

18. Сыров В.Н., Хушбактова З.А., Комарин А.С. и др. Экспериментальная и клиническая оценка эффективности экдистена в лечении гепатита // Эксперим. клин. фармакол. 2004. Т. 68. № 5. С. 56–59.

19. Zheng W.W., Yang D.T., Wang X.J. et al. Hsc70 binds to ultraspiracle resulting in the upregulation of 20-hydroxyecdysone-responsive genes in *Helicoverpa*

armigera // Mol. Cell. Endocrinol. 2010. V. 315. № 1-2. P. 282–291.

20. Banski P., Mahboubi H., Kodiha M. et al. Nuclear targeting of the chaperone HSC70 is regulated by stress, cell signaling and a composite targeting signal which is controlled by autoinhibition // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 28. P. 21858–21867.

УДК 612.111: 577.25: 581.198:547.918

Гематопротекторное действие экдистероидсодержащей субстанции Серпистен

© 2012. Н. А. Мойсеенко¹, к.б.н., доцент, Ж. Е. Иванкова¹, к.б.н., доцент,
Е. Н. Репина¹, к.б.н., доцент, В. В. Володин², д.б.н., зав лабораторией,

¹ Сыктывкарский государственный университет,

² Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
e-mail: volodin@ib.komisc.ru

Исследовано влияние экдистероидсодержащего препарата Серпистен на показатели крови лабораторных животных (крысы, кролики) в норме и при вызванных гемолитической (фенилгидразин) и постгеморрагической (кровопускание) анемиях. Установлено, что на фоне гемолитической анемии у крыс введение Серпистена снижает уровень ретикулоцитоза по сравнению с животными, которым вводился гемолитик, сдвигая его к уровню интактных животных. В крови при этом было уменьшено число эритроцитов с тельцами Гейнца, а также количество ауторозеток. Показано, что в условиях гемолитической анемии введение Серпистена улучшает показатели фагоцитарной активности и суммы поглощенных клеток. Аналогичные эффекты Серпистена наблюдали и в экспериментах на кроликах с кровопусканием. Серпистен может рассматриваться как потенциальное гематопротекторное средство.

The effect of ecdysteroid containing preparation *Serpisten* on blood indices of laboratory animals (rats, rabbits) in norm and induced hemolytic (phenylhydrazine) and post-hemorrhagic anemia is studied. It is found that on the background of hemolytic anemia in rats the introduction of *Serpisten* reduces reticulocytosis as compared with the animals, treated with hemolytic poison, reduces number of erythrocytes with Heinz bodies, as well as number of autorosettes. It is shown that in condition of hemolytic anemia introduction of *Serpisten* improves phagocytic activity and the total sum of absorbed cells. Similar effects of *Serpisten* were observed in the experiments on rabbits with bloodletting. *Serpisten* can be considered as a potential hematoprotective remedy.

Ключевые слова: анемия, фенилгидразин, эритроцит, лейкоцит, ретикулоцит, тельца Гейнца, осмотическая резистентность, гемоглобин, фагоцитоз, фитоэкдистероиды, Серпистен

Keywords: anemia, phenylhydrazine, erythrocyte, leukocyte, reticulocyte, Heinz bodies, osmotic resistance, hemoglobin, phagocytosis, phytoecdysteroids, *Serpisten*

Фитоэкдистероиды – полигидроксированные стероидные соединения, структурно близкие гормонам линьки и метаморфоза насекомых, обладающие фармакологическим действием на млекопитающих и человека. Известно более 250 различных экдистероидов, найденных в растениях. Наиболее перспективными в качестве источников экдистероидов являются растения из родов *Serratula* (Astraceae) и *Silene* (Caryophyllaceae) [1]. Мы

исследовали действие на показатели крови экдистероидсодержащей субстанции Серпистен (*далее* – Серпистен), которая была выделена из надземной части растений серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН (зав. лаб. проф. В.В. Володин) [2]. Состав субстанции: 20-гидроксиэкдизон (20E) – 80, инокостерон – 11, экдизон – 4% и другие минорные

компоненты. К настоящему времени ещё не выявлен весь спектр благоприятного фармакологического действия фитоэкдистероидов, а также не установлен полностью механизм их действия у теплокровных животных.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния Серпистана на показатели крови лабораторных животных (крысы, кролики) в норме и при вызванных гемолитической (фенилгидразин) и постгеморрагической (кровопускание) анемиях.

