

© Коллектив авторов, 2009

В. Н. Федоров<sup>1</sup>, Н. В. Пунегова<sup>1</sup>, В. Г. Зайнуллин<sup>2</sup>, В. В. Пунегов<sup>2</sup>,  
Р. Л. Сычев<sup>2</sup>

## ПОЛУЧЕНИЕ СУБСТАНЦИИ ЭКДИСТЕРОН-80 ИЗ *Serratula coronata* L. И ОЦЕНКА ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ. II. КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА. ВЛИЯНИЕ СУБСТАНЦИИ НА ГОРМОНАЛЬНО-МЕДИАТОРНЫЙ БАЛАНС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

<sup>1</sup> Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль, Россия;

<sup>2</sup> Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

В экспериментах на животных (белые крысы) установлено, что субстанция “Экдистерон-80” обладает благоприятным нейрогормональным профилем при экспериментальной хронической сердечной недостаточности (ХСН), поскольку сглаживает, а по ряду показателей полностью устраняет выраженность гормонально-медиаторного дисбаланса, характерного для ХСН. Кроме того, исследуемая субстанция достоверно снижает летальность животных и предупреждает развитие гипертрофии миокарда. Результаты исследований могут быть использованы как в научных исследованиях, так и при освоении технологии производства субстанции нового фармацевтического препарата, содержащего экдистероиды *S. coronata* и обладающего ярко выраженными адаптогенными, гастропротекторными и антигипоксическими (см. сообщение I) и кардиопротективными свойствами.

**Ключевые слова:** экдистерон-80, кардиопротекторное действие

Результаты исследований, приведенные в сообщении I, свидетельствуют о том, что “Экдистерон-80” обладает адаптогенной активностью. В качестве индикатора адаптационных реакций организма можно рассматривать сердечно-сосудистую систему, функционирование которой поддерживается механизмами нейроэндокринной регуляции и, в частности, уровнем обмена нейрогормонов и медиаторов. По данным литературных источников фитоэкдистероиды являются перспективными препаратами в терапии болезней кровеносной системы: при критических состояниях они препятствуют развитию тахикардии, эффективны при ишемической болезни сердца и на начальных этапах артериальной гипертензии [1]. С учетом вышеизложенного в данной работе проведено исследование кардиопротекторной активности субстанции “Экдистерон-80” на модели экспериментальной хронической сердечной недостаточности (ХСН). Кроме того, в работе отражены результаты исследований указанной субстанции методами ЯМР-спектроскопии.

### Экспериментальная химическая часть

В исследованиях применялась субстанция фитоэкдистероидов *Serratula coronata* L. “Экдистерон-80”, получение которой отражено в сообщении I. Образец партии исследуемой субстанции был изучен методами ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц) и <sup>13</sup>C (100 МГц) “Экдистерона-80” в растворе пиридина-d<sub>5</sub> регистрировали на спектрометре “Bruker

