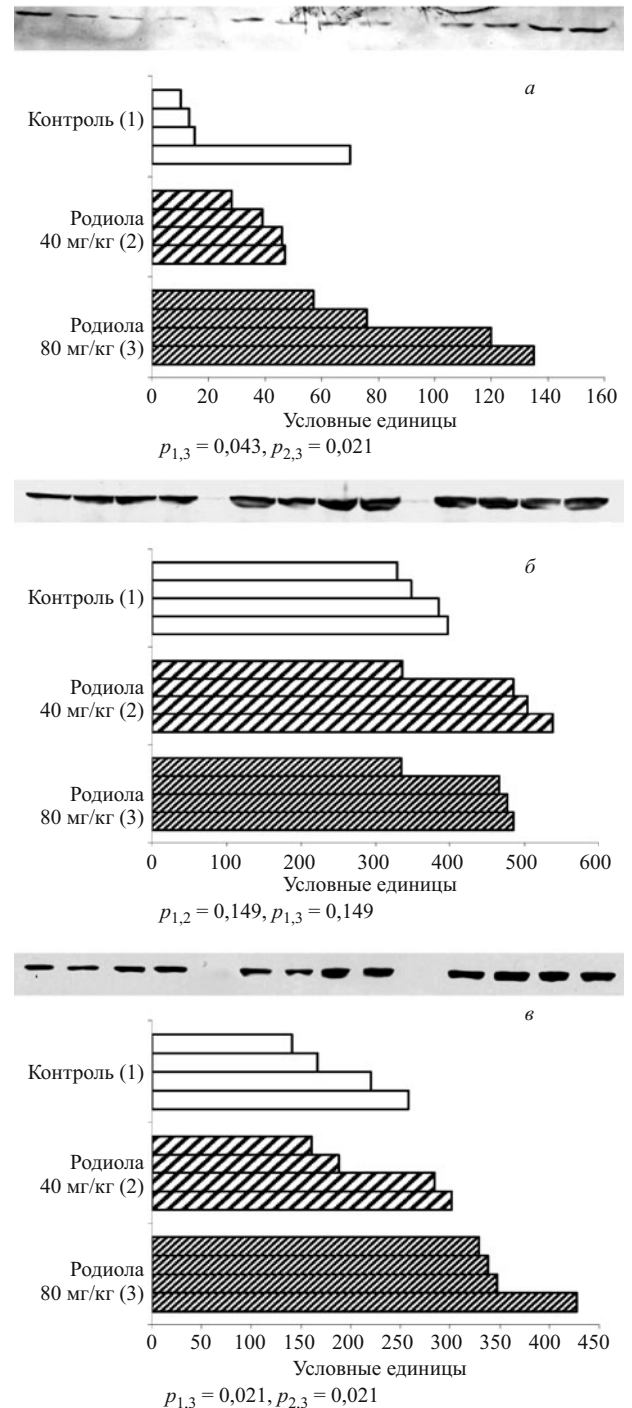
**Примечание.** 1 – 5 — образцы мононуклеарных клеток крови, полученные от разных индивидуумов; заштрихованные цифры — минимальные значения показателей; полужирный шрифт — максимальные значения показателей.



**Рис. 3.** Содержание Hsp70 в печени (а), левом желудочке сердца (б), гиппокампе (в) крыс после 14-дневного введения крысам экстракта родиолы.

Вверху каждого рисунка слева направо: первые четыре пятна — контроль, далее — родиола в дозе 40 мг/кг, далее — родиола в дозе 80 мг/кг. Внизу каждого рисунка: гистограмма после перевода изображений в числовые значения с помощью программы анализа изображений. Каждая проба (столбик на гистограмме) — одно животное.

**Реактивы и реагенты.** В работе использовали реактивы фирмы ICN (США). В качестве первичных антител использовали мышинные антитела клона 2Н9 и 3С5 для Hsp70 и клона N69 для Hsc70, полученные в Институте



**Рис. 4.** Содержание Hsc70 в печени (а), левом желудочке сердца (б), гиппокампе (в) крыс после 14-дневного курса экстракта родиолы.

