

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО НА РАЗВИТИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

*Т.А. Попова<sup>1</sup>, Е.А. Музыко<sup>1</sup>, М.В. Кустова<sup>1</sup>, М.А. Быченкова<sup>2</sup>, В.Н. Перфилова<sup>1\*</sup>,  
И.И. Прокофьев<sup>1</sup>, М.А. Самойлова<sup>1</sup>, И.Н. Тюренков<sup>1</sup>, Г.М. Латыпова<sup>2</sup>, В.А. Катаев<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Волгоградский государственный медицинский университет,  
400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; эл. почта: vnperfilova@mail.ru

<sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

Показано, что экспериментальная хроническая сердечная недостаточность (ХСН), вызванная введением L-изопротеренола в дозе 2,5 мг/кг дважды в сутки внутривентриально в течение 21 дня, способствует разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток сердца, на что указывает снижение скорости потребления кислорода в метаболическом состоянии  $V_3$  по Чансу у животных с ХСН на 53,3% ( $p<0,05$ ) при использовании малата (субстрата окисления комплекса I цепи переноса электронов (ЦПЭ)), на 70,6% ( $p<0,05$ ) – сукцината (субстрата комплекса II ЦПЭ) и на 63,6% ( $p<0,05$ ) при их одновременном применении. Коэффициент дыхательного контроля (КДК) достоверно снижался в 2,3 раза для комплекса I, в 2,5 – для комплекса II и в 2,6 раза при одновременной работе двух комплексов дыхательной цепи у крыс с экспериментальной ХСН по сравнению с интактными животными. Митохондриальная дисфункция при экспериментальной ХСН, очевидно, обусловлена развитием окислительного стресса. Выявлено, что содержание малонового диальдегида (МДА) в группе крыс с экспериментальной ХСН, было выше на 54,7% ( $p<0,05$ ) по сравнению с показателями интактных животных. При этом суммарная активность супероксиддисмутазы (СОД) в контрольной группе была на 17,5% ( $p<0,05$ ), каталазы – на 18,4% ниже по сравнению с интактной группой. Густой экстракт из травы первоцвета весеннего (ГЭТПВ) ограничивает развитие митохондриальной дисфункции у крыс с экспериментальной ХСН, о чём свидетельствует повышение  $V_3$  для первого и второго комплексов дыхательной цепи на 77,2 ( $p<0,05$ ) и 114,6% ( $p<0,05$ ) соответственно, КДК – в 1,7 раза ( $p<0,05$ ) для комплекса I и в 2 раза ( $p<0,05$ ) для комплекса II по сравнению с негативным контролем. При этом концентрация МДА была на 15,7% ( $p<0,05$ ) ниже, а суммарная активность СОД на 56,3% ( $p<0,05$ ) выше.

**Ключевые слова:** хроническая сердечная недостаточность; митохондриальная дисфункция; окислительный стресс; густой экстракт из травы первоцвета весеннего

**DOI:** 10.18097/PBMC20186404334

### ВВЕДЕНИЕ

Сердечная недостаточность (СН) является многофакторным заболеванием и ассоциируется с генетическим, метаболическим, структурным и электрофизиологическим ремоделированием. Её развитие связано с прогрессирующими изменениями активности ионных каналов-транспортёров, формирующих потенциал действия, обеспечивающих обмен  $Ca^{2+}$ , сопряжение возбуждения и сокращения мышц, вызывающих снижение инотропной функции [1]. Кроме того, нарушаются внутриклеточные сигнальные пути, модулируемые активными формами кислорода (АФК), оксидом азота (NO) и  $Ca^{2+}$ , регулирующие функции кардиомиоцитов [2, 3]. В последнее время митохондриальная дисфункция рассматривается как важный фактор, способствующий развитию СН [4]. Показано, что функциональные (увеличение продукции активных форм кислорода, уменьшение поглощения  $Ca^{2+}$  и нарушение синтеза АТФ) и структурные изменения митохондрий связаны с СН [1, 5].