DRX-400” в ЦКП “Спектроскопия и анализ органических соединений” Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, пиридин-d<sub>5</sub>), δ, м.д.: 1,06 (д, 3H, J 6,25 Гц, 19-CH<sub>3</sub>), 1,21 (с, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1,40 (д, 6H, J 7,10 Гц, 26-CH<sub>3</sub>, 27-CH<sub>3</sub>), 1,61 (д, 3H, J 8,28 Гц, 21-CH<sub>3</sub>), 2,27 – 1,78 (м, 14H, 1-CH<sub>2</sub>, 4-CH<sub>2</sub>, 11-CH<sub>2</sub>, 12-H<sub>c</sub>, 15-CH<sub>2</sub>, 16-H, 23-CH<sub>2</sub>, 24-CH<sub>2</sub>), 2,71 – 2,30 (м, 2H, 12-H<sub>a</sub>, 16-H<sub>a</sub>), 3,18 – 2,98 (м, 2H, 5-H, 17-H), 3,61 (с, 1H, 9-H), 3,90 (д, 1 H, J 9,97 Гц), 4,50 – 4,15 (м, 2H, 2-H<sub>a</sub>, 3-H<sub>a</sub>), 6,27 (д, 1 H, J 2,10 Гц, 7-H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, пиридин-d<sub>5</sub>), δ, м.д.: 17,87 (с, 1C, 18-C), 21,05 (с, 1C, 11-C), 21,42 (с, 1C, 16-C), 21,63 (с, 1C, 21-C), 24,39 (с, 1C, 19-C), 27,37 (с, 1C, 23-C), 29,84 (с, 1C, 26-C), 30,07 (д, 1C, J 6,77 Гц, 27-C), 31,64 (с, 1C, 15-C), 31,97 (с, 1C, 12-C), 32,41 (с, 1C, 4-C), 34,41 (с, 1C, 9-C), 37,79 (с, 1C, 1-C), 38,66 (с, 1C, 10-C), 42,51 (с, 1C, 24-C), 48,07 (с, 1C, 13-C), 50,07 (с, 1C, 17-C), 51,36 (с, 1C, 5-C), 68,06 (с, 1C, 3-C), 68,12 (д, 1C, J 12,30 Гц, 2-C), 69,78 (с, 1C, 25-C), 76,94 (д, 1C, J 7,94 Гц, 20-C), 77,62 (с, 1C, 22-C), 84,25 (с, 1C, 14-C), 121,64 (с, 1C, 7-C), 166,35 (с, 1C, 8-C), 203,91 (с, 1C, 6-C). Соотнесение сигналов в ЯМР-спектрах субстанции “Экдистерон-80” выполняли на основании литературных данных [1] и электронного справочника [2].

### Экспериментальная фармакологическая часть

Анализ кардиопротекторной активности “Экдистерона-80” проводили на 168 крысах-самцах массой

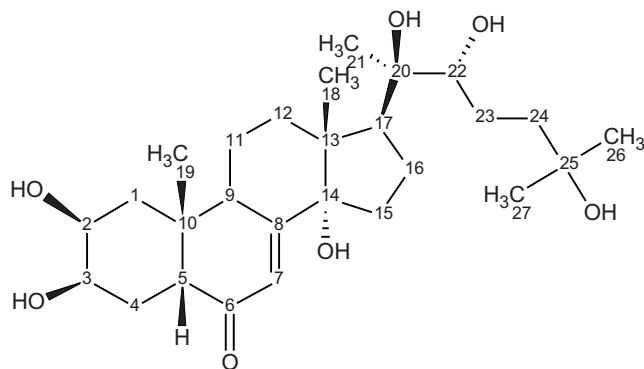


Рис. 1. Химическая структура 20-гидроксиэкдизона

тела 180 – 200 г. Все животные содержались в одинаковых условиях вивария на стандартном рационе питания. ХСН по тотальному типу моделировали введением крысам в обе плевральные полости по 2,5 мл силиконового масла (из расчета 1,5 мл на 100 г веса животного в каждую плевральную полость) [3]. Через 30 дней вводили еще по 1 мл масла в каждую плевральную полость. Дробное введение масла позволяет воспроизвести динамический процесс и постепенное углубление тяжести патологии, характерное для ХСН. Исследуемое вещество вводили внутрижелудочно в дозе 20 мг/кг в течение 60 дней, начиная со второго месяца эксперимента. Контрольные животные в те же сроки получали вместо препарата дистиллированную воду. По истечении курса лечения (90 дней эксперимента) у животных определяли вес сердца и вычисляли весовые коэффициенты (вес сердца в мг, деленный на вес крысы в г). В крови и сердце флюориметрическим методом (спектрофлюориметр “Hitachi” MPF-4, Япония) исследовали содержание катехоламинов (адреналин, норадреналин, дофамин), гистамина, серотонина и 11-оксикортикостероидов.

Уровень адреналина, норадреналина, дофамина определяли дифференциально-флюориметрическим методом [4], основанном на окислении йодом адреналина, норадреналина и дофамина с образованием флюоресцирующих продуктов. Флюоресценцию адреналина и норадреналина измеряли при длине волны возбуждения 360 нм и флюоресценции 520 нм, дофамина — при 330 и 376 нм соответственно. Флюоресценцию опытных проб сравнивали с флюоресценцией определенных разведений кристаллического адреналина, норадреналина и дофамина. Концентрацию кате-

