

УДК 615.32:615.244

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА «ГЕКСАФИТ»

¹Ферубко Е.В., ^{1,2}Зеленков В.Н., ³Лапин А.А., ⁴Литвинов С.Д., ¹Даргаева Т.Д.

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений», Москва

²Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства, Верея, Московская область

³ФГБОУ ВО «Казанский энергетический университет», Казань

⁴Частное учреждение образовательная организация высшего образования
«Медицинский университет «Реавиз», Самара

Резюме. Цель исследований – определение антиоксидантной активности растительных средств для создания лекарственного препарата для лечения заболеваний гепатобилиарной системы. Определение суммарной антиоксидантной активности сбора растительного происхождения «Гексафит», состоящего из цветков *Helichrysum arenarium* L. и *Tanacetum vulgare* L., плодов *Rosa* sp., листьев *Urtica dioica* L. и мяты *Mentha piperita* L., корней *Glycyrrhiza glabra* L. и его отдельных компонентов проводили методом кулонометрического титрования. Антиоксидантную активность «Гексафита» в ранее установленной дозе 250 мг/кг изучали в условиях экспериментального тетрахлорметанового гепатита, для оценки свободнорадикального окисления липидов использовали метод хемилюминесцентного анализа липидов. Показано, что сбор желчегонного действия и входящие в него растения обладают антиоксидантной активностью *in vitro*. Впервые в эксперименте выявлен синергический эффект по проявлению суммарной антиоксидантной активности сбора. Установлено, что при фармакотерапии экспериментального гепатита у крыс посредством назначения «Гексафита» наблюдали значительное снижение хемилюминесцентных показателей липидов, характеризующие интенсивность свободнорадикальных реакций. «Гексафит» оказывает выраженное ингибирующее действие на гиперлипидпероксидацию в печени животных при токсическом ее повреждении. Установленная антиоксидантная активность растительных средств может иметь значение для использования в лечении и профилактике заболеваний билиарной системы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Ключевые слова: растительные средства, антиоксидантная активность, кулонометрический метод, хемилюминесцентный анализ липидов.

Для цитирования: Ферубко Е.В., Зеленков В.Н., Лапин А.А., Литвинов С.Д., Даргаева Т.Д. Исследование антиоксидантной активности растительного сбора «Гексафит» // Вестник медицинского института «Реавиз». – 2020. – № 3. – С. 99–105.



ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE HERBAL COMPOSITION 'HEXAFIT'

¹Ferubko E.V., ^{1,2}Zelenkov V.N., ³Lapin A.A., ⁴Litvinov S.D., ¹Dargaeva T.D.

¹Federal State Budgetary Scientific Institution 'Russian Research Institute
of Medicinal and Aromatic Plants', Moscow

²Russian Research Institute of Vegetable Growing. Vereya, Moscow region

³Federal State Budgetary Institution of Higher Education 'Kazan power engineering University,' Kazan

⁴Private Institution of Higher Education 'Medical University 'Reaviz,' Samara

Abstract. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of herbal medications in order to develop a drug for the treatment of hepatobiliary disorders. We measured total antioxidant activity of the herbal composition 'Hexafit' containing flowers of *Helichrysum arenarium* L. and *Tanacetum vulgare* L., fruits of *Rosa* sp., leaves of *Urtica dioica* L. and mint *Mentha piperita* L., roots of *Glycyrrhiza glabra* L. and its individual components using coulometric titration. The antioxidant activity of "Hexafit" at a previously established dose of 250 mg/kg was evaluated under experimental conditions of carbon tetrachloride-induced hepatitis; free radical lipid oxidation was assessed using a chemiluminescent assay. We found that this herbal composition with choleric action and the plants included in it have antioxidant activity *in vitro*. For the first time, the experiment demonstrated a synergistic effect of the total antioxidant activity of the composition. We revealed that pharmacotherapy of experimental hepatitis in rats with 'Hexafit' ensured a significant decrease in the chemiluminometric parameters of lipids that characterize the intensity of free radical reactions. 'Hexafit' has a pronounced inhibitory effect on hyperlipoperoxidemia in the liver of animals with toxic damage. The antioxidant activity of herbal medications can be successfully used for the treatment and prevention of hepatobiliary disorders.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. The authors received no external funding for this work.

