

Научная статья
УДК 615.27:616-009
DOI: 10.18101/2306-1995-2021-2-16-22

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ АДАПТОГЕНОВ

© **Алексеева Эльвира Алексеевна**

кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой анатомии и физиологии,
Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова
Россия, 670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а
alecseevaelvira@mail.ru

© **Шантанова Лариса Николаевна**

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией безопасности
биологически активных веществ,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
alecseevaelvira@mail.ru

Аннотация. На моделях острого и хронического эмоционального стресса изучена роль белков теплового шока (Hsp70) и белка p53 в реализации адаптогенного действия экстракта сухого астрагала перепончатого и комплексного растительного средства «Кардекаим», содержащих в качестве действующих веществ фенольные соединения и тритерпены. Курсовое профилактическое введение экстракта астрагала перепончатого в экспериментально-терапевтической дозе 50 мг/кг, кардекаима в дозе 100 мг/кг на фоне острого эмоционального стресса оказывает выраженное стресспротективное действие, препятствуя развитию признаков «триады Селье»: инволюции тимуса, гипертрофии надпочечников, эрозивным повреждениям слизистой желудка. На молекулярно-клеточном уровне стресспротективное действие испытуемых фитоэкстрактов сопровождается активацией синтеза Hsp70 в тимусе: астрагала в 2,6 раза; кардекаима на 56% ($p < 0,05$), а также выраженным ингибированием индукции Hsp70 в лейкоцитах стрессированных животных, подвергнутых тепловому шоку *in vitro*. На модели хронического эмоционального стресса курсовое профилактическое введение экстракта астрагала перепончатого не влияет, а кардекаима повышает уровень мРНК p53 в красном костном мозге на 50%.

Ключевые слова: растительные адаптогены, острый эмоциональный стресс, хронический эмоциональный стресс, Hsp70, p53, астрагал перепончатый.

Для цитирования

Алексеева Э. А., Шантанова Л. Н. Молекулярные механизмы действия растительных адаптогенов // Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация. 2021. № 2. С. 16–22.

Адаптогены растительного происхождения эмпирически применяются в традиционных медицинских системах для укрепления физического и психического здоровья, улучшения защитных механизмов организма и увеличения продолжительности жизни [12]. Для понимания мультивалентной фармакологической активности адаптогенов особый интерес представляют исследования молекулярных механизмов действия. Обнаружены молекулярные мишени, моду-

ляция которых может отсрочить развитие стресс-ассоциированных заболеваний, включая возрастные нейродегенерации, сердечно-сосудистую патологию, метаболический синдром и др. [2; 4; 8; 9]. Одним из механизмов стресспротективного действия адаптогенов является активация синтеза молекулярных шаперонов (белков теплового шока) Hsp70 и др. [7]. Белок p53 синтезируется в организме в ответ на повреждение ДНК и другие изменения клеточной структуры. Он запускает процесс аутофагии, мембраноопосредованное «самопоедание» клетки, способствует очищению клетки от поврежденных органелл и других белковых субстанций [1]. В связи с этим необходимо выяснить роль белков Hsp и P-53 в реализации механизма действия растительных адаптогенов.

Целью проведенного исследования явилось определение роли белков Hsp70 и p53 в реализации адаптогенного действия растительных адаптогенов на моделях острого и хронического эмоционального стресса.