Материал и методы

Материалом исследования служила смешанная артерио-венозная кровь, которую брали методом тотального обескровливания путем декапитации (крысы) на фоне легкого хлороформного наркоза, стабилизировали гепарином в разведении 1:1 в 0,9% NaCl. У кроликов кровь для текущего анализа брали пункцией краевой вены уха в объеме 1,0-1,3 мл, при кровопускании – 20% общего её объема, исходя из расчёта 5,4% массы тела [3].

Параметры красной и белой крови определяли известными в лабораторной и клинической практике методами [4]. Концентрацию ретикулоцитов (Рт) определяли пробирочным методом Гейльмейера с учетом возрастных стадий созревания клеток. Одновременно определяли количество клеток с тельцами Гейнца. Щелочерезистентность гемоглобина (Нб) определяли по Зингеру [5] в нашей модификации: резистентность Нб определяли в течение более длительного времени (3, 5, 10 и более мин) в том случае, если требовался больший период времени действия денатурирующего агента, в качестве которого использовался гидроксид натрия; в работе использовали 5% гемолизаты эритроцитов (Эр). Электрофоретические свойства Нб определяли электрофорезом в вертикальных блоках, полиакриломидного геля – по Г. Мауреру [6] в модификации для химической полимеризации гелей (система № 1). Кислотную резистентность Эр определяли по И.И. Гильтезону и И.А. Терскову [7], используя 0,002 н HCl и отслеживая процесс гемолиза Эр каждые 15 с. Осмотическую резистентность Эр определяли унифицированным методом с использованием раствора хлорида натрия с убывающей (интервал 0,05%) концентрацией от 0,9 до 0,2% в известной модификации Л.И. Идельсона. Резервные возможности поверхностной мембраны и осморегуляции лейкоцитов определяли по методу М. З. Федоровой и В.Н. Левина [8]. Диаметры эритроци-

тов и лейкоцитов измеряли прямым микроскопическим методом под масляной иммерсией с помощью микрометра окулярного винтового МОВ-1 [5]. Морфо-функциональные характеристики Эр и лейкоцитов (размеры, форма, площадь поверхности) определяли расчётным путем [4, 5]. Число розеткообразующих клеток определяли по методу Д. И. Бельченко [9]. Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов определяли методом дрожжевого фагоцитоза [10]. Адгезионные свойства лейкоцитов определяли по методу Л. Г. Зайцева [11]. Гемолитическую анемию вызывали двух-трёхкратными подкожными инъекциями 2,5% раствора фенилгидрозина (ФГ) в 0,9% NaCl [12]. В работе использовали 0,3% раствор Серпистана в физиологическом растворе. Инъецировали внутримышечно по 5–20 мкг/кг (до анемизации животных и на фоне анемии). Физиологический раствор (0,9% водный раствор NaCl) использовали в качестве плацебо (контроль).

