

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И ВЛИЯНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЦВЕТКОВ БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ НА ПРО/АНТИОКСИДАНТНОЕ РАВНОВЕСИЕ В ЖЕЛУДКЕ КРЫС ПРИ ВОЛЬТАРЕНОВОЙ ГАСТРОПАТИИ

Папаяни О.И., Доркина Е.Г., Терехов А.Ю., Сергеева Е.О., Духанина И.В., Тираспольская С.Г.

ГБОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия» (357500, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: ksuxa011@yandex.ru

Качественными реакциями и методом ТСХ подтверждено наличие флавоноидов в сухом экстракте цветков бархатцев распротёртых. С помощью дифференциальной спектрофотометрии установлено количественное содержание суммы флавоноидов в объекте исследования в пересчёте на кверцетин (3,95%). При вольтареновой язве желудка происходит снижение активности как окислительных процессов, так и механизмов антиоксидантной защиты. Введение исследуемых субстанций по лечебно-профилактической схеме на фоне вольтареновой гастропатии способствует устранению тех сдвигов, которые наблюдались в системе ПОЛ/АОЗ, и по эффективности своего действия наиболее значимым оказался сухой экстракт в дозе 100 мг/кг. В основу методики положена реакция комплексообразования флавоноидов с раствором алюминия хлорида. Применение сухого экстракта в дозе 100 мг/кг оказало нормализующее влияние на систему глутатиона, что способствует восстановлению активности антиоксидантных и детоксикационных процессов в клетках желудка при вольтареновой язве.

Ключевые слова: цветки бархатцев распротертых, восстановление про/антиоксидантного равновесия.

CHEMICAL COMPOUND AND INFLUENCE OF DRY EXTRACT FROM FLOWERS OF SPREADING MARIGOLD ON PRO/ANTI-OXIDANT BALANCE IN RATS STOMACHS AT VOLTAREN ULCER INVESTIGATION

Papayany O.I., Dorkina E.G., Terekhov A.Yu., Sergeeva E.O., Dukhanina I.V., Tiraspolskaya C.G.

Pyatigorsk state pharmaceutical academy (357500, Russia, Pyatigorsk, st. Kalinina, 11), e-mail: ksuxa011@yandex.ru

Flavonoids availability in dry extract from flowers of spreading marigold was confirmed by some qualitative reactions and by a method of a thin-layer chromatography. With the help of differential spectrophotometry the quantitative content of flavonoids sum in the investigated object was determined in recalculation on quercetin (3,95%). Complex flavonoid formation reaction with a solution of aluminum chloride is put in the technique. If ulcer is damaged by Voltaren, occurs reduction of activity both oxidative processes and anti-oxidant defense mechanisms. Introduction of investigated substance under the curative and prophylactic scheme against a background of gastropathy helps to elimination of shifts, which was observed in system and the most significant, by the effectiveness of its work, was dry extract in dose of 100mg/kg. Dry extract application in a dose of 100 mg/kg has normalized the glutathione and it promotes the restoration activity of anti-oxidant and detoxic processes in stomach cells at voltaren ulcer.

Key words: flowers of spreading marigold, pro/anti-oxidant balance recovery.

Введение

Окислительный стресс, как возникающий дисбаланс в системе «прооксидант – антиоксидант», является важным патогенетическим фактором развития многих заболеваний,

в том числе язвенной болезни желудка. Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в совершенствовании способов лечения и профилактики гастропатий, отмечается их дальнейший рост и повышение частоты развития осложнений, ведущих к длительной потере трудоспособности пациентов, а иногда и к смерти. Довольно часто заболевания желудочно-кишечного тракта характеризуются хроническим рецидивирующим течением и сочетанной патологией нескольких органов, что определяет специфику терапевтического воздействия: оно должно быть достаточно длительным и комплексным, что предполагает применение лекарственных средств широкого спектра фармакологической активности [6].