Материалы и методы. Кардекаим — экстракт сухой из четырех видов растительного сырья — корней и корневищ *Inula helenium* и *Zingiber officinale*, плодов *Elletaria cardamomum* и побегов *Caragana spinosa*, полученный по оригинальной методике на основе тибетской рецептурной прописи в Отделе биологически активных веществ ИОЭБ СО РАН, а также экстракт сухой, полученный из корней *Astragalus membranaceus* (Fischer) Bunge по запатентованной методике [5], они обладают выраженным адаптогенным действием на различных моделях стресса [6; 13]. Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Wistar массой 160–180 г и на 24 белых мышах SHK обоего пола массой 12,5 г. Организация, порядок проведения исследований, содержание животных в условиях сертифицированного вивария ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и приказу МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Исследования проводились в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или в иных научных целях», ETS № 123 от 18.03.1986 г. (Страсбург, 1986). Протокол экспериментальной апробации согласован с этической комиссией Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (протокол № 1 от 15.01.2016). Модель острого эмоционального стресса воспроизводили методом водной иммерсии путем однократного помещения животных в клетку с водой (22 °С) на 30 минут и 4 часа. Через два часа после стрессорного воздействия животных декапитировали под легким эфирным наркозом и определяли степень гипертрофии надпочечников, количество эрозий слизистой оболочки желудка, а также определяли массу тимуса, который затем замораживали и хранили в замороженном виде при -70 °С до электрофореза. 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). Количественная обработка полученных иммуноблотов проводилась с помощью компьютерной программы Photoshop. Животные опытной группы 1 получали per os в течение 7 дней до эксперимента водный раствор экстракта сухого астрагала перепончатого 50 мг/кг, опытной группы 2 — водный раствор кардекаима

100 мг/кг за 1 ч до кормления. Животным референтной группы вводили препарат сравнения — деалкоголизированный экстракт элеутерококка в объеме 5 мл/кг по аналогичной схеме. Контрольной группе аналогично вводили дистиллированную воду. Хронический иммобилизационный стресс моделировали 4-часовым подвешиванием за шейную складку в течение 10 дней. Исследуемые препараты вводили профилактически в течение 7 дней до и 10 дней в течение эксперимента за 1 час до стрессорного воздействия. На 10 день сразу после стрессорного воздействия произвели забой мышей и выделение красного костного мозга из костей задних конечностей, выделение мРНК проводили с помощью набора «Рибо-преп», получали кДНК на матрице мРНК, используя комплект готовых реагентов «Реверта-L», ПЦР-РВ проводили на приборе iCycler iQ5 real-time PCR (BioRad, Германия). Для оценки числа копий мРНК применялся ΔC_t -метод относительного определения количества по формуле $(1/2)^{\Delta C_t}$, где $\Delta C_t = C_t(p53) - C_t(GAPDH)$. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Курсовое профилактическое введение экстракта кардекаима 100 мг/кг 7 дней лабораторным крысам перед острым иммобилизационным стрессом оказывает выраженное стресспротективное действие, препятствуя развитию признаков «триады Селье»: инволюции тимуса (40%), язвенных повреждений слизистой желудка (в 5 раз) и в меньшей степени — гипертрофии надпочечников ($p \leq 0,05$), полученный эффект не уступает препарату сравнения – экстракту элеутерококка (табл. 1).

Таблица 1

Влияние растительных средств на выраженность признаков «триады Селье» при остром эмоциональном стрессе ($M \pm m$)

Группы животных	n	Относительный вес, мг/100 г массы		Количество деструкций в слизистой желудка на одно животное
		надпочечников	тимуса	
Интактная (дист. вода)	6	17,3 ± 0,83	242,6 ± 9,18	0,0
Контрольная 1 (стресс)	6	22,1 ± 1,42*	173,4 ± 19,53*	3,2 ± 0,52*
Опытная 1 (стресс+ кардекаим)	6	19,6 ± 1,14**	213,1 ± 18,12**	1,3 ± 0,73**
Опытная 2 (стресс+ астрагал)	6	17,5 ± 0,11**	231,7 ± 13,41**	1,1 ± 0,43**
Опытная 3 (стресс+элеутерококк)	6	20,3 ± 2,19*	234,7 ± 23,77**	1,1 ± 0,10**

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

Курсовое превентивное введение экстракта сухого астрагала перепончатого также повышает устойчивость организма к эмоциональному стрессу, о чем свидетельствует уменьшение степени гипертрофии надпочечников на 20%, увеличение относительной массы тимуса на 34%, а также уменьшение количества эрозий слизистой желудка крыс в 2,8 раза по сравнению с показателями животных контрольной группы ($p \leq 0,05$).