Генерация АФК существенно возрастает в повреждённом миокарде при ХСН [6]. Большинство их образуется при утечке электронов

из электрон-транспортной цепи на уровне комплексов I и III. Ещё одним важным источником АФК в сердце является NADPH-оксидаза. Описано пять изоформ фермента, четвертая локализуется в митохондриях кардиомиоцитов и участвует в продукции АФК при СН. Одним из вероятных механизмов их действия при ХСН является повреждение клеточных и митохондриальных структур: окисление миофибриллярных белков и снижение сократимости вследствие нарушения актин-миозиновых взаимодействий, ферментативных функций, чувствительности к  $Ca^{2+}$  [7]. АФК способны повреждать митохондриальную ДНК, а мутации в генах могут вызвать кардиомиопатию. Снижение уровня коактиватора 1-альфа гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом (peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC1 $\alpha$ ), может усугубить окислительный стресс и повреждение митохондрий, поскольку этот белок поддерживает митохондриальную антиоксидантную защиту, регулируя экспрессию СОД2 и тиоредоксина в митохондриях кардиомиоцитов [8]. В дополнение, АФК контролируют специфические сигнальные пути, приводящие к гипертрофии

и апоптозу [4], а также посттрансляционные модификации матриксных металлопротеаз, которые облегчают ремоделирование внеклеточного матрикса, вызывают фиброз сердца и дилатацию [9].

В связи с вышеизложенным, окислительный стресс может быть важной терапевтической мишенью для лечения СН. В последнее время наблюдается повышенный интерес к лекарственным растениям, поскольку многие из них обладают кардиозащитными механизмами.

Густой экстракт из травы первоцвета весеннего (лекарственного) (*Primula veris* L. или *Primula officinalis* (L.) Hill.) флоры Европейской части РФ содержит соединения фенольной природы, среди них идентифицированы перспективные для исследований флавоноиды, в том числе полиметоксилированные, обладающие антиоксидантной активностью [10].

Представлялось целесообразным изучить влияние густого экстракта из травы первоцвета весеннего на процессы ПОЛ, активность антиоксидантных ферментов и функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов животных с экспериментальной ХСН.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования явился полученный в лабораторных условиях фитопрепарат из травы первоцвета весеннего (*Primula veris* L.) – густой экстракт, ГЭТПВ (как наиболее оптимальная лекарственная форма, с содержанием максимального количества гидрофильных и липофильных соединений). Приготовление его осуществляли методом дробной мацерации в соответствии с Государственной фармакопеей [11]. Исследование компонентного состава сырья и экстракта, выделение биологически активных соединений (БАС) проводили методами тонкослойной и колоночной хроматографии.

Для выполнения хроматографии в тонком слое сорбента использовали пластинки Sorbfil (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ, ЗАО “Сорбполимер”, Россия). При исследовании качественного состава фенольных соединений методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) экспериментально были определены наиболее оптимальные системы растворителей: этилацетат – кислота уксусная ледяная – вода (5:1:1); кислота уксусная ледяная – кислота муравьиная концентрированная – хлороформ (10:2:2); *n*-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2), для чего были использованы реактивы марок “х.ч.” и “ч.д.а.”. Хроматограммы проявляли специфическим хромогенными реактивами (10% спиртовой раствор натрия гидроокиси, 5% спиртовой раствор алюминия хлорида с последующим нагреванием пластинки в сушильном шкафу  $t = 100-105^{\circ}\text{C}$  (2-3 мин), 0,1% раствор ванилина в кислоте серной с последующим нагреванием при  $t = 80^{\circ}\text{C}$  (3 мин) и рассматриванием в видимом и УФ-свете до и после проявлений проявителем [10].

Препаративное разделение БАС проводили методами дробной экстракции и колоночной

хроматографии с использованием силикагеля L 40/100 и L 100/110 мкм. Очистку фракций осуществляли на микроколонках с силикагелем L 40/100, полиамидом (“Wolem”, Германия). Процесс фракционирования БАС контролировали методами ТСХ, УФ-спектроскопии.

Индивидуальные БАС из исследуемых растений были выделены колоночной хроматографией на полиамидном сорбенте этанольно-хлороформными смесями с применением метода рехроматографии на микроколонках с полиамидным сорбентом (элюент – этанольно-водные смеси).

Структуру выделенных веществ определяли методами УФ, ЯМР  $^1\text{H}$ -, ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектроскопии, хроматографии, на основании физико-химических свойств, сравнением со стандартными образцами веществ. Фрагмент работы по идентификации основных групп БАС проведён совместно с Уфимским институтом химии Российской академии наук.