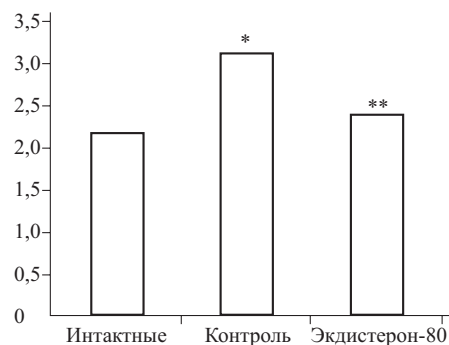


Рис. 2. Содержание 11-ОКС в крови крыс с экспериментальной ХСН: \* — достоверная разница ( $p < 0,05$ ) с интактной группой; \*\* — достоверная разница ( $p < 0,05$ ) с контрольной группой

холаминов в крови выражали в мкг/мл, в сердце — мкг/г.

Определение содержания гистамина и серотонина проводили методом, основанном на измерении флюоресценции продуктов конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, а серотонина — с нингидрином [4]. Флюоресценцию гистамина измеряли при длине волны 470 нм и возбуждении светом с длиной волны 365 нм, серотонина при 490 и 365 нм соответственно. Расчет производили по флюоресценции стандартных растворов. Для приготовления стандартов использовали гистамина дигидрохлорид фирмы “ICN” (США) и серотонинкреатинсульфат фирмы “Reanal” (Венгрия). Содержание гистамина и серотонина в крови и сердце выражали в мкг/мл и мкг/г.

Для определения 11-оксикортикостероидов применяли методику [4], основанную на том, что экстрагированные из плазмы крови 11-оксикортикостероиды (11-ОКС) флюоресцируют после обработки проб смесью концентрированной серной кислоты и этилового спирта. Флюоресценцию измеряли при длине волны 550 нм и возбуждении светом длиной волны 475 нм. Для определения концентрации 11-ОКС (в мкг/мл) использовали стандартную пробу, которую обрабатывали как и опытную.

Все вычисления производили на компьютере по программе “Биостатистика” для Windows [5]. Количество определений каждого показателя в различных опытах составляло 8 – 22. Для межгрупповых сравнений использовали критерий  $t$  Стьюдента (при наличии нормального распределения) и непараметрический критерий Уилкоксона (при его отсутствии), для мно-

Таблица 1

Влияние средства “Экдистерон-80” на содержание КА в крови крыс с ХСН

Группа животных	Кровь, мкг/мл			Сердце, мкг/г		
	адреналин	норадреналин	дофамин	адреналин	норадреналин	дофамин
Интактные	0,155 ± 0,01	0,317 ± 0,03	0,133 ± 0,01	1,442 ± 0,05	4,044 ± 0,27	1,022 ± 0,11
ХСН (контроль)	0,273 ± 0,02*	0,433 ± 0,03*	0,107 ± 0,01*	1,685 ± 0,03*	1,504 ± 0,08*	0,376 ± 0,03*
Лечение экдистероном	0,158 ± 0,01**	0,349 ± 0,02**	0,165 ± 0,02**	2,253 ± 0,03*/**	4,187 ± 0,43**	0,467 ± 0,05*

Здесь и в табл. 2, 3: \* — достоверная разница ( $p < 0,05$ ) с интактной группой; \*\* — достоверная разница ( $p < 0,05$ ) с контрольной группой.

жественных сравнений использовали критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Использовали критерий  $\chi^2$  [5].

Опыты проводили в соответствии с действующими “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и “Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных” [6].

### Результаты и их обсуждение

В составе субстанции “Экдистерон-80” преобладает 20-гидроксиэкдизон (81 – 86 %) (рис.1). Двумя другими мажорными компонентами являются 25S-инокостерон (8 – 11 %) и  $\alpha$ -экдизон (5,9 – 9,8 %). В связи с этим в спектрах ЯМР субстанции преобладают сигналы, характерные для 20-гидроксиэкдизона.