В настоящее время большое внимание уделяется поиску биологически активных соединений растительного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, для последующего создания на их основе высокоэффективных лекарственных средств, предназначенных для восстановления про/антиоксидантного равновесия в организме [2]. В этом отношении перспективным объектом являются цветки бархатцев распростертых [9], влияющие на различные звенья патогенеза язвенной болезни, в то же время нетоксичные и хорошо переносимые. В качестве гастропротекторного средства целесообразно использовать сухой экстракт из бархатцев распростёртых.

Целью нашей работы явилось изучение химического состава сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых, определение количественного содержания в нём флавоноидов и влияние его на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние антиоксидантной системы желудка при язвенном поражении вольтареном.

Материалы и методы исследования

Предварительно нами были определены биологически активные вещества в изучаемом объекте, наибольший интерес из которых вызывают флавоноиды. Для качественного определения флавоноидов использовали химические реакции и тонкослойную хроматографию (ТСХ). Количественное определение флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии, используя реакцию взаимодействия с 2%-ным спиртовым раствором алюминия хлорида в максимуме светопоглощения при 427 нм [1; 7].

Модель вольтаренового поражения слизистой оболочки желудка (СОЖ) воспроизводили на белых беспородных крысах-самках массой 200–220 г путем двухдневного перорального введения «Вольтарена» фирмы Novartis в дозе 50 мг/кг в виде водной суспензии. Были исследованы следующие субстанции, полученные из травы бархатцев распростертых: сухой экстракт в дозе 100 мг/кг, водорастворимые полисахариды (ВРПС) в дозе 100 мг/кг, пектины в дозе 50 мг/кг и липофильная фракция (ЛФ) в дозе 60 мг/кг. В качестве препаратов сравнения использовали «Плантаглюцид» в дозе 250 мг/кг и облепиховое масло в дозе 5 мл/кг. Вещества вводили интрагастрально за пять дней до

введения «Вольтарена» [4] и затем на фоне воспроизведения поражения СОЖ. Контрольной группе животных вводили такой же объем растворителя. Эвтаназию животных проводили через 24 часа в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по охране позвоночных животных. Желудок вскрывали по большой кривизне, промывали 0,9%-ным физиологическим раствором натрия хлорида. Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию ТБК-активных продуктов в гомогенате желудка [10] и сыворотке крови [11]; состояние антиоксидантной системы (АОС) СОЖ оценивали по содержанию восстановленного глутатиона (GSH) [5] в гомогенате, активности каталазы, глутатион-S-трансферазы в постъядерной фракции и общей антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови. В СОЖ определяли содержание белка по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера [8]. Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с использованием критерия (*t*) Стьюдента.

Результаты исследования

Для идентификации флавоноидов в сухом экстракте бархатцев распростёртых использовали различные реактивы. В результате взаимодействия с трёххлористой сурьмой наблюдали жёлтое окрашивание, с раствором аммиака при нагревании флавоноиды дают характерное окрашивание при нагревании, переходящее в оранжевое. Цианидиновая проба привела к появлению красного окрашивания. Кроме того, в качестве реактивов мы предлагаем применять железа (III) хлорид, алюминия хлорид, в результате чего были получены окрашенные комплексные соединения, а также цветные реакции с натрия нитритом и образование азокрасителя. Хроматографическое исследование (метод ТСХ) показало наличие в сухом экстракте из цветков бархатцев нескольких флавоноидов. Применение метода ТСХ оказалось предпочтительным для идентификации флавоноидов в системе: бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5) с использованием свидетелей, которыми являлись достоверные стандартные образцы кверцетина и рутина. В результате проведённых исследований установили количественное содержание суммы флавоноидов в объекте исследования. Расчёт содержания суммы флавоноидов проводили с использованием значения удельного показателя поглощения для продукта взаимодействия кверцетина с алюминия хлоридом (764,6). Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчёте на кверцетин в сухом экстракте составило 3,95%. Относительная погрешность определения равна $\pm 2,3\%$.