Как следует из таблицы 2, курсовое введение кардекаима интактным животным не оказывает влияния на уровень Hsp70 в тимусе, в то же время введение кардекаима на фоне стресса повышает его содержание на 56% по сравнению с данными контрольной группы. На фоне курсового введения астрагала перепончатого интактным животным уровень Hsp70 в тимусе повысился на 45% ($p < 0,05$), еще более значительное повышение уровня Hsp70 в 2,6 раза по сравнению с контролем обнаружилось при введении испытуемого средства стрессированным животным. У опытных групп, получавших испытуемые средства, содержание Hsp-70 в лейкоцитах после теплового шока снизилось почти в 3 раза по сравнению с данными крыс в контроле. Таким образом, экспериментально установлены различия в отношении индукции Hsp-70 под влиянием кардекаима *in vivo* и *in vitro* (табл. 2).

Таблица 2

Влияние кардекаима и ЭСАП на базальный уровень Hsp70 в тимусе и индуцированный тепловым шоком синтез Hsp70 в лейкоцитах на модели острого эмоционального стресса; ОДЕ, (M±SD)

Группа	Содержание Hsp-70	
	в тимусе	в лейкоцитах после теплового шока
Интактная (дист.вода)	5,5±0,55	0,7±0,04
Интактная (кардекаим)	5,1±0,54	0,5±0,03
Интактная (астрагал)	8,1±1,26	0,8±0,11
Контрольная (стресс)	4,8±0,58	2,9±1,32*
Опытная 1 (стресс+кардекаим)	9,8±1,16**	1,0±0,16**
Опытная 2 (стресс+астрагал)	13,0±2,04**	1,0±0,13**

Выявлено, что хроническое стрессорное воздействие в виде иммобилизационного стресса (4-часовое подвешивание за шейную складку в течение 10 дней) вызывает у мышей контрольной группы достоверное снижение на 36% уровня мРНК p53 в красном костном мозге животных ($P=0,0047$) по сравнению с аналогичными данными интактных мышей.

Превентивное курсовое введение тетрафитона нормализует данный показатель, о чем свидетельствует повышение уровня мРНК p53 на 50% по сравнению с данными в контрольной группе животных. Достоверных отличий в уровне мРНК p53 на фоне введения астрагала не обнаружено (рис. 1). Таким образом установлено, что профилактическое курсовое введение кардекаима 100 мг/кг на фоне 10-дневного 4-часового иммобилизационного стресса вызывает активацию экспрессии гена p53 в красном костном мозге животных.

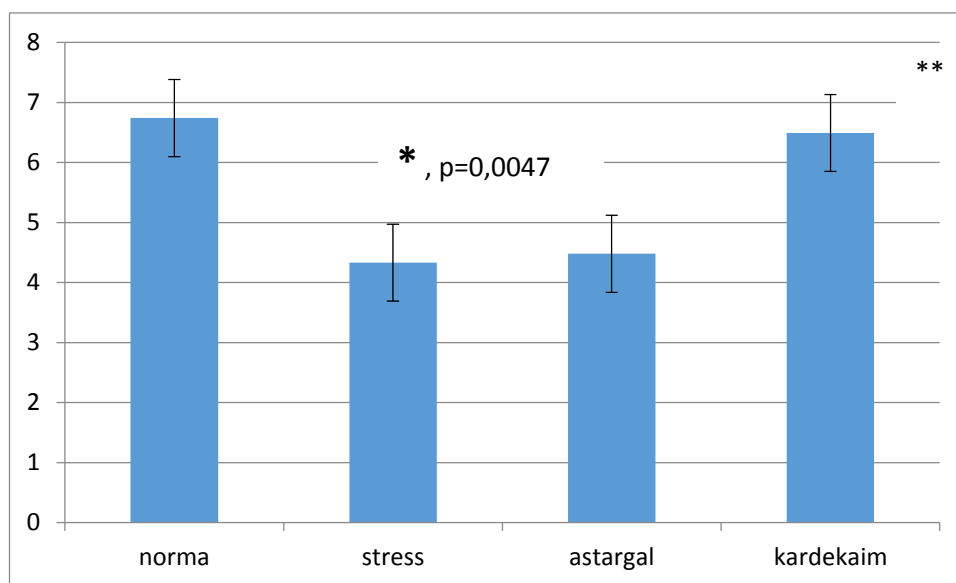


Рис. 1. Влияние кардекайма и астрагала перепончатого на уровень мРНК p53 на модели хронического стресса