Key words: herbal medicines, antioxidant activity, coulometric analysis, chemiluminescent analysis of lipids.

To cite: Ferubko E.V., Zelenkov V.N., Lapin A.A., Litvinov S.D., Dargaeva T.D. Assessment of the antioxidant activity of the herbal composition 'hexafit' // Bulletin of Medical University Reaviz. – 2020. – № 3. – P. 99–105.

Введение

К числу распространенных заболеваний гастродуоденальной зоны относят холецистит. При длительном течении воспалительного процесса в желчном пузыре развиваются функциональные и органические изменения в печени [1].

Как известно заболевания желчного пузыря и желчевыводящих путей имеют характер хронического течения с сезонными обострениями. В этой связи для профилактики и лечения целесообразно применение лекарственных средств растительного происхождения [2, 3].

Арсенал лекарственных средств растительного происхождения, обладающих желчегонной активностью, невелик и представлен препаратами фламин, калефон,

хофитол, аллохол и др. [4]. Таким образом, поиск и разработка новых эффективных многокомпонентных средств желчегонного действия является актуальным.

Учитывая данное обстоятельство, нами разработан состав желчегонного средства: цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), плоды шиповника (*Rosa* sp.), листья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), листья мяты (*Mentha piperita* L.), корни солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.) [5].

Антиоксидантные свойства растительных средств обеспечиваются за счет комплекса природных веществ, извлекаемых из растительного сырья: эфирные масла, аминокислоты, водорастворимые полиса-

хари́ды, органические кислоты, фенольные соединения, гликокозиды терпеновых соединений, водорастворимые витамины и т.д. [6].

Исходя из этого, целью исследований явилось определение антиоксидантной активности сбора желчегонного действия и созданного на его основе многокомпонентного растительного экстракта под условным названием «Гексафит» для создания лекарственного препарата для лечения заболеваний гепатобилиарной системы.



Рис. 1. Цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) из биологической коллекции ФГБНУ ВИЛАР

Образец навеской 0,60 г заливали кипятком 60 мл (соотношение 1:100) и перемешивали на магнитной мешалке 15 минут. После охлаждения и отстаивания, аликвоту водного экстракта 0,1 см³ вводили в ячейку кулонометра пипеточным дозатором в 10-кратной повторности. В качестве стандарта использовали спиртовой раствор рутина (Ru), который используют в качестве эталона при определении суммарной антиоксидантной активности (САОА) методом кулонометрического титрования по сертифицированной методике МВИ-01-00669068-13 в пересчете на стандартный образец Ru [7, 8] через модальное значение (моду Mo) из 10 определений на сертифицированном приборе «Эксперт-006-антиоксиданты». Относительная ошибка определения САОА

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследований использовали сбор для лечения заболеваний гепатобилиарной системы следующего состава: цветки бессмертника песчаного – 300 г (рис. 1), цветки пижмы обыкновенной – 100 г, плоды шиповника – 100 г, листья крапивы двудомной – 100 г, листья мяты – 50 г, корни солодки – 50 г, и входящие в него растения. Растения взяты из биологической коллекции ФГБНУ ВИЛАР.

(Е отн.) при испытании исследованных нами образцов находилась в пределах 1,25–3,70 %. САОА определяли в г Ru в пересчете на 100 сухого (с.о.) или абсолютно сухого (а.с.о.) образцов.

На основе сбора получен экстракт сухой под условным названием «Гексафит». Экстракт получен при совместном экстрагировании компонентов горячей водой 75–85 °С. В нем содержатся полисахариды, флавоноиды, каротиноиды, органические кислоты, витамины, макро- и микроэлементы, эфирные масла и другие природные соединения. Стандартизация экстракта проводилась по сумме флавоноидов в пересчете на лютеолин-стандарт и изосалипурпозид – стандарт. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-

стандарт не менее 4 %. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид – стандарт не менее 15 % [5].