Биохимический анализ слизистой оболочки желудка и сыворотки крови крыс показал, что у контрольных животных наблюдалось достоверное снижение содержания ТБК-активных продуктов желудка на 59%, но было повышено содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови на 106%. Известно, что среди факторов, приводящих к

уменьшению сопротивляемости слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при воздействии ulcerогенных агентов, одно из ведущих мест принадлежит снижению концентрации S H-соединений, особенно восстановленного глутатиона [3], что отмечалось и в нашем эксперименте. Наблюдалось снижение содержания в желудке GSH на 54% по отношению к нормальному уровню, значительное падение активности антиперекисного фермента – каталазы на 54%, уменьшение активности важнейшего фермента детоксикации глутатион-S-трансферазы на 64%, а также регистрировалось падение АОА сыворотки крови на 43%.

Таким образом, при вольтареновой язве желудка у крыс выявлено снижение как неферментативного, так и ферментативного звеньев антиоксидантной защиты, а также падение интенсивности и процессов ПОЛ. Последнее, вероятнее всего, явилось следствием первичной активации ПОЛ в более ранние сроки повреждения слизистой желудка, что подтверждается, например, сохранившимся повышенным уровнем ТБК-активных продуктов в сыворотке крови.

Таблица 1 – Изменение показателей ПОЛ и АОС желудка при введении субстанций из цветков бархатцев распротертых на фоне вольтареновой гастропатии у крыс

Группы животных n=6	Показатели					
	ТБК-активные продукты сыв. крови, нмоль/мг белка	ТБК-активные продукты СОЖ, мкмоль/л	АОА сыв. крови, %	Глутатион-S-трансфераза, нмоль/мг белка	GSH, мг/г	Каталаза уд. акт/мг белка
Интактные	1,16±0,01	0,22±0,013	89,0±3,20	25,14±0,29	2,6±0,13	0,24±0,016
Контроль	2,4±0,16 ⁺ +106%	0,09±0,01 ⁺ -59%	50,7±3,89 ⁺ -43%	16,2±1,23 ⁺ -64%	1,2±0,07 ⁺ - 54%	0,11±0,010 ⁺ -54%
Сухой экстракт, 100 мг/кг	1,28±0,19* -47%	0,18±0,025* +100%	86,7±2,10* +71%	21,53±1,06 +33%	2,2±0,14 +83%	0,19±0,015 +73%
ВРПС, 100 мг/кг	3,13±0,24*+30%	0,11±0,032	70,0±3,16* +38%	18,32±0,67 ⁺	1,9±0,11* +58%	0,18±0,02* +64%
Пектины, 50 мг/кг	1,44±0,29 -40%	0,18±0,011* +100%	69,0±2,61* +36%	20,56±1,42* +27%	1,6±0,14* +33%	0,19±0,005* +73%
ЛФ, 60 мг/кг	2,54±0,5 ⁺	0,16±0,027* +78%	81,2±2,47* +60%	21,2±0,56* +31%	2,0±0,09* +67%	0,22±0,01* +100%
Плантаглюцид, 250 мг/кг	2,6±0,26 ⁺	0,12±0,018 ⁺	79,7±1,56* +57%	17,22±0,34 ⁺	1,8±0,16* +50%	0,14±0,031 ⁺
Облепиховое масло, 5 мл/кг	1,21±0,24* -50%	0,1±0,007 ⁺	64,0±3,29* +26%	18,55±1,67 ⁺	1,25±0,07 ⁺	0,17±0,023* +55%

* – $P_k < 0,05$ по отношению к контролю;

⁺ – $P_i < 0,05$ по отношению к интактным значениям;

n – количество животных в группе.