Эмоциональный стресс вызывает реверберацию возбуждения в эмоциогенных лимбико-ретикулярных структурах головного мозга, оказывающих непрерывное нисходящее нервное и гуморальное влияние на периферические органы-мишени посредством взаимодействия с рецепторами клеток, особенно метаботропных, активирующих внутриклеточные сигнальные каскады и факторы транскрипции, которые индуцируют экспрессию протективных белков [10]. Под действием стресса происходит перегрузка системы протеостаза неправильно свернутыми белками, что приводит к гибели клеток и повреждению органов и преждевременному старению [9]. Нами обнаружено, что профилактическое курсовое введение разработанных растительных экстрактов кардекайма и астрагала перепончатого стрессированным животным достоверно повышает уровень молекулярных шаперонов Hsp70 в тимусе. Hsp70, как известно, способен ограничивать повреждения за счет ренатурации белков, поврежденных в результате стресса, дезагрегации аномальных белковых молекул, предотвращая, по-видимому, развитие инволюции тимуса и других внутренних органов [11; 12]. Причем если комплексное средство «Кардекайм» показало мягкое индуцирующее действие, введение астрагала стрессированным животным вызвало индукцию Hsp70 в 2,6 раза. Интересно, что в лейкоцитах стрессированных животных, подвергнутых тепловому шоку в условиях *in vitro*, обнаружена многократная индукция белка Hsp70, причем на фоне введения испытуемых средств индуцибельность значительно снижается, практически до уровня показателя интактных животных. Мы предполагаем, что активация экспрессии белков Hsp-70 в клетках является молекулярно-клеточным механизмом стресспротективного действия указанных фитоадаптогенов, это обусловлено наличием в их составе фенольных соединений и летучих терпеноидов. Так, в экстракте астрагала перепончатого присутствуют флавоноиды: изофлавоны — кали-

козин, каликозин-7-О-глюкозид и формонетин, а в составе фенольных соединений кардекаима установлено наличие представителей групп фенилпропаноидов, флавоноидов и арилгептаноидов. На модели хронического эмоционального стресса установлено, что профилактическое курсовое введение кардекаима вызывает активацию экспрессии белка р53 в красном костном мозге животных, который также участвует в утилизации поврежденных белков, способствует очищению клетки от поврежденных органелл и других белковых субстанций, обеспечивая тем самым выживание здоровых клеток [1]. Поскольку известно, что снижение способности индуцировать Hsp70 в нейронах и нейроглии, в скелетной и сердечной мышцах связано со старением, ингибирование экспрессии Hsp70 обнаружено при болезни Альцгеймера и приводит к накоплению бляшек агрегированного амилоидного пептида, а также возрастное снижение экспрессии Hsp70 в печени обуславливает снижение детоксицирующей функции печени у пожилых людей [2–4, 8–10]. Наличие выявленной нами активности кардекаима и астрагала перепончатого позволяет рекомендовать испытываемые фитоэкстракты для профилактики негативных последствий стресса, в первую очередь у пожилых пациентов (анти-эйдж-терапия).