Изучение антиоксидантной активности экстракта выполнено в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах», «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Эксперименты выполнены на 150 нелинейных крысах-самцах с исходной массой 180–200 г. Животных получали из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России и содержали в условиях вивария со свободным доступом к корму и воде. Фармакологические исследования проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей», Приказу МЗ РФ за № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Дизайн исследований одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

Антиоксидантную активность «Гексафита» в ранее установленной дозе 250 мг/кг изучали в условиях экспериментального тетрахлорметанового гепатита. Повреждение печени вызывали внутрижелудочным введением белым крысам 50 % масляного раствора тетрахлорметана (CCl_4) «Реахим» (Россия) в объеме 0,4 мл/100 г массы животного 1 раз в сутки в течение 4 дней [9]. Для оценки свободнорадикального окисления липидов был использован метод хемилюминесцентного анализа липидов. Спонтанную хемилюминесценцию липидов печени, индуцированное свечение гомогената из этого органа регистрировали на специальной квантометрической установке, предназначенной для измерения слабых световых потоков [10]. Липиды из ткани печени экстрагировали по методу Folch J. с соавторами [11] хлороформ-метаноловой смесью, свежеприготовленной в соотношении 2:1 по объему.

Результаты фармакологических исследований обрабатывали статистически с применением пакета программ Statistica 10. Вычисляли среднюю арифметическую (M), ошибку средней арифметической (m). Определение нормальности распределения переменных проводили на основании гистограмм распределения, величин асимметрии и эксцессы. Для оценки достоверности различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический t -критерий Стьюдента. Различия между сравниваемыми значениями считали значимыми при уровне вероятности 95 % и более ($p < 0,05$).

Для выявления эффектов синергизма и антагонизма (величины синергизма (b)), а в нашем случае приведенная величина CAOА ($\text{CAOA}^{\text{excess}}$) относительно расчетных ($\text{CAOA}_{\text{расчет.}}$) из величин исходных компонентов в % отн. рассчитывалась по формуле:

$$\text{CAOA}^{\text{excess}} = 100[(\text{CAOA}_{\text{найденная}} - \text{CAOA}_{\text{расчет.}}) : \text{CAOA}_{\text{расчет.}}].$$

Обсуждение результатов

Данные по определению CAOА сбора желчегонного действия и входящих в него растений представлены в таблице 1.

В CAOА сбора желчегонного действия наибольший вклад вносят биологически активные соединения цветков бессмертника песчаного, плодов шиповника. В результате исследований было установлено, что наибольшая CAOА отмечена в образцах бессмертника песчаного. Как видно из таблицы 1, расчет суммарного вклада всех растительных компонентов (столбец 5) дает показатель CAOА в 7,265 г рутина на 100 г лекарственного сбора. Расчет основан на предположении о свойстве аддитивности проявления антиоксидантных свойств компонентов, составляющих лекарственный сбор. Однако, определение CAOА лекарственного сбора желчегонного действия в эксперименте превышает расчетное значение CAOА на 28,12 % и соответствует значению $9,308 \pm 0,124$ г рутина на 100 г а.с.о. Это может говорить о проявлении синер-

гизма по показателю антиоксидантной активности всех растительных компонентов в составе лекарственного сбора желчегонного действия [12].

Полученные экспериментальные данные, возможно, позволят в будущем выяснить механизмы действия сбора желчегонного действия на системах *in vitro* и *in vivo* с учетом вклада каждого компонента сбора и проявлении ими в совокупности свойств аддитивности и синергизма.

Проведено изучение показателей хемилюминесценции липидов при введении «Гексафита» в экспериментально-терапевтической дозе 250 мг/кг в условиях модели экспериментального тетрахлорметанового гепатита крыс (табл. 2).

Предварительно крысы были распределены на группы: интактная (40 крыс); контрольная (40 крыс), опытная (40 крыс). Животным опытной группы вводили в желудок через зонд «Гексафит» в экспериментально-терапевтической дозе 250 мг/кг 1 раз в сутки в течение 10 дней, начиная со 2 дня после первого введения повреждающего агента. Животным контрольной группы вводили в эквивалентном количестве воду очищенную по аналогичной схеме. Животные интактной группы служили дополнительным контролем. Проведенный анализ хемилюминесценции липидов печени свидетельствовал о торможении перекисных процессов в органе под влиянием «Гексафита» (табл. 2).

