

## ПРИМЕНЕНИЕ ФИТОПРЕПАРАТОВ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ В КАЧЕСТВЕ ВОЗМОЖНЫХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ

© 2010 О.Л. Кулагин, В.А. Куркин, А.А. Царева, Н.А. Додонова

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 29.09.2010

С давних времен фитопрепараты на основе родиолы розовой применяются в медицинской практике в качестве растительных адаптогенов. В процессе исследования проведено изучение антиоксидантной активности препаратов полученных из родиолы розовой, а также показано их влияния на ферментативные звенья антиоксидантной защиты печени.

Ключевые слова: *фитопрепараты, гепатопротекторы, антиоксидантная активность*

Использование лекарственных растений, содержащих биологически активные соединения (БАС), обладающие антиоксидантной активностью, позволяет расширить арсенал лекарственных препаратов для лечения и профилактики поражений печени. Изучение механизмов действия гепатопротекторных соединений растительного происхождения дает возможность влиять на различные звенья антиоксидантной защиты печени в комплексной терапии гепатитов. Препараты родиолы розовой являются признанными фитoadаптогенами [2]. Биологическая активность корневищ родиолы розовой в основном обуславливается гликозидами коричневого спирта, среди которых доминирующим компонентом является розавин [1]. В медицинской практике успешно используются тонизирующие, адаптогенные, иммуномодулирующие свойства препаратов родиолы розовой [3, 4]. Однако практически не изучено влияние фитопрепаратов, созданных на ее основе, на ферментативные звенья антиоксидантной защиты печени. Так же недостаточно изучена активность препаратов родиолы розовой в сравнительном аспекте [2].

**Цель настоящей работы:** определение антиоксидантной активности фитопрепаратов на основе родиолы розовой, а также исследование их влияния на ферментативные звенья антиоксидантной защиты печени.

В качестве **объектов исследования** служили фармакопейные препараты настойка корневищ родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), сухой и жидкий экстракты родиолы розовой, а также индивидуальное соединение – розавин.

*Кулагин Олег Львович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии. E-mail: kulagin2000@yandex.ru*  
*Куркин Владимир Александрович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: vakur@samaramail.ru*

*Царева Анна Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии. E-mail: anna@anagin.net*

*Додонова Наталья Аполлоновна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии. E-mail: moli2000@mail.ru*

Исследование антиоксидантной активности фитопрепаратов, осуществляли на белых лабораторных крысах обоего пола массой 200-260 граммов, которые были разделены на группы по 10 штук в каждой. Крысы находились на обычном рационе вивария, были размещены в стандартных пластиковых клетках в помещении с температурой воздуха 18-25°C. Животные были вовлечены в эксперимент одновременно, что исключает влияние внешних температурных, климатических и иных факторов на разницу активности ферментов у опытных и контрольных групп животных. Во время эксперимента доступ крыс к воде и корму был свободным. Все эксперименты выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для воспроизведения токсического повреждения печени нами был выбран четыреххлористый углерод, который наиболее часто применяется в эксперименте с целью моделирования токсического гепатита [5]. В результате токсического повреждения печени в крови увеличивается уровень перекисного окисления липидов. В этой связи нами было применено многократное введение четыреххлористого углерода крысам в дозе 2,0 г/кг веса животного. Крысы забивались в соответствии с этическими нормами под эфирным наркозом методом декапитации. Печень крыс извлекалась, промывалась физиологическим раствором и сразу замораживалась в сосуде с твердой углекислотой («сухим льдом») при температуре -70-80°C. Затем из ткани печени готовился гомогенат для проведения анализа на содержание малонового альдегида (МДА), а также определения активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и каталазы. Гомогенат готовился механическим измельчением ткани печени массой 1 грамм с 5 мл фосфатного буфера (рН 7,4) со скоростью 5000 об/мин в

сосуде с двойными стенками постоянно охлаждаемого проточной водой. Определение конечного продукта перекисного окисления липидов – МДА осуществляли на основе принципа, в соответствии с которым при высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм, который и регистрируется фотометрически. К 0,5 мл гомогената добавляют 1 мл 15%-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУК), перемешивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. К 1 мл надосадочной жидкости (центрифугат должен быть прозрачен) добавляют 2 мл 0,8%-го раствора ТБК. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 15 минут. После охлаждения в течение 30 минут пробы колориметрируют при 532 нм на фоне контроля (1 мл ТХУК и 2 мл ТБК). Количество МДА в пробах рассчитывают, используя молярный коэффициент экстинкции  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Определение активности каталазы основано на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Реакцию запускают добавлением 0,1 мл гомогената к 2 мл 0,03%-ного раствора перекиси водорода. В холостую пробу добавляют дистиллированную воду вместо исследуемой жидкости. Реакцию останавливают через 10 минут добавлением, 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе на длине волны 410 нм на фоне контроля (2 мл воды, 0,1 мл гомогената, 1 мл молибдата аммония). Активность каталазы рассчитывают по формуле:  $E = (A_{\text{хол.пр.}} - A_{\text{оп.пр.}}) \cdot V \cdot K$ ,  $t$  – С белка печени, где  $V$  – объем гомогената (0,1 мл);  $K = 22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $t$  – время (600 сек).