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  в области 1,0 – 1,61 м.д. проявляются 4 интенсивных сигнала атомов водорода метильных групп как боковой цепи 20-гидроксиэкдизона, так и стероидного скелета. В области 1,78 – 2,27 м.д. находятся сигналы большинства атомов водорода метиновых и метиленовых групп; в интервале 2,3 – 2,7 м.д.-сигналы атомов водорода при 16-С и 12-С; в интервале 3,0 – 3,2 м.д.-мультиплет сигналов атомов водорода при 5-С и 17-С. В области 6,3 м.д. проявляются сигналы атомов водорода винильной группы при 7-С. В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  одной из наиболее характерных групп сигналов, присущих стероидам с  $\Delta^7$ -6-кетогруппировкой, являются сигналы в области 203,9 м.д. (6-С), 121,64 м.д. (7-С) и 166,35 м.д. (8-С). Остальные сигналы, как правило, расположены в области 15 – 84,5 м.д., характерной для поглощения атомов углерода в насыщенных углеводородах. В наиболее сильное поле смещены сигналы углеродных атомов метильных групп (18 – 30 м.д.) (18-С, 19-С, 21-С, 26-С, 27-С) и метиленовых групп (11-С, 16-С, 23-С). Поглощение энергии остальными метиленовыми и метиновыми углеродными атомами регистрируется в более слабом поле. Смещение в слабое поле претерпевают в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  сигналы углеродных атомов с присоединенными гидроксильными группами. В 20-гидроксиэкдизоне и других фитоэкдистероидах сигналы от соответствующих углеродных атомов (2-С, 3-С) лежат в интервале 68 – 69 м.д. Атомы углерода 22-С со вторичной гидроксильной группой поглощают энергию при 77,6 м.д., в то время как углеродные атомы, содержащие третичную гидроксильную группу (14-С,

20-С, 25-С), поглощают соответственно при 84,2, 7,69 и 69,8 м.д.

Наличие в составе субстанции “Экдистерон-80” 25S-инокостерона проявляется присутствием дополнительных линий низкой интенсивности (м.д.): 36,64 (с, 0,15С, 25-С), 67,25 (с, 0,16С, 26-С). О присутствии в субстанции  $\alpha$ -экдизона свидетельствуют в спектре  $^{13}\text{C}$  ЯМР линии низкой интенсивности (м.д.): 13,63 (с, 0,05С, 21-С), 42,94 (с, 0,04С, 20-С), 74,02 (с, 0,05С, 22-С).

Результаты фармакологических исследования показали, что в группе животных с экспериментальной ХСН имело место достоверное увеличение весовых коэффициентов сердца на 10 %, а смертность крыс достоверно увеличилась по сравнению с интактными с 2,5 до 28,2 %. Данные процессы протекали на фоне выраженного нейрогормонального дисбаланса, который прежде всего касался функций симпатoadренальной системы. У животных с модельной патологией наблюдалось выраженное нарушение обмена катехоламинов (табл. 1): отмечалось значительное повышение концентрации адреналина (АД) и норадреналина (НА) в крови (на 46 и 37 %) и снижение ее в сердце в 3,2 и 2,7 раза. Содержание дофамина (ДА) падало как в крови, так и в сердце на 20 и 63% соответственно.

Увеличение содержания АД и НА в крови и сердце на начальных этапах развития ХСН является адаптационным: возбуждая  $\beta_1$ -рецепторы сердца, они оказывают положительное влияние на инотропную функцию миокарда, воздействуя на рецепторы сосудистой стенки — поддерживают приемлемый уровень артериального давления. Однако по мере прогрессирования ХСН рост концентрации адреналина в миокарде, из-за его цитоповреждающего действия, перерастает из положительного явления в отрицательное, и становится фактором, усиливающим тканевую гипоксию, ишемию миокарда и энергетический дефицит [7]. Длительное его воздействие на  $\beta_1$ -рецепторы сердца приводит к их десенситизации и, следовательно, к еще большему снижению его сократительной функции [7], а повышение концентрации  $\beta_2$ -рецепторов — к увеличению аритмогенной готовности миокарда. За счет активации катехоламинами  $\beta_1$ -рецепторов юкстагломерулярного аппарата почек происходит повышение активности ренин-ангиотензиноподостероидной системы и повышение концентрации интракардиального ангиотензина II [8, 9]. Сосудистый компонент компенсации со временем также теряет приспособительную роль, становясь автономным порочным кругом: за счет активации