Таблица 1. Суммарная антиоксидантная активность сбора желчегонного действия и входящих в него компонентов с учетом вклада по каждому компоненту

Объект исследований	Остаточная влажность, %	САОА в г рутина на 100 г а.с.о.	Содержание каждого компонента в сборе, в %	Вклад каждого компонента в САОА сбора, в г рутина на 100 г а.с.о.
1	2	3	4	5
Сбор желчегонного действия	6,1	9,308 ± 0,124	100	7,265 (сумма всех компонентов по расчету)
Цветки бессмертника песчаного	5,4	9,239 ± 0,123	42,86	3,965
Цветки пижмы обыкновенной	6,3	6,382 ± 0,105	14,28	0,912
Плоды шиповника	5,6	8,284 ± 0,119	14,28	1,183
Листья крапивы двудомной	10,4	2,510 ± 0,078	14,28	0,359
Листья мяты	7,2	6,413 ± 0,106	7,15	0,459

Таблица 2. Динамика изменений показателей хемилюминесценции липидов (в имп./сек) под влиянием «Гексафита» при экспериментальном CCl₄-гепатите у белых крыс, (M ± m)

Сроки исследования	Интактная, n = 40	Контрольная, (CCl ₄ + H ₂ O), n = 40	Опытная 1 (CCl ₄ + «Гексафит» 250 мг/кг), n = 40
7 сутки	38,0 ± 3,8	143,3 ± 12,8	105,8 ± 10,1*
14 сутки	34,0 ± 4,0	134,6 ± 16,0	83,0 ± 8,5*
21 сутки	40,0 ± 3,9	72,5 ± 8,8	73,0 ± 11,0
28 сутки	37,0 ± 5,0	68,3 ± 10,5	50,8 ± 3,2

Примечание: * – различия статистически значимы между контрольной и опытной группами при $p < 0,05$.

В частности, на 7 сутки течения экспериментального гепатита интенсивность слабого свечения липидов печени под влиянием «Гексафита» снижалась на 30,5 % по сравнению с уровнем хемилюминесценции липидов в соответствующем контроле, на 14 сутки на 38 %, а с 21 дня наблюдения не было выявлено статистически значимой разницы по данному показателю в опытной и контрольной группе животных. Таким образом, изучаемый многокомпонентный экстракт оказывает выраженное ингибирующее действие на гиперлипипероксидацию в печени животных при токсическом ее повреждении четыреххлористым углеродом, что согласуется с [13, 14].

В результате проведенных экспериментов установлено, что при хемилюминесцентном анализе липидов, выделенных из печени, обнаруживали угнетение процессов перекисного окисления, что является важным свидетельством антиоксидантного действия «Гексафита» в экспериментально-терапевтической дозе 250 мг/кг.

В целом установленная антиоксидантная активность сбора желчегонного действия и экстракта, полученного на его основе, может иметь значение для использования в профилактике и лечении заболеваний гепатобилиарной системы.

Выводы

1. Анализ полученных результатов показал, что сбор желчегонного действия и входящие в него растения обладают антиоксидантной активностью. Впервые в эксперименте выявлен потенцирующий эффект по проявлению суммарной антиокси-

дантной активности лекарственного сбора желчегонного действия, состоящего из следующих растительных лекарственных компонентов: цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), плоды шиповника (*Rosa* sp.), листья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), листья мяты (*Mentha piperita* L.), корни солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.). Показано, что показатель суммарной антиоксидантной активности лекарственного сбора, определенный экспериментально, на 28,12 % выше расчетного показателя, определенного как сумма вкладов всех показателей антиоксидантной активности, определенных экспериментально для каждого растительного компонента

2. Установлено, что при фармакотерапии экспериментального гепатита у крыс посредством назначения «Гексафита» в экспериментально-терапевтической дозе 250 мг/кг наблюдали значительное снижение хемилюминометрических показателей липидов, характеризующие интенсивность свободнорадикальных реакций. «Гексафит» оказывает выраженное ингибирующее действие на гиперлипипероксидацию в печени животных при токсическом ее повреждении четыреххлористым углеродом.

3. Установленная антиоксидантная активность сбора желчегонного действия и экстракта под условным названием «Гексафит», полученного на его основе, может иметь значение для использования в профилактике и лечении заболеваний гепатобилиарной системе.