Вверху каждого рисунка слева направо: первые четыре пятна — контроль, далее — родиола в дозе 40 мг/кг, далее — родиола в дозе 80 мг/кг. Внизу каждого рисунка: гистограмма после перевода изображений в числовые значения с помощью программы анализа изображений. Каждая проба (столбик на гистограмме) — одно животное.

цитологии РАН, а также антитела для Hsc70 фирмы Santa Cruz (США). Вторичные антитела goat to mouse IgG(HRP) (ab6789) были получены от фирмы Abcam (Великобритания).

Таблица 2. Изменение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в гепатоцитах крыс после недельного курсового введения родиолы

Группа крыс	№ п/п	Показатель активности СДГ	Количество клеток с различной активностью СДГ		
			низкая	умеренная	высокая
Контроль	1	$1,9 \pm 0,3^*$ (1,8 – 2,1) <sup>#</sup>	$10,0 \pm 9,5$ (3 – 12)	$35,0 \pm 7,0$ (35 – 37)	$5,2 \pm 3,4$ (3 – 6)
Родиола, 40 мг/кг	2	$1,6 \pm 0,2$ (1,4 – 1,7)	$23,3 \pm 10,2$ (16 – 31)	$26,0 \pm 10,2$ (19 – 34)	$0,8 \pm 0,9$ (0 – 1,5)
Родиола, 80 мг/кг	3	$1,3 \pm 0,2$ (1,2 – 1,5)	$36,0 \pm 7,2$ (28 – 42)	$13,7 \pm 6,7$ (8 – 21)	$0,3 \pm 0,6$ (0 – 1)
Достоверность различий		$p_{1,2} \geq 0,050$ $p_{1,3} = 0,025$	$p_{1,3} = 0,025$	$p_{1,3} = 0,025$	$p_{1,3} = 0,037$

\* — среднее арифметическое и стандартное отклонение.

# — (25 % – 75 %) нижний и верхний квартили.

Содержание Hsp70 и Hsc70 определяли в относительных единицах путем обсчета блотов с помощью программы анализа изображений, учитывающей размеры и интенсивность окраски каждого пятна.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0 с нахождением среднего арифметического и стандартной ошибки среднего, нижнего (25 %) и верхнего (75 %) квартилей. Для обработки данных после исключения экстремумов использовали тест Манна-Уитни для независимых групп.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Мононуклеарные клетки крови.* Непосредственный контакт изолированных мононуклеарных клеток крови, выделенных от разных людей, с компонентами изучаемого препарата родиолы розовой показал, что существует его оптимальное содержание в среде инкубации — 20 мкг/мл, когда жизнеспособность клеток максимальна. При этой концентрации экстракта наблюдалось также увеличение в клетках количества индуцибельного белка Hsp70. Конститутивный белок Hsc70 увеличился в разной степени в клетках, полученных от разных доноров при содержании экстракта родиолы в среде инкубации 20 и 40 мкг/мл (табл. 1). Максимальное накопление в среде инкубации нитрит-иона, свидетельствующее о повышенной NO-синтазной активности, происходило при различном содержании в среде экстракта родиолы для клеток, полученных от разных индивидуумов. Содержание экстракта родиолы в среде инкубации свыше 40 мкг/мл приводит к снижению жизнеспособности клеток и уменьшению содержания в них белков теплового шока Hsp70 и Hsc70.

Механизм действия компонентов экстракта родиолы розовой на изолированные мононуклеарные клетки крови остается неясным. Основные активные компоненты родиолы, такие как салидрозид и п-тирозол являются водорастворимыми соединениями и, вероятно, прежде всего, взаимодействуют с компонентами клеточной мембраны и связанными с ней рецепторами, воздействуя на сигнальные пути, ведущие к повышению экспрессии белков теплового шока 70 и сохранению высокой жизнеспособности клеток. Превышение оптимальных количеств экстракта родиолы приводит к токсическим эффектам у изолированных клеток, а именно: снижению их жизнеспособности и уменьшению содержания защитных белков

стресса семейства 70. По всей видимости, изолированные мононуклеарные клетки крови в условиях культивирования характеризуются низким адаптационным потенциалом. Напротив, известно, что воздействие препаратов родиолы на целый организм лишено токсических проявлений и приводит к положительным эффектам, таким как повышение физической работоспособности [1, 15], уменьшение симптомов депрессии и усталости [14, 16].