В гомогенате печени определяли также активность СОД-фермента, инактивирующего супероксидные радикалы и уменьшающего интенсивность перекисного окисления липидов. Супероксиддисмутаза относится к числу ферментов, входящих в состав антиоксидантной защитной системы организма. Активность СОД определялась по методу, описанному В.С.Гуревичем и др. [1]. В соответствии с данной методикой, гомогенат печени центрифугируют с охлаждением при 6000 об/мин в течение 10 мин. К 1 мл гомогената приливают 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4), гомогенизируют и центрифугируют 15 мин при 5000 об/мин. К 0,5 мл верхней фазы добавляют 1 мл раствора хлороформа с метанолом (2:1) для осаждения гемоглобина. Смесь охлаждают и тщательно перемешивают в течение 10 мин. Затем содержимое пробирок центрифугируют для удаления гемоглобина и хлороформа.

Верхний слой отсасывают, добавляют несколько капель насыщенного раствора  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и разводят фосфатным буфером в 20 раз. 0,2 мл раствора вносят в инкубационную смесь содержащую 57 мкМ нитросинего тетразолия (НСТ), 98,5 мкМ  $\text{НАД} \cdot \text{H}$ , 16 мкМ феназинметасульфата (ФМС). Реакция протекает 10 мин в 0,5 М фосфатном буфере с ЭДТА (рН 8,3) при температуре  $25^\circ\text{C}$  в аэробных условиях. В контрольную пробу фермент не вносят. Затем измеряют оптическую плотность реакционной смеси при длине волны 540 нм.

Активность СОД рассчитывают по формуле:  $A = T\% / (100\% - T\%)$ , где  $A$  – активность фермента (в усл. ед.), рассчитанная на 1 мг белка (в г);  $T\%$  – процент торможения реакции восстановления НСТ или окисления адреналина в пробе за 1 мин (50% ингибирования этой реакции соответствует 1 усл. ед).

Определение активности глутатионпероксидазы (ГП) осуществляют в соответствии со следующей методикой [4]: 100 мкл гомогената преинкубируют с 830 мкл 0,1 М трис-НСI буфера (рН 8,5), содержащего 6 мМ ЭДТА и 12 мМ азида натрия, в течение 10 мин при  $37^\circ\text{C}$ , добавляют 70 мкл 20 мМ раствора гидроперекиси третичного бутила (готовят перед анализом разведением исходного реактива в 500 раз) и инкубируют точно 5 мин. Реакцию останавливают добавлением 200 мкл холодной ТХУК, осажденные белки удаляют центрифугированием. 100 мкл супернатанта вносят в 10 мл трис-НСI буфера и добавляют 100 мкл реактива Элмана (0,01 М раствор дитионитробензойной кислоты в метаноле). Через 5 мин пробы фотометрируют при 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Контрольная проба отличается тем, что гомогенат вносят непосредственно перед осаждением белков. С учетом разведения биологического материала в данном методе и коэффициента молярной экстинкции ТНФА при 412 нм – 11400, рассчитывают активность ГП в микромолях, израсходованного в реакции субстрата по формуле:  $(E_{\text{контроля}} - E_{\text{опыта}}) \cdot 2147 = \text{мкМ/мин на 1 мг белка печени}$ .

Для анализа данных выборок нами был применен t-критерий поправкой Бонферони. Полученные данные являлись выборками из генеральных совокупностей с нормальным распределением. Для статистической обработки данных нами был применен однофакторный дисперсионный анализ. Для статистического анализа средних выборок был использован t-критерий с поправкой Бонферони.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты показаны в таблице.