Результаты и обсуждение

Показано, что в ответ на введение ФГ или кровопускание в крови крыс и кроликов соответственно отмечаются снижение концентрации Эр, Нб и показателя гематокрита по сравнению с интактными, что указывает на развитие анемии. Это повлекло за собой снижение вязкости крови и увеличение скорости оседания Эр. Указанные изменения наиболее выражены в ответ на введение гемолитического яда, слабее – в ответ на введение ФГ на фоне предварительных инъекций Серпистана и наименее – на кровопускание. При гемолитической анемии в крови существенно ($p < 0,001$) увеличивается количество телец Гейнца, которые представляют собой преципитат денатурированных под влиянием ФГ липидов и белков поверхностных мембран Эр и содержащегося в них Нб [13 – 15], т. е. являются гемотоксическим эффектом действия этого гемолитического яда. Доля Эр с тельцами Гейнца является индикатором глубины анемии. В связи с этим интересно отметить, что в случае развития гемолитической анемии на фоне предварительного введения Серпистана доля Эр с тельцами Гейнца оказывается существенно ниже ($p < 0,01$), чем в случае реакции только на введение ФГ – $43,5 \pm 1,8$ и $89,5 \pm 1,5\%$ соответственно. Это подтверждает вышеуказанное предположение о менее глубокой анемизации крыс в случае, если анемия развивалась на фоне предварительных инъекций Серпи-

стена. В этом мы видим гематопротекторное и адаптогенное действие Серпистена, в основе которых лежит его мембраностабилизирующее действие [1]. В зимний период названные эффекты более выражены, нежели в летний, что, по-видимому, является отражением сезонных перестроек поверхностных мембран Эр.

Кроме того, в ответ на введение ФГ в крови крыс наблюдается резкое увеличение количества ауторозеток ($p < 0,001$). Феномен ауторозеткообразования заключается в прилипании Эр к моно- и гранулоцитам с образованием структур, напоминающих розетки. Они способствуют освобождению крови от патологически измененных, поврежденных или стареющих Эр [9]. Инъекции Серпистена приводят к снижению в крови крыс количества ауторозеток, что свидетельствует о «нормализации» состояния поверхностных мембран Эр и, как результат, меньшей подверженности их действию гемолитического яда ФГ.

Свидетельством повреждения мембраны при действии ФГ является также снижение осмотической резистентности Эр, при этом в крови отчетливо выделяются популяции Эр с низкой устойчивостью к гипотонической среде (рис. 1). Предварительные инъекции плацебо или Серпистена приводили к тому, что осмотическая резистентность Эр в ответ на инъекции ФГ практически не изменялась по сравнению с интактными животными. При этом резистентность Эр при действии Серпистена более близ-

ка к значениям, полученным для интактных животных, по сравнению с действием физиологического раствора. Этот факт можно считать проявлением адаптивного и мембраностабилизирующего действия субстанции. В аналогичных экспериментах с лейкоцитами показано, что в ответ на ФГ «резервные возможности» их поверхностных мембран используются максимально. В итоге большое количество клеток погибает. В ответ же на введение Серпистена, независимо от дозы, мембранный резерв используется неполно, т. е. Серпистен оказывает мембраносберегающее действие через стабилизацию мембран.

Благоприятным прогнозом выхода из состояния анемии является увеличение в крови доли незрелых Эр – Рт, концентрация которых является показателем интенсивности работы органов кроветворения. Особенно сильно увеличивается доля Рт в ответ на ФГ: с 15–23 (группа интактных животных) до 176–360‰ (группа опытных животных с вызванной гемолитической анемией), т. е. в 8–18 раз. В крови появляются Рт II стадии зрелости по Гейльмейеру (рис. 2), которые отсутствуют у интактных животных, свидетельствуя о значительной интенсификации кроветворения. Введение Серпистена снижает уровень ретикулоцитоза по сравнению с животными, которым вводился только ФГ, сдвигая его к уровню интактных (адаптивный эффект Серпистена). При этом «нормализация» уровня Рт сильнее выражена