Таблица 2

### Содержание ГТ и СТ в крови и сердце крыс с экспериментальной ХСН

Группа животных	Кровь, мкг/мл		Сердце, мкг/г	
	гистамин	серотонин	гистамин	серотонин
Интактные	0,073 ± 0,01	0,071 ± 0,03	0,378 ± 0,04	0,466 ± 0,10
ХСН (контроль)	0,099 ± 0,01*	0,089 ± 0,01	0,605 ± 0,05*	1,014 ± 0,11*
Лечение экдистероном	0,095 ± 0,01*	0,077 ± 0,03	0,440 ± 0,04**	0,987 ± 0,06*

$\alpha_1$ -адренорецепторов сосудистой стенки увеличивается периферическое сопротивление и, следовательно, повышается пост- и преднагрузка на сердце.

В крови больных крыс содержание 11-ОКС достоверно увеличилось на 44 % (рис. 2). Повышение содержания глюкокортикоидов на фоне ХСН в определенной степени можно считать компенсаторной реакцией, т.к. они активируют синтез миокардиальных белков и увеличивают уровень кальция в кардиомиоцитах пропорционально их действующей концентрации, что способствует повышению насосной функции сердца. С другой стороны, естественные глюкокортикоиды обладают минералокортикоидной активностью и увеличивают уровень натрия и объем циркулирующей крови, а также потенцируют действие катехоламинов на сосудистую стенку, способствуя нарастанию периферического сопротивления сосудистой стенки [10].

В ходе эксперимента установлено, что в крови животных на фоне ХСН по сравнению с интактной группой происходит возрастание содержания гистамина на 36 % и серотонина на 60 %. Наблюдалось также увеличение концентрации серотонина в сердце больных животных (табл. 2). Известно, что гистамин посредством стимуляции  $H_1$ - и  $H_2$ -рецепторов эндотелия способствует выделению эндотелий-релаксирующего фактора и снижению периферического сопротивления сосудистой стенки, а следовательно, постнагрузки на миокард, и, расширяя мелкие сосуды, способствует депонированию крови и снижает преднагрузку. С другой стороны, его высокие концентрации в крови приводят к нарушению проницаемости сосудистой стенки и отеку тканей, возрастанию вязкости и коагуляционного потенциала плазмы [11]. Увеличение уровня гистамина в миокарде (на фоне снижения содержания в нем катехоламинов) носит явно выраженный компенсаторный характер, так как гистамин, возбуждая  $H_2$ -рецепторы, оказывает положительное инотропное действие [11]. Аритмогенное действие гистамина несколько уменьшает его позитивную роль. Серотонин оказывает прямое положительное хронотропное и инотропное действие, тормозит обратный захват норадреналина [12], поэтому увеличение содержания серотонина в миокарде при ХСН также является компенсаторным явлением. Напротив, рост его концентрации в плазме крови играет негативную роль. В условиях ХСН на фоне дисфункции эндотелия серотонин увеличивает сосудистое сопротивление и постнагрузку на миокард.

Кроме того, он вызывает венострикцию, приводит к усилению венозного возврата и повышению преднагрузки [13]. Серотонин также стимулирует образование и секрецию альдостерона и АКТГ [12], ускоряет переход фибриногена в фибрин и, отсюда, способствует тромбообразованию [14].

Введение субстанции “Экдистерон-80” в условиях экспериментальной ХСН оказывало явно выраженное терапевтическое воздействие, наиболее значимым проявлением которого было снижение летальности больных животных за трехмесячный период наблюдения в 1,7 раза и предупреждение развития гипертрофии миокарда (табл.3). Эти процессы происходили на фоне положительных сдвигов в обмене исследуемых гормонов и медиаторов. Так, под влиянием “Экдистерона-80” наблюдалась практически полная нормализация содержания НА во всех изучаемых структурах организма крыс и АД, и ДА в крови. В сердце по сравнению с контрольной группой содержание АД и ДА повысилось на 34 и 24 % соответственно.

Таким образом, использование препарата привело к снижению в крови количества вазоспастических катехоламинов АД и НА и повышению концентрации вазодилатирующего ДА, что привело к снижению постнагрузки и облегчению работы сердца. В целом, это уменьшило отрицательное влияние циркуляторного компонента на прогрессирование ХСН.