Таблица. Влияние фитопрепаратов на активность ферментов и уровень ПОЛ

№ п/п	Вводимые вещества	Малоновый диальдегид, нМоль на мг белка печени	Активность супероксиддисмутазы, АЕД на мг белка печени	Активность каталазы, нМоль/с на мг белка печени	Активность глутатионпероксидазы, нМоль/мин на мг белка печени
1	Контроль (CCl <sub>4</sub> )	26,06±3,40	1,161±0,292	0,064±0,014	0,89±0,32
	CCl <sub>4</sub> + родиолы экстракт сухой	19,45± 3,20 p<0,01	1,179 ± 0,400 p>0,05	0,060 ± 0,017 p>0,05	0,86 ± 0,38 p>0,05
2	Контроль (CCl <sub>4</sub> + спирт)	25,27±2,06	0,795±0,171	0,063±0,011	1,19±0,34
	CCl <sub>4</sub> + родиолы розовой настойка	19,50± 5,30 p<0,01	1,062 ± 0,265 p<0,05	0,067 ± 0,017 p>0,05	1,30 ± 0,51 p>0,05
3	Контроль (CCl <sub>4</sub> )	26,06±3,40	1,161±0,292	0,064±0,014	0,89±0,32
	CCl <sub>4</sub> + розавин	20,24 ± 2,02 p<0,01	1,533 ± 0,261 p<0,05	0,103 ± 0,027 p<0,01	1,14 ± 0,33 p>0,05
4	Контроль (CCl <sub>4</sub> )	25,11±1,96	0,750±0,105	0,059±0,013	1,01±0,37
	CCl <sub>4</sub> + родиолы экстракт жидкий	20,67 ± 3,44 p>0,05	0,907 ± 0,231 p>0,05	0,070 ± 0,017 p>0,05	0,97 ± 0,41 p>0,05

Из четырех исследованных препаратов только у родиолы экстракта жидкого, вводимого в дозе 150 мкл/кг, не выявлено воздействие на уровень малонового диальдегида и активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Родиолы экстракт сухой в дозе 150 мкл/кг, родиолы розовой настойка в дозе 150 мкл/кг и розавин в дозе 25 мг/кг достоверно снижают уровень малонового диальдегида. Наряду с снижением уровня малонового диальдегида розавин статистически достоверно повышает уровень каталазы и супероксиддисмутазы и по своей активности превосходит остальные препараты, приготовленные на основе родиолы розовой. Это свидетельствует о хорошей перспективе использования в медицинской практике именно эссенциального фенилпропаноида, который и обуславливает достоверную эффективность остальных препаратов этой группы. Есть все основания считать, что повышение активности супероксиддисмутазы при введении родиолы розовой настойки крысам, отравленным четыреххлористым углеродом, в сочетании с

понижением уровня малонового диальдегида, свидетельствует о наличии у данных препаратов выраженных гепатопротекторных свойств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, Е.В. Авдеева, В.Н. Ежков. – Самара, 2005. С. 5, 36, 67-71.
2. Левина, Л.В. К оценке соотношения между антигипнотическим и антиокислительным действием препаратов родиолы розовой / Л.В. Левина, В.М. Гусаков, Ф.П. Крендаль // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока: Тезисы докладов Всесоюзной конференции. – Томск, 1986. С. 94.
3. Саратиков, А.С. Родиола розовая (золотой корень) – 4-е изд., перераб. и доп. / А.С. Саратиков, Е.А. Краснов. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2004. 292 с.
4. Nan, J.X. Protective effect of *Rhodiola sachalinensis* extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats / J.X. Nan, E.J. Park, G. Ko et al. // J. Ethnopharmacol. 2003 Feb. 84(2-3). P. 143-148.

## USE OF PHYTOPREPARATIONS FROM RHODIOLA ROSEA AS POSSIBLE HEPATOPROTECTORS

© 2010 O.L. Kulagin, V.A. Kurkin, A.A. Tsareva, N.A. Dodonova  
Samara State Medical University

For a long time phytopreparations on the basis of *rhodiola rosea* is applied in medical practice as vegetative adaptogens. During research studying of antioxidant activity of preparations received from *rhodiola rosea* is lead, and also shown their influences on enzymatic parts of antioxidant protection of a liver.

Key words: *phytopreparations, hepatoprotectors, antioxidant activity*

Oleg Kulagin, Doctor of Medicine, Professor at the Department of Pharmacology.

E-mail: kulagin2000@yandex.ru

Vladimir Kurkin, Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: vakur@samaramail.ru

Anna Tsareva, Candidate of Medicine, Assistant at the Department of Pharmacology.

E-mail: anna@anarun.net

Nataliya Dodonova, Candidate of Medicine, Associate Professor at the Department of Pharmacology. E-mail: moli2000@mail.ru