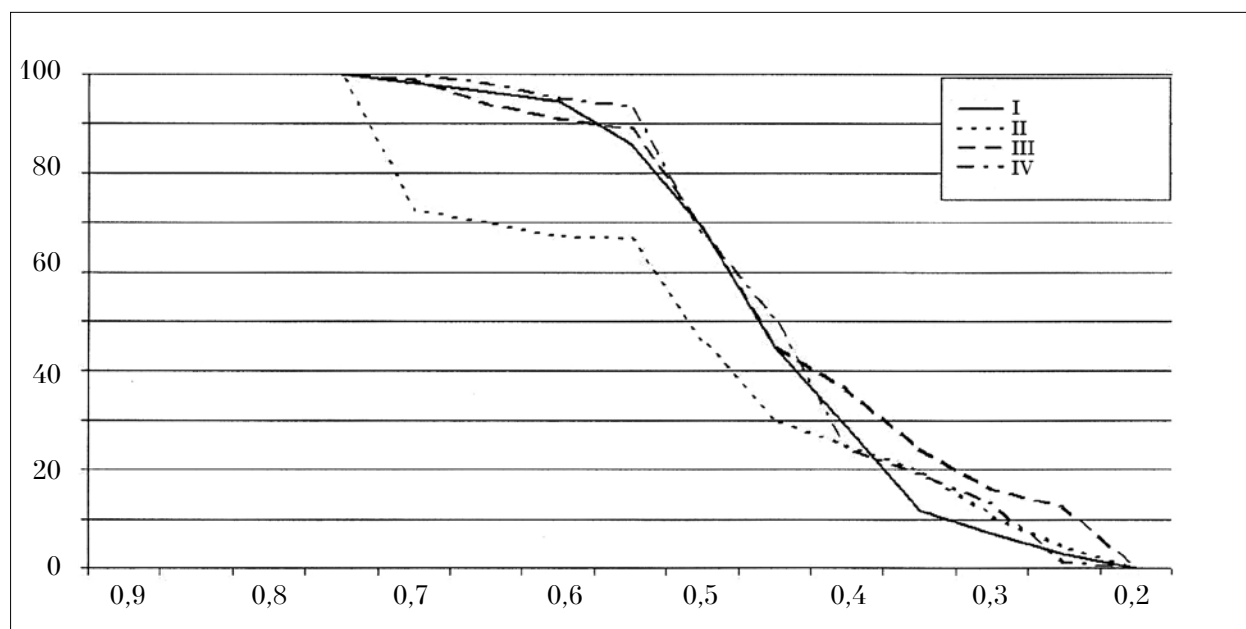


Рис. 1. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс.

Условные обозначения: I – интактные, II – фенилгидразин, III – Серпистен + фенилгидразин, IV – фенилгидразин в физиологическом растворе. По оси абсцисс – концентрация растворов NaCl, %. По оси ординат – количество резистентных клеток, %

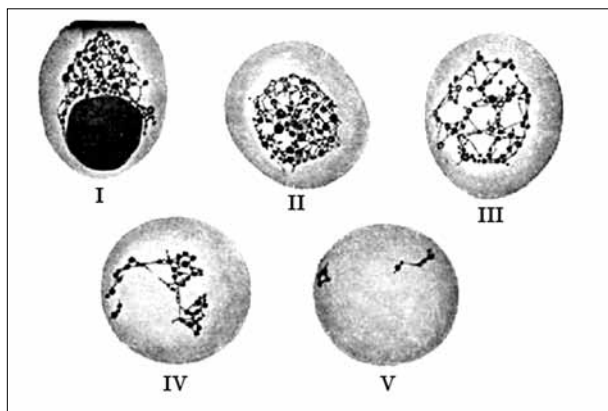


Рис. 2. Ретикулоциты. Римскими цифрами обозначены стадии зрелости по Гейльмейеру

в тех опытах, в которых Серпистен вводили до введения ФГ, т. е. анемизация животных оказывалась менее глубокой (мембраностабилизирующий эффект). В крови при этом не отмечали Рт II стадии зрелости, уменьшено число Эр с тельцами Гейнца и количество ауторозеток. Всё это – свидетельства нормализации состояния Эр и лейкоцитов и их поверхностных мембран через стабилизацию. В любом варианте анемизации отмечено ускорение созревания Рт, о чем судили по сдвигу возрастной ретикулоцитарной формулы влево, в сторону более молодых форм, и уменьшению в крови доли более зрелых клеток. Изменения состояния клеток сказываются на их функциях, а также на физико-химических и функциональных свойствах содержания в них Hb.