Электронные спектры поглощения определяли в области от 200 нм до 600 нм на спектрофотометре “Specord 40” (Германия) в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре “Bruker Avance III 500MHz” (США) при комнатной температуре в растворах дейтерохлороформа ( $\text{CDCl}_3$ ). Рабочая частота в МГц на протонах: 500 МГц. Калибровка прибора была выполнена на стандартном тестовом образце: форма линии (3% хлороформ ( $\text{CHCl}_3$ ), 0,2% тетраметилсилан (TMC), Ацетон- $d_6$ ), чувствительность на ядрах  $^1\text{H}$  (0,1% этилбензол,  $\text{CDCl}_3$ ). Соотношение сигнал-шум на стандартном тестовом образце (0,1% этилбензол в  $\text{CDCl}_3$ ) составляло  $\text{S/N} = 750:1$ . Для оригинальной лоренцевой линии сигнала хлороформа ширина на полувысоте составила 0,15 Гц на образце “Lineshape test sample” (3%  $\text{CHCl}_3$ , 0,2% TMC, Ацетон- $d_6$ ). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  регистрировали с параметрами: спектральная ширина 10,0 кГц, количество точек накопления 64К, количество проходов 8, время накопления 3,3 с, релаксационная задержка 5,0 с, длительность 90 импульса составила 11,5 мкс. Перед преобразованием Фурье спад свободной индукции был умножен на лоренцевую оконную функцию ( $\text{lb} = 1$  Гц).

Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  с развязкой от протонов переменной мощности (power-gated) с использованием составных импульсов WALTZ-16 были зарегистрированы при следующих условиях: спектральное окно – 29,8 кГц, количество точек – 64К, длительность возбуждающего импульса (30) – 3,2 мкс, релаксационная задержка – 0,9 с, количество проходов 256. Редактирование спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  проводили на основании эксперимента DEPT-135.

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчёте на рутин осуществляли методом дифференциальной спектрофотометрии в УФ-области спектра. Для получения характерных УФ-спектров использовали реакцию комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в среде спирта этилового 70% при подкислении уксусной кислотой [10].

Изучение антиоксидантного действия ГЭТПВ проводили *in vitro* на модели  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции (хемилюминометр ХЛМ-003, “Бикап”, Россия) [12]. Система, имитирующая АФК, содержала фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением цитрата Na (2,5% раствор) и люминол ( $10^{-5}$  М), резко повышающий активность свечения. Изучение влияния на систему, имитирующую процессы ПОЛ, проводили на модели  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции с использованием 1% суспензии липосом яичного желтка, обладающей высокой окисляемостью.

В указанные модельные системы вводили растворы исследуемых экстрактов в различных дозах (0,1 мл; 0,2 мл; 0,3 мл; 0,5 мл и 1,0 мл, что в пересчёте на густой экстракт соответствует: 1 мг; 2 мг; 3 мг; 5 мг и 10 мг). Число опытов для каждой модельной системы составляло 6. Об интенсивности  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной ХЛ судили по следующим параметрам: светосумме свечения (SL) и максимальной амплитуде свечения (HL), соответствующие скорости образования АФК и ПОЛ. Регистрация свечения осуществлялась в течение 5 мин (для каждого образца). Величины показателей выражали в условных единицах. Результаты экспериментов оценивали по степени изменения хемилюминесценции в присутствии исследуемых экстрактов и пересчитывали в % от контроля. Контролем служили модельные системы без добавления растворов исследуемых экстрактов.

Исследование влияния ГЭТПВ на функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 270-320 г. Крыс, полученных из питомника лабораторных животных Рапполово (Ленинградская область), содержали в условиях вивария ВолгГМУ. Уход за ними осуществляли согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Международных рекомендаций “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (The European Convention, 1986). Протокол экспериментального исследования был одобрен Экспертным советом по биомедицинской этике (локальным этическим комитетом) Башкирского государственного медицинского университета (протокол №10-2016 от 27.10.2016 г).

ХСН моделировали введением L-изопротеренола (ИЗО) в дозе 2,5 мг/кг дважды в сутки внутрибрюшинно в течение 21 дня [13]. Было сформировано 4 группы: 1) интактные животные (n=7), получавшие дистиллированную воду; 2) контрольная группа “ИЗО+дист. вода”, животные (n=9) с изопротереноловой ХСН, получавшие дистиллированную воду; 3) опытная группа “ИЗО+ ГЭТПВ 30 мг/кг” (n=8), животные, которым вводили ИЗО и густой экстракт из травы первоцвета весеннего (ГЭТПВ) в дозе 30 мг/кг 4) опытная группа “ИЗО+милдронат” (n=7), животные, которым вводили ИЗО и препарат сравнения милдронат в дозе 50 мг/кг. Животные контрольных групп

получали дистиллированную воду, опытных – исследуемые вещества перорально 1 раз в день с первых суток введения ИЗО и в течение последующих трёх недель в объёме 0,1 мл на 100 г массы тела.