После предварительного введения сухого экстракта в дозе 100 мг/кг и пектинов в дозе 50 мг/кг отмечалась практически полная нормализация содержания ТБК-активных продуктов в крови и желудке, GSH, каталазы в желудке и АОА в крови (табл. 1). Под влиянием ЛФ отмечалась почти полная нормализация активности каталазы, достоверно увеличились уровень GSH и глутатион-S-трансферазы на 67% и 31% соответственно, также увеличились уровень ТБК-активных продуктов крови и АОА на 78% и 60% соответственно. При введении ВРПС все исследуемые биохимические показатели оказались практически на уровне контроля. Препарат сравнения плантаглюцид показал увеличение уровня АОА крови и GSH на 57% и 50% соответственно, а под влиянием облепихового масла отмечалась практически полная нормализация содержания ТБК-активных продуктов в крови, уровень каталазы увеличился на 55%.

Среди изученных субстанций наиболее эффективное влияние на интенсивность ПОЛ и активность основных компонентов эндогенной АОС желудка показал сухой экстракт, введение которого в большей степени, чем применение других субстанций, оказало гастрозащитное действие при вольтареновой язве. В результате его лечебно-профилактического применения в дозе 100 мг/кг выявлена нормализация всех исследуемых показателей состояния про/антиоксидантного равновесия, повышая тем самым резистентность слизистой желудка к ulcerогенному воздействию.

Заключение

1. С помощью химических реакций и методом ТСХ подтверждено наличие рутина и кверцетина в сухом экстракте бархатцев распротёртых.

2. Методом дифференциальной спектрофотометрии с раствором алюминия хлорида установлено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчёте на кверцетин (3,95%).

3. При вольтареновой язве желудка происходит снижение активности как окислительных процессов, так и механизмов антиоксидантной защиты.

4. Введение исследуемых субстанций по лечебно-профилактической схеме на фоне вольтареновой гастропатии способствует устранению тех сдвигов, которые наблюдались в системе ПОЛ/АОЗ, и по эффективности своего действия наиболее значимым оказался сухой экстракт в дозе 100 мг/кг.

5. Применение сухого экстракта в дозе 100 мг/кг в большей степени по сравнению с другими субстанциями оказало нормализующее влияние на систему глутатиона, что способствует восстановлению активности антиоксидантных и детоксикационных процессов в клетках желудка.

Список литературы

1. Беликов В.В., Точкова Т.В., Колесник Н.Т. Избирательный метод анализа флавоноидов в фитохимических препаратах // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств : тезисы докл. науч. конф. – М. : Медицина, 1991. – С. 15–16.

2. Горбачева А.В. Противоязвенные свойства настоя надземной части *Filipendula ulmaria* (L.) maxim // Растительные ресурсы. – 2002. – Вып. 2. – С. 114–119.

3. Даминов Ш.Н., Иноятова Ф.Х. Сравнительная оценка действия кваматела и омеза на систему глутатиона различных отделов пищеварительной системы при экспериментальной язве двенадцатиперстной кишки // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т. 61. – № 4. – С. 26–28.

4. Каминка М.Э. Противоязвенное действие производных фуросанопиримидина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67. – № 3. – С. 30–33.
5. Методы биохимических исследований / под ред. М.И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
6. Савенко И.А. Фармакологическое исследование влияния когитума на моделируемую патологию желудка крыс // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 123–125.
7. Саушкина А.С., Бандюкова В.А., Вергейчик Е.Н. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных формах на его основе // Материалы 51 регион. конф. по фармации, фармакологии и подготовке кадров. – Пятигорск, 1996. – С. 93.
8. Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – 392 с.
9. Терехов А.Ю. Изучение защитного действия биологически активных веществ из цветков tagetes patula при экспериментальных токсических поражениях печени : автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Пятигорск, 2006. – 24 с.
10. Ohkawa H., Ochihi N., Vagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 95. – № 2. – P. 351–358.
11. Uchiyama M., Mihara M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 94. – № 86. – P. 271–278.

Рецензенты:

Ивашев М.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВПО «Пятигорская ГФА» Минздравсоцразвития России, г. Пятигорск.

Погорелый В.Е., д.б.н., профессор кафедры фармакологии и патологии ФГБОУ ВПО «Пятигорская ГФА» Минздравсоцразвития России, г. Пятигорск.