Литература / References

1. Zabolevaniya zheludochno-kishechnogo trakta: rezultaty poslednih issledovanij i kommentarij / Datis Kharrazian et al. ; perevod V. Bochagova. – (Elektronnyj resurs). – Rezhim dostupa: applied-kinesiologiya.ru/book/107 (data obrasheniya: 06.04.2020).
2. Lekarstvennye rasteniya i bolezni pecheni: rukovodstvo po klinicheskoy fitoterapii / V.F. Kor-sun i dr. – M.: Prakticheskaya medicina, 2014. – 327 s.
3. Lubsandorzhiyeva P.-N.B. Razrabotka i standartizatsiya fitosredstv dlya lecheniya i profilaktiki zabolevanij organov pishhevareniya. – Ulan-Ude: Izd-vo BNC SO RAN, 2016. – 280 s.
4. Reestr <https://grls.rosminzdrav.ru/> (dostup 07.04.2020 god).

- 5 Patent 2700681 Rossijskoj Federacii. Sredstvo, obladayushee zhelchegonnoj aktivnostyu, i spo-sob ego polucheniya / Ferubko E.V., Nikolaev S.M., Dargaeva T.D. // BI 2019. № 26.
- 6 Agrawal A.D. Pharmacological activities of flavonoids: a review // Int. J. Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology. – 2011. – Vol. 4. – P. 1394–1398.
- 7 Zelenkov V.N., Lapin A.A Summarnaya antioksidantnaya aktivnost'. Metodika vypolneniya izmere-nij na kulo-nometricheskom analizatore. MVI-01-00669068-13. – Vereya, Moskovskoj obl., VNII ovoshchevodstva, 2013. – 19 s.
- 8 Lapin A.A., Romanova N.G., Zelenkov V.N. Primenenie metoda gal'vanostaticheskoy kulonomet-rii v opre-delenii antioksidantnoj aktivnosti razlichnyh vidov biologicheskogo syr'ya i produktov ih pererabotki. – M.: Izd-vo MSHA im. K.A. Timiryazeva, 2011. – 197 s.
- 9 Vengerovskij A.I., Uduť V.V., Rejhart D.V. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu gepato-protektivnoj aktivnosti lekarstvennyh sredstv. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. – M.: Izd-vo Grif i K., 2012. – Ch. I. – 832 s.
- 10 Vladimirov Yu.A. Svobodnye radikaly i antioksidanty // Vestnik RAMN. – 1988. – № 7. – S. 43–50.
- 11 Folch J., Less M., Sloane-Stanley A.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal // Journal of Biological Chemistry. – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.
- 12 Lapin A.A., Garifullin I.G., Zelenkov V.N. Biohimicheskoe issledovanie gepatoprotektornogo sbo-ra ras-titel'nogo proiskhozhdeniya // Butlerovskie soobshcheniya. – 2019. – T. 59, № 7. – S. 91-96. DOI: jbc-01/19-59-7-134.
- 13 Nikolaev S. M. Fitofarmakoterapiya i fitofarmakoprofilaktika zabolevanij. – Ulan-Ude: Izd-vo BGu, 2012. – 286 s.

Авторская справка

Ферубко Екатерина Владимировна

кандидат медицинских наук, заведующая отделом экспериментальной и клинической фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Москва, Россия
e-mail: eferubko@yandex.ru

Зеленков Валерий Николаевич

доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела биотехнологии и инновационных проектов, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Москва, Россия
e-mail: zelenkov-raen@mail.ru

Лاپин Анатолий Андреевич

кандидат химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Казанский энергетический университет», Казань, Россия
e-mail: lapinanatol@mail.ru

Даргаева Тамара Дарижаповна

доктор фармацевтических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела стандартизации и сертификации, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Москва, Россия

Литвинов Сергей Дмитриевич

доктор фармацевтических наук, профессор, Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия
e-mail: litar21@yandex.ru

Статья поступила 18.04.2020
Одобрена после рецензирования 06.05.2020
Принята в печать 22.05.2020

Received April, 18th 2020
Approved after reviewing May, 6th 2020
Accepted for publication May, 22nd 2020