“Экдистерон-80” также препятствовал значительному нарастанию содержания 11-ОКС в крови больных крыс и нормализовал уровень СТ в крови и ГТ — в сердце. Уровень серотонина в сердце оставался умеренно повышенным.

Эксперимент показал, что курсовое применение субстанции “Экдистерон-80” на фоне ХСН снижает летальность животных, гипертрофию сердечной мышцы и оказывает благоприятное действие на соотношение активности внутрисосудистых вазоконстрикторов/вазодилататоров, препятствуя тем самым нарастанию гормонально-медиаторного дисбаланса во всех исследуемых тканях. Это позволяет сделать вывод, что сумма экдистероидов изучаемого препарата оказывает кардиопротекторное действие в условиях патологии миокарда.

Работа поддержана частично Программой Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Ахрем, Н. В. Ковганко, *Экдистероиды. Химия и биологическая активность*, Наука и техника, Минск (1989), сс. 38 – 125, 292 – 294.
2. <http://ecdybase.org> R. Lafont, I. Harmatha, F. Marion-Poll, et al., *The ecdysone handbook*, 3rd ed. (2002).
3. В. Н. Федоров, А. В. Яльцев, О. В. Данилова и др., *Патол. физиол. и эксперим. тер.*, № 3, 7 – 9 (2005).
4. В. С. Камышников, *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика*, Интерпрессервис, Минск (2003), Т. 2.
5. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Бином, Москва (1999).
6. *Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных*, Хроника ВОЗ, 39(3), 3 – 96 (1985).

Таблица 3  
Смертность и весовой коэффициент сердца у крыс с экспериментальной ХСН

Группа	Смертность животных за 90 дней, %	Весовой коэффициент сердца
Интактные	2,5	2,58 ± 0,05
Контроль (ХСН)	28,2*	2,83 ± 0,05*
Лечение экдистероном (с 30-го дня)	16,3	2,45 ± 0,07**

7. Г. П. Арутюнов, А. К. Рылова, *Кардиология*, № 12, 59 – 61 (2000).
8. Б. Г. Катцунг, *Базисная и клиническая фармакология*, Бинном, Москва (1998), Т. 1.
9. Ю. М. Лопатин, *Сердеч. недостаточность*, 3(1), 20 – 21 (2003).
10. J. Warter, J. Vilguin, C. Tranchant, et al., *J. Neurol.*, **237**(1), 101 (1990).
11. П. В. Сергеев, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **62**(1), 65 – 69 (1999).
12. Т. Г. Каревина, И. М. Шевчук, *Патол. физиол. и эксперим. тер.*, № 1, 27 – 29 (1998).
13. P. M. Vanhoutte, *Progr. in Pharmacol.*, № 7, 27 – 32 (1990).
14. Л. А. Валеева, П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **60**(6), 57 – 61 (1997).

Поступила 12.07.2007

**EXTRACTION OF ECDYSTERON-80 SUBSTANCE FROM *Serratula coronata* AND ASSESSMENT OF ITS PHARMACOLOGICAL ACTION. PART II: CARDIOPROTECTIVE PROPERTIES. INFLUENCE OF THE SUBSTANCE ON THE HORMONAL MEDIATOR BALANCE UNDER THE CONDITIONS OF CHRONIC HEART FAILURE**

V. N. Fedorov<sup>1</sup>, N. V. Punegova<sup>1</sup>, V. G. Zainullin<sup>2</sup>, V. V. Punegov<sup>2</sup>, and R. L. Sychov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russia;

<sup>2</sup> Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Experiments on white rats showed that Ecdysteron-80 substance extracted from *Serratula coronata* L. exhibited a favorable neurohormonal action in animals with experimental chronic heart failure (CHF). The drug alleviated and, with respect to some parameters, completely eliminated the manifestations of hormonal mediator disbalance characteristic of CHF. In addition, the substance reliably reduced the lethality of animals and prevented the development of a hypertrophy of the myocardium. The results of this study can be used both in scientific research and for the development of a production technology of the parent substance for new pharmaceutical preparations containing ecdysteroids of *Serratula coronata* L. possessing strongly pronounced adaptogenic, gastroprotective, and antihypoxic (previously reported) and cardioprotective properties.

**Keywords:** ecdysteron-80, extraction, cardioprotective properties