Литература

1. Дубиков А. И. Белок P53: новая жизнь старой молекулы. Ч. 1. Обзоры // Научно-практическая ревматология. 2010. № 3. С. 52–58. Текст: непосредственный.
2. Роль естественных процессов старения в возникновении и патогенезе болезней, связанных с аномальным накоплением белковых агрегатов / Н. С. Ильинский, С. В. Нестеров, Е. И. Шестоперова [и др.] // Биохимия. 2021. Т. 86, № 3. С. 324–340. Текст: непосредственный.
3. Максимович Н. Е., Бонь Е. И. Белки теплового шока. Свойства. Роль в адаптации. Методические подходы к определению // Биомедицина. 2020. № 16(2). С. 60–67. Текст: непосредственный.
4. Роль белка теплового шока HSP70 в развитии сердечно-сосудистой патологии (обзор литературы) / А. В. Наумов, Т. В. Прокофьева, О. С. Полунина, Л. В. Сароянц // Вестник новых медицинских технологий. 2020. № 6. С. 133–139. Текст: непосредственный.
5. Способ получения средства, обладающего адаптогенным действием: пат. 2582952 Рос. Федерация // Д. Н. Оленников, Г. В. Чехирова, Л. М. Танхаева [и др.]; заявитель и патентообладатель ИО и ЭБ СО РАН // Бюл. № 12. 27.04.2016. Текст: непосредственный.
6. Стресс-протекторная активность комплексного растительного средства «Кардекаим» на модели иммобилизационного стресса / Л. Н. Шантанова, Э. А. Алексеева, А. А. Торопова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, № 9. С. 27–31. Текст: непосредственный.
7. Asea A., Kaur P., Panossian A., Wikman K. G. Evaluation of molecular chaperones Hsp 72 and neuropeptide Y as characteristic markers of adaptogenic activity of plant extracts // Phytomed. 2013. Vol. 20. P. 1323–1329.
8. Gupta A., Bansal A., Hashimoto-Torii K. HSP70 and HSP90 in neurodegenerative diseases. Neurosci. Lett. 2020. No. 18. P. 716–720.
9. Leak R. K. Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging // J. Cell. Commun. Signal. 2014. No. 8(4). P. 293–310.
10. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain // Physiol Rev. 2007. No. 87(3). P. 873–904.

11. Panossian A. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress-protective activity // *Pharmaceuticals*. 2010. № 3. P. 188–224.

12. Panossian A. Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017. No. 1401(1). P. 49–64.

13. Systematic Review of Phytochemistry, Pharmacology and Pharmacokinetics on Astragali Radix: Implications for Astragali Radix as a Personalized Medicine / G. Zhenzhen, L. Yanmei, K. Muyan [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20(6). P. 1463.

Статья поступила в редакцию 09.10.2021; одобрена после рецензирования 25.11.2021; принята к публикации 22.12.2021.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE EFFECT OF PLANT ADAPTOGENS

Elvira A. Alekseeva

Cand. Sci. (Medicine), A/Prof.,
Head of Anatomy and Physiology Department,
Dorzhi Banzarov Buryat State University
36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670000, Russia
alekseevaelvira@mail.ru

Larisa N. Shantanova

Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Head of Laboratory for Safety of Biologically Active Substances,
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
shantanova@mail.ru

Abstract. We have studied the role of heat shock proteins (HSP70) and p53 in the adaptogenic effect of the extract from *Astragalus membranaceus* (Fischer) Bunge and a complex herbal remedy “Kardekaim”, containing flavonoids and triterpenes as active ingredients, on the models of acute and chronic mental stress. Course prophylactic administration of *Astragalus membranaceus* extract at an experimental therapeutic dose of 50 mg / kg, and “Kardekaim” at a dose of 100 mg / kg has a pronounced stress-protective effect, prevent the symptoms of Selye’s triad: enlargement of the adrenal glands, atrophy of the lymphatic system including the thymus, and peptic ulcers of the stomach and duodenum. At the cellular level, the stress-protective effect of *Astragalus* is accompanied by the activation of HSP70 synthesis in the thymus in 2.6 times, and “Kardekaim” by 56% ($p < 0.05$). We also observed a pronounced inhibition of HSP70 induction in leukocytes of stressed animals subjected to heat shock in vitro. The prophylactic administration of *Astragalus membranaceus* extract does not effect on the chronic mental stress, but “Kardekaim” increases the level of p53 mRNA in the red bone marrow by 50%.

Keywords: plant adaptogens, acute mental stress, chronic mental stress, HSP, p53, *Astragalus membranaceus*.

For citation

Alekseeva E. A., Shantanova L. N. Molecular Mechanisms of the Effect of Plant Adaptogens. *Bulletin of Buryat State University. Medicine and Pharmacy*. 2021; 2: 16–22 (In Russ.).

The article was submitted 29.10.2021; approved after reviewing 25.11.2021; accepted for publication 22.12.2021.