Нами проведён анализ изменения показателей фагоцитоза крыс Wistar под действием Серпистена на фоне гемолитической анемии (ФГ при введении в дозе 7,5 мг/кг двукратно). Как и ожидалось, фагоцитарная активность лейкоцитов существенно снижается при действии ФГ (табл.). Однако, если ФГ вводили на фоне предварительной инъекции Серпистена

(20 мг/кг), то его гемолитический эффект не проявлялся, по-видимому, вследствие нормализации структурно-функциональной организации поверхностной мембраны под действием изучаемого препарата. Более того, показатели фагоцитарной активности и суммы поглощённых клеток в группе животных, получавших Серпистен, даже превышают уровень интактных. Наблюдаемые явления мы рассматриваем как одновременное проявление мембраностабилизирующего и стимулирующего фагоцитарную активность лейкоцитов действия Серпистена. Кроме того, показано что под влиянием Серпистена снижаются адгезионные способности лейкоцитов, что, в свою очередь, должно приводить к улучшению микроциркуляции крови.

Параллельно изменениям свойств поверхностной мембраны Эр изменяются физико-химические характеристики Hb. В опытах *in vitro* показано, что обработка цельных Эр крыс раствором ФГ приводит к снижению относительной электрофоретической подвижности всех фракций Hb по сравнению с интактными (рис. 3). При сочетанном действии ФГ и 20Е наблюдали противоположный эффект: электрофоретическая подвижность всех фракций Hb повышалась. Аналогичный эффект наблюдали и при обработке эритроцитарной массы только раствором 20Е, причём он более выражен, чем в присутствии ФГ: относительная электрофоретическая подвижность всех семи фракций Hb увеличивалась. Сочетанное действие Серпистена и ФГ даёт тот же эффект, что и собственно Серпистен, т. е. мембрана Эр в присутствии Серпистена не реагирует на гемолитический яд. Обработка же гемолизатов (водных растворов Hb) либо не изменяет, либо незначительно изменяет подвижность фракций. Отсюда следует, что изменения зарядных свойств Hb обусловлены, пре-

Таблица
Показатели фагоцитоза самцов (верхняя строка) и самок (нижняя строка) крыс Wistar при действии фенилгидразина и Серпистена

Показатель, %	Группа		
	А	Б	В
Фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов	44,2 ± 0,4	28,2 ± 0,9**	55,9 ± 2,7** ^a
	44,4 ± 1,5	27,6 ± 4,1*	67,7 ± 5,8* ^a
Сумма поглощённых клеток	94,4 ± 3,6	64,5 ± 2,0**	138,3 ± 12,9* ^a
	135,1 ± 3,6	66,6 ± 9,2*	162,4 ± 11,8
Фагоцитарный индекс	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2
	3,0 ± 0,8	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,5

Примечание: А – интактная, Б – фенилгидразин, В – фенилгидразин + Серпистен. В каждой группе было по восемь самцов и восемь самок. Разница с интактными животными достоверна при **p* < 0,01 и ***p* < 0,001; с фенилгидразиновой группой – при ^a*p* < 0,01.