На 21-е сутки у наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) животных забирали сердце, помещали его в ледяной 0,9% раствор NaCl, тщательно отмывая от крови. После взвешивания удаляли сосуды и жировую ткань и снова промывали сердце физиологическим раствором. Затем орган измельчали ножницами в чашке Петри. Гомогенизацию осуществляли в охлаждённом гомогенизаторе Поттера-Эльвейема (стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком) с добавлением сахарозной среды выделения (в соотношении 1:5), содержащей 220 мМ маннит, 100 мМ сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 мМ HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (pH 7,3).

Митохондрии получали стандартным методом дифференциального центрифугирования. Их количество стандартизировали по концентрации белка, которую определяли с использованием коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific”, США). Скорость поглощения кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка и анализатора жидкостей Эконикс “Эксперт-01” (“Эконика”, Россия). Измерение проводили в среде полярографии, которая содержала 300 мМ сахарозу, 10 мМ KCl, 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ ЭДТА, 1,2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ трис-HCl, pH=7,4. В качестве субстратов окисления были использованы 5 мМ сукцинат и 5 мМ малат/5 мМ глутамат. ADP использовали в концентрации 200 мкМ, ротенон – 0,5 мкМ. Перед работой полярографическую среду и субстраты окисления термостатировали 20 мин при 33°C.

Для определения окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий в ячейку объёмом 1 мл, заполненную полярографической средой, в условиях постоянного перемешивания с использованием магнитной мешалки последовательно добавляли: 100 мкл суспензии митохондрий, содержащей 0,5 мг белка; 100 мкл субстрата комплекса I дыхательной цепи – 5 мМ малат/5 мМ глутамат; 100 мкл 200 мкМ ADP; 100 мкл субстрата комплекса II дыхательной цепи – 5 мМ сукцинат; 100 мкл 200 мкМ ADP; 100 мкл ингибитора комплекса I (0,5 мкМ ротенона); 100 мкл 200 мкМ ADP. Скорость поглощения кислорода выражали в нмоль  $\text{O}_2$ /мин/мг белка и рассчитывали в следующих метаболических состояниях (по Чансу):  $V_1$  – скорость эндогенного дыхания,  $V_2$  – скорость субстрат-зависимого дыхания,  $V_3$  – скорость потребления кислорода митохондриями при добавлении субстрата окисления и ADP, то есть состояние окислительного фосфорилирования,  $V_4$  – скорость дыхания митохондрий в присутствии субстрата после расходования внесённого ADP (состояние дыхательного контроля). Для оценки сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля (отношение  $V_3/V_4$ ) [14].

Концентрацию МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в результате которой образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 532 нм. Расчёт производили по молярному коэффициенту экстинкции  $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ , с учётом концентрации белка выражали в мкмоль/мг белка [15].

Активность глутатионпероксидазы (ГП) оценивали по убыли восстановленного глутатиона в реакции с гидроперекисью третбутила. Непрореагировавший глутатион окрашивали 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) и его количество определяли спектрофотометрически при 412 нм. Результаты выражали в нмоль восстановленного глутатиона/мин/мг белка [16]. Активность каталазы определяли по методике, основанной на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм. Данные представлены в мг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин/мг белка [17]. Суммарную СОД-активность оценивали методом, основанном на ингибировании супероксидзависимого окисления кверцетина в присутствии фермента. Результат рассчитывали по формуле: % подавления =  $(\Delta\text{Допыта}/\Delta\text{Дконтроля}) \times 100\%$  и выражали в усл.ед./мг белка [18].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для оценки достоверности использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический ранговый U-критерий Манна-Уитни для парных сравнений, а также непараметрический тест Крускала-Уоллиса с пост-тестом Данна для множественного сравнения ANOVA (STATISTICA). Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно собственным исследованиям и данным литературы, надземная часть первоцвета весеннего содержит комплекс гидрофильных и липофильных биологически активных соединений [10]. Перспективным для исследования явились полифенольные соединения, в том числе флавоноиды. Экспериментально установлено, что максимальный выход фенольных соединений (качественно и количественно) осуществляется экстракцией сырья раствором спирта этилового 70% [10]. Установлено, что в состав фенольных соединений исследуемого экстракта входят агликоны флавоноидов (апигенин, кверцетин, кемпферол); флавоноидные гликозиды (цинарозид, рутин, гиперозид), а также полиметоксилированные флавоноиды, являющиеся хемотаксономическими маркерами для растений рода первоцвет (8-метокси-флавоон, флавоон, 3',4'-метиленди-окси-5'-метокси-флавоон) (табл. 1). На основании полученных данных о химическом составе были проведены исследования по разработке способа получения фармацевтической субстанции растительного происхождения на основе травы первоцвета весеннего с максимальным выходом основных действующих веществ – густой экстракт