*Крысы.* Курсовое 7-дневное введение экстракта родиолы в дозах 20 мг/кг, 40 и 80 мг/кг крысам не изменило содержания белков стресса 70 в тканях крысы за исключением дозозависимого увеличения содержания конститутивного белка Hsc70 в печени (рис. 1).

Оценка активности сукцинатдегидрогеназы в гепатоцитах крыс (рис. 2) после недельного курса родиолы показала, что количество клеток со средней и повышенной активностью фермента уменьшалось по сравнению с контролем, а доля гепатоцитов с низкой активностью СДГ, соответственно, увеличивалась (табл. 2). Согласно имеющимся представлениям, высокая активность СДГ свидетельствует о напряжении окислительных процессов в митохондриях, связанных с адренергической стимуляцией и повышенной генерацией супероксидного анион радикала [11]. Можно полагать, что антиоксидантные свойства родиолы розовой реализуются с участием данных механизмов [17, 19]. Отмеченные нами после недельного курса родиолы изменения в печени свидетельствуют о благоприятном действии препарата на адаптационный потенциал и оптимизацию окислительных процессов в митохондриях.

Курсовое 14-дневное введение крысам экстракта родиолы в дозах 40 и 80 мг/кг привело к увеличению содержания Hsp70 в печени, гиппокампе и левом желудочке сердца (рис. 3). Содержание Hsc70 в изучаемых тканях также увеличилось (рис. 4). Таким образом, увеличение содержания белков стресса в тканях крысы зависит как от дозы экстракта родиолы, так и от длительности введения. При недельном сроке введения изменения касались лишь увеличения содержания конститутивного белка Hsc70 в печени, а в случае двухнедельного курса экстракта родиолы содержание обоих белков стресса 70 во всех исследованных тканях дозозависимо увеличилось. Выявленные изменения позволяют предположить повышение

неспецифической устойчивости тканей организма к действию неблагоприятных факторов под влиянием родиолы, что мы соотносим с достижением состояния неспецифически повышенной сопротивляемости по Н. В. Лазареву [5]. Наблюдаемый эффект в значительной степени объясняется увеличением содержания индуцибельного белка стресса Hsp70, что в настоящее время подтверждается огромным числом исследований. Увеличение содержания в клетках конститутивного белка Hsc70 также вносит вклад в повышение неспецифической устойчивости клеток и, кроме того, Hsc70 выполняет уникальную шаперонную функцию по отношению к ряду вновь синтезированных белков, в том числе белков митохондрий — активных участников адаптационного процесса [8], которую не может заменить Hsp70 [2]. А. С. Саратиков и Е. А. Краснов приводят данные о том, что введение родиолы вызывает как усиление протеолитических процессов, так и повышение биосинтеза белков [10], что, по всей видимости, отражает адаптационную перестройку протеома клеток, которая невозможна без участия клеточных шаперонов, в том числе белков стресса 70.

## ВЫВОДЫ

1. Мононуклеарные клетки крови человека реагируют на присутствие в среде инкубации родиолы розовой увеличением содержания белков стресса 70 и усилением накопления в среде инкубации нитрит иона. Повышенное содержание родиолы приводит к уменьшению содержания белков стресса 70 и жизнеспособности клеток часто при увеличенной активности NO синтазы.

2. Недельное внутрижелудочное введение крысам родиолы розовой ежедневно в дозах от 20 до 80 мг/кг приводит к увеличению содержания конститутивного белка теплового шока Hsc70 в печени. Отмечается дозозависимое уменьшение количества гепатоцитов с высокой и умеренной активностью сукцинатдегидрогеназы и увеличение количества клеток с низкой активностью фермента.