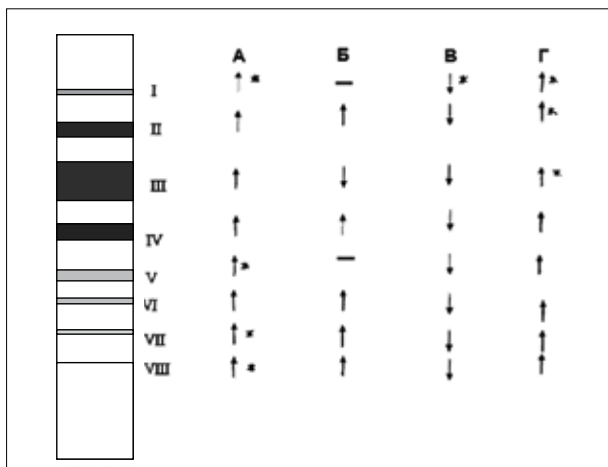


Рис. 3. Схема электрофореза гемоглобина (Hb) крысы. Римскими цифрами обозначены номера анодных фракций гемоглобина согласно их подвижности в электрическом поле; стрелками – направления изменения электрофоретической подвижности фракций. Изменения электрофоретической подвижности фракций Hb животных опытных групп по сравнению с интактными животными достоверны (*) ($p < 0.05$). Прочерк – изменений нет
 Условные обозначения: А – эритроцитарная масса с добавлением 20Е, Б – гемолизат с добавлением 20Е; В – эритроцитарная масса, обработанная фенолгидразином (ФГ), Г – эритроцитарная масса, обработанная смесью 20Е и ФГ.

жде всего, изменениями поверхностной мембраны, с которой молекулы Hb связаны структурно [16], т. е. Серпистен оказывает отчетливое мембраностабилизирующее действие не только в условиях *in vivo*, но и *in vitro*. При этом изменяется и щелочерезистентность Hb, свидетельствуя об изменении конформации молекул. Любопытно, что изменения щелочерезистентности противоположны изменениям электрофоретической подвижности. Изменения физико-химических свойств Hb должны сказываться на его функциональных свойствах.

Аналогичные эффекты Серпистена наблюдали и в экспериментах на кроликах с кровопусканием. Нами показано, что в этих условиях, по сравнению с интактными животными, происходит ускорение восстановления всех показателей крови после дозированной кровопотери. Концентрация Эр восстанавливается уже к девятому, а Hb и Рт – к 15 дню с ускорением созревания последних, тогда как без инъекции Серпистена восстановление концентрации Hb происходит только к 18-21, а Рт – к 28 дню. Кривые осмотического и кислотного гемолиза Эр, отслеживаемые через каждые три дня после кровопотери, на фоне Серпистена имеют гораздо меньший разброс. Ретикулоцитоз также плавно нарастал, достигая миниму-

ма к девятому дню, а затем так же постепенно снижался. В целом же следует отметить, что явление анемизации при кровопускании выражено гораздо слабее, чем при действии гемолитического яда.

Таким образом, Серпистен может рассматриваться как потенциальное гематопротекторное средство, прежде всего, при гемолитических анемиях, благодаря стабилизации мембран Эр, а также как средство, облегчающее выход организма из патологического состояния анемии благодаря гематостимулирующему и активирующему фагоцитоз действию.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 12-П-4-1023: «Научные основы создания адаптогенных и георпротекторных средств растительного происхождения»).

Литература

1. Фитоэкдистероиды / Под ред. В.В. Володина. СПб.: Наука 2003. 293 с.
2. Патент № 2153346, Российская Федерация, МКИЗ А61К35/78. Способ получения экдистероидов / В.В., Володин, С.О. Володина; Институт биологии Коми НЦ УрО РАН; № 99106351/14; заявл. 29.03.99; опубл. 27.07.2000. Бюл. № 21.
3. Западнюк И.П., Западнюк В.И. Захария Е.А. Лабораторные животные. Киев: Выща школа, 1974. 304 с.
4. Лабораторные методы исследования / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 369 с.
5. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София. 1963. 665 с.
6. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриломидном геле. М.: Мир, 1971. 215 с.
7. Гительзон И.П., Терсков И.А. Метод кислотных эритрограмм // Биофизика. 1957. Вып. 2. С. 259–266.
8. Федорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клиническая диагностика. 1997. № 11. С. 9. Бельченко Д.И. Внутрисосудистое ауторозеткообразование при гемолитической анемии // Гематол. трансфузиол. 1992. № 4. С. 23–25.
10. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987. 472 с.
11. Зайцев Л.Г. Комплексный анализ гемореологических профилей у мужчин и женщин при разных функциональных состояниях организма: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 2000. 32 с.
12. Стародуб Н.Ф. Изучение свойств фракций гемоглобина крыс // Биохимия. 1974. Т. 39. № 4. С. 757–761.