(ГЭТПВ), который в дальнейшем использовался для изучения биологических свойств. Результаты исследований показали, что доминирующими группами БАС в полученном препарате, имеющими значение для целей стандартизации, является рутин. Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в образцах препарата составляет не менее 5,0% [10].

Для определения антиоксидантной активности были использованы тест-системы, инициирующие СРО (образование АФК и ПОЛ). Результаты проведённых исследований, представленные в таблицах 2 и 3, показали, что добавление в тест-системы с разными антиоксидантными статусами, раствора ГЭТПВ вызывает угнетение основных параметров ХЛ – светосуммы и амплитуды свечения. Был отмечен статистически значимый антиоксидантный эффект при введении раствора ГЭТПВ в дозах 0,1–1 мл по сравнению с контролем. Кроме того, отмечено, что в тест-системе, генерирующей АФК, максимальное снижение показателей ХЛ наблюдалось при добавлении раствора ГЭТПВ в дозе 0,5 мл, а в тест-системе с липосомами повышение дозы раствора ГЭТПВ усиливало антиоксидантный эффект.

Таким образом, раствор ГЭТПВ в различных тест-системах проявлял прямое антиоксидантное действие.

Исследование функционального состояния митохондрий выявило, что скорость потребления кислорода в метаболическом состоянии  $V_3$  по Чансу у животных с ХСН по сравнению с интактной группой достоверно снижалась на 53,3% ( $p < 0,05$ ) при использовании малата (субстрата окисления комплекса I ЦПЭ), на 70,6% ( $p < 0,05$ ) – сукцината (субстрата комплекса II ЦПЭ) и на 63,6% ( $p < 0,05$ ) при их одновременном применении (табл. 4). В то же время скорость дыхания после исчерпания ADP ( $V_4$  по Чансу) статистически значимо не отличалась в обеих группах (табл. 4).

Для оценки дисфункции митохондрий был рассчитан коэффициент дыхательного контроля по Чансу – отношение  $V_3/V_4$ . В группе крыс с экспериментальной ХСН коэффициент дыхательного контроля достоверно снижался в 2,3 раза для комплекса I, в 2,5 – для комплекса II и в 2,6 раза при одновременном добавлении субстратов окисления двух комплексов дыхательной цепи по сравнению с интактными животными (табл. 4).

Митохондриальная дисфункция при экспериментальной ХСН, очевидно, обусловлена развитием оксидативного стресса. У крыс контрольной группы концентрация МДА повышалась на 54,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем интактных животных (табл. 5). При этом суммарная активность СОД в контрольной группе была ниже на 17,5% ( $p < 0,05$ ), активность каталазы – на 18,4% по сравнению с интактной группой, а ГП – практически не изменялась (табл. 5).

В митохондриях сердца животных, получавших ГЭТПВ, стимулированная ADP скорость поглощения кислорода ( $V_3$ ) была выше при использовании в качестве субстратов окисления как малата (на 77,2%,  $p < 0,05$ ), так и сукцината (на 114,6%,  $p < 0,05$ ),

# ПЕРВОЦВЕТ ВЕСЕННИЙ И МИТОХОНДРИИ КАРДИОМИОЦИТОВ

Таблица 1. Соединения фенольной природы, идентифицированные в сырье первоцвета весеннего

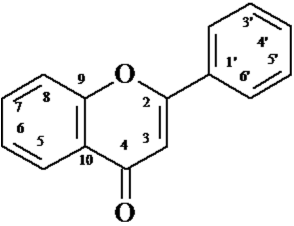
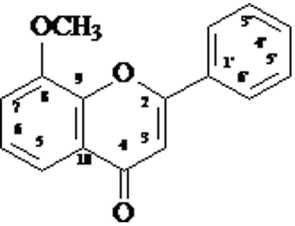
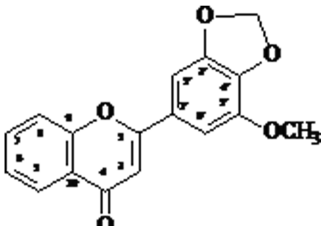
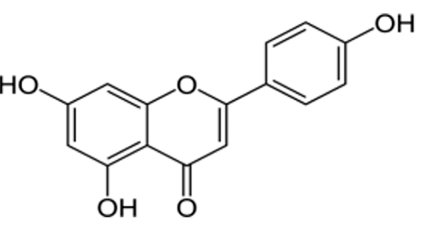
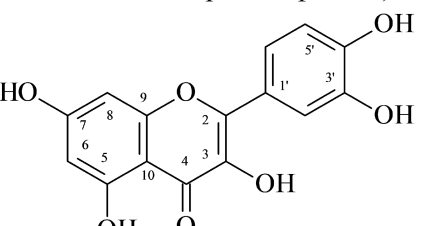
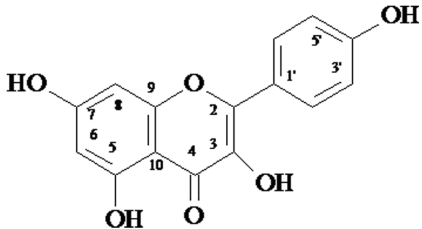
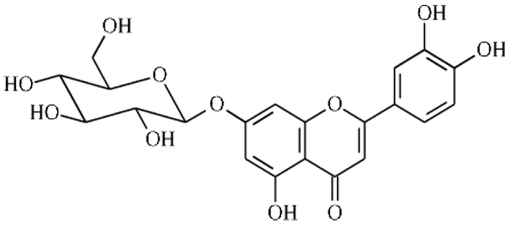
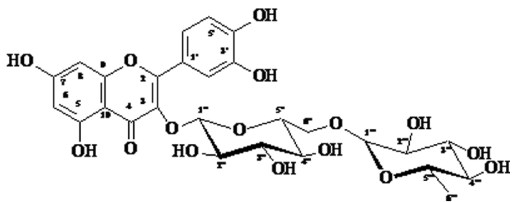
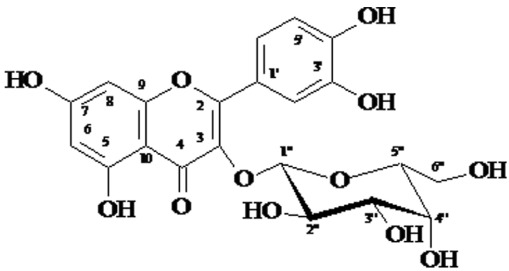
№ п/п	Наименование вещества	Брутто-формула	Спектральные характеристики
1	<p>Флаван (2-фенил-4Н-хромен-4-он)</p> 	$C_{15}H_{10}O_2$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>): 6.82 (1H, с, <math>H^3</math>), 7.40 (1H, дд, <math>J=8.2, 1.0</math>, <math>H^6</math>), 7.51 (2H, м, <math>H^3</math>, <math>H^5</math>), 7.55 (2H, м, <math>H^4</math>, <math>H^8</math>), 7.68 (1H, дд, <math>J=8.2, 1.0</math>, <math>H^7</math>), 7.91 (2H, м, <math>H^2</math>, <math>H^6</math>), 8.23 (1H, дд, <math>J=8.2, 1.7</math>, <math>H^5</math>).</p> <p>ЯМР <math>^{13}C</math> (<math>CDCl_3</math>): 107.3 (<math>C^3</math>), 117.9 (<math>C^8</math>), 123.7 (<math>C^{10}</math>), 124.9 (<math>C^6</math>), 125.4 (<math>C^5</math>), 126.0 (<math>C^6</math>, <math>C^2</math>), 128.8 (<math>C^3</math>, <math>C^5</math>), 131.3 (<math>C^4</math>), 131.5 (<math>C^{11}</math>), 133.5 (<math>C^7</math>), 156.0 (<math>C^9</math>), 163.0 (<math>C^2</math>), 178.0 (<math>C=O</math>).</p>
2	<p>8-метокси-флаван (8-метокси-2-фенил-4Н-хромен-4-он)</p> 	$C_{16}H_{12}O_3$	<p>ЯМР <math>^{