3. Двухнедельное ежедневное внутрижелудочное введение крысам препарата родиолы розовой в количестве 40 и 80 мг/кг приводит к зависимому от дозы увеличению содержания индуцибельного Hsp70 и конститутив-

ного Hsc70 белков теплового шока в печени, гиппокампе и левом желудочке сердца.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Абидов, Ф. Крендал, С. Грачев и др., *Бюл. exper биол.*, **136**(12), 664 – 666 (2003).
2. Л. И. Андреева, А. А. Бойкова, Б. А. Маргулис, *Технологии живых систем*, **6**(3), 11 – 17 (2009).
3. В. М. Виноградов (ред.), Е. Б. Каткова, Е. А. Мухин, *Фармакология с рецептурой: учебник для медицинских и фармацевтических училищ и колледжей*, 5-е изд., перераб., испр. и доп. СпецЛит, Санкт-Петербург (2009).
4. М. В. Кудрявцева, Е. Э. Завадская, А. Д. Скорина и др., *Лаб. дело*, (9), 21 – 22 (1983).
5. Н. В. Лазарев, Е. И. Люблина, М. А. Розин, *Пат. физиол. exper. тер.*, (4), 16 – 21 (1959).
6. Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, *Exper. и клин. фармакол.*, **70**(5), 59 – 67 (2007).
7. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 16-е изд., перераб., испр. и доп. Т. 1 – 2, Новая волна: Издатель Умеренков, Москва (2010).
8. Ф. З. Меерсон, *Механизмы адаптации к высотной гипоксии. Итоги науки и техники*, вып. 14, 7 – 62 (1974).
9. Р. П. Нарциссов, *Арх. анат., гистол. и эмбриол.*, **16**(5), 85 – 91 (1969).
10. А. С. Саратиков, Е. А. Краснов, *Родиола розовая (золотой корень)*, 4-е изд., перераб., испр. и доп. Изд-во Томского ун-та, Томск (2004).
11. Н. В. Хундерякова, М. В. Захаренко, А. В. Захаренко, М. Н. Кондрашова, *Биохимия*, **73**(3), 414 – 419 (2008).
12. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 – 254 (1976).
13. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, et al., *Anal. Biochem.*, **126**, 131 – 138 (1982).
14. S. K. Hung, R. Perry, E. Ernst. *Phytomedicine*, **18**(4), 235 – 44 (2011).
15. F. T. Lee, T. Y. Kuo, S. Y. Liou, C. T. Chien., *Am. J. Chin. Med.*, **37**(3), 557 – 72 (2009).
16. E. M. G. Olsson, B. von Scheele, A. Panossian, *Planta Med.*, **75**, 105 – 112 (2009).
17. S. E. Schrine, A. Abrahamyan, A. Avanesian, et al., *Free Radic Res.*, **43**(9), 836 – 843 (2009).
18. H. Towbin, T. Staeheln, J. Gordon, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **7**, 4350 – 4354 (1979).
19. Q. Wang, J. Wang, L. J. Sun, et al., *Zhonghua Nan Ke Xue.*, **15**(4), 331 – 336 (2009).

Поступила 01.06.12

## EVALUATING ADAPTOGENIC PROPERTIES OF *RHODIOLA ROSEA* EXTRACT IN HUMAN MONONUCLEAR CELL CULTURE AND RAT TISSUES

L. I. Andreeva, A. A. Boikova, and D. V. Nikiforova

St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Akad. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044, Russia

The administration of various doses of *Rhodiola rosea* roots and rhizome spissum with known concentrations of salidroside, n-tyrosol, and rosavine leads to an increase in stress proteins 70 content in human mononuclear cell culture and in tissues of Wistar rats. A one-week peroral administration of *Rh. Rosea* preparation increases the content of constitutive Hsc70 in liver and the amount of hepatocytes with low succinate dehydrogenase activity. A two-week administration of *Rh. Rosea* extract leads to an increase in the levels of inducible Hsp70 and constitutive Hsc70 proteins in liver, hippocampus and left heart ventricle. These results are indicative of an increase in nonspecific resistance and the activation of adaptogenic processes.

**Keywords:** *Rhodiola rosea* roots and rhizome spissum, inducible Hsp70 proteins; constitutive Hsc70 proteins; Wistar rats, succinate dehydrogenase of hepatocytes; human mononuclear blood cells