13. Василенко Н.М. Действие ксенобиотиков на систему крови // Общая токсикология. М.: Медицина, 2002. С. 258–259.

14. Packer L. Nitric oxide part B physiological processes // Methods Enzymol. 1996. V. 269. P. 66–78.

15. Gross P. Biological activity of hydroxyl-amine // CRC Crit. Rev. Toxicol. 1985. V. 14. P. 87–99.

16. Молчанова Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям // Гематол. трансфузиол. 1989. № 7. С. 32–41.

УДК 612.111: 577.25: 581.198:547.918

Антиагрегационное и стресс-лимитирующее действие экдистероидсодержащей субстанции Серпистен

© 2012. Н. Б. Петрова¹, к.б.н., доцент, В. В. Володин², д.б.н., зав. лабораторией,

¹ Сыктывкарский государственный университет,

² Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

e-mail: nbp1959@yandex.ru

Исследовано действие эдкдистероидсодержащего препарата Серпистена и преднизолона на агглютинабельность и адренореактивность эритроцитов и состояние симпато-адреналовой системы крыс в покое и при иммобилизационном стрессе. Показано, что при введении за 24 ч до иммобилизации у крыс Серпистен способствует сохранению исходной агглютинабельности и адренореактивности эритроцитов и препятствует чрезмерной активации симпато-адреналовой системы. У человека двухнедельный прием Серпистена приводит к стимуляции эритропоэза и снижению десенситизации клеточных мембран к действию катехоламинов. В обоих случаях применение Серпистена приводит к снижению ответа на стрессорное воздействие.

Effects of edysteroid containing preparation Serpisten and prednisolone on erythrocytes agglutinability and adrenoactivity and also condition of sympatho-adrenal system in dormantlcy and in the state of immobilization stress are studied. In comparison with prednisolone Serpisten promotes preservation of the original level of adrenoactivity of erythrocytes and prevents excessive activation of sympatho-adrenal system when introduced in rats 24 hours prior to immobilization. In humans, a 2-week course of nutritional intake off Serpisten leads to stimulation of erythropoiesis and reduction of desensitization of the cell membrane to the action of catecholamines. In both cases stress response is reduced.

Ключевые слова: симпато-адреналовая система, адренореактивность, реакция агглютинации эритроцитов, фитоэкдистероиды, Серпистен

Keywords: sympatho-adrenal system, adrenoactivity, erythrocyte agglutinability reaction, phytoecdysteroids, Serpisten

В последнее десятилетие возрос интерес к использованию при различных патологиях и дизадаптивных состояниях препаратов природного происхождения – адаптогенов, обладающих в большинстве случаев малой токсичностью и широким спектром регулирующих эффектов. Одним из новых адаптогенных средств является Серпистен, представляющий собой смесь очищенных эдкдистероидов из растения серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) [1]. К настоящему времени показан ряд положительных эффектов Серпистена на физиологические функции млекопитающих. В литературе имеется достаточно дан-

ных, указывающих на существенную роль вегетативной нервной системы и её адренергического звена в регуляции системы крови на стрессорные воздействия, а также неоспоримо значение адренергической системы для реализации эффекта адаптогенов [2]. Однако механизмы её участия для проявления эффектов фитоэкдистероидов неизвестны.

Цель настоящей работы – охарактеризовать свойства эритроцитарной мембраны (агглютинабельность, адренореактивность) и состояние симпато-адреналовой системы у млекопитающих (крыса, человек) при действии стрессорных факторов и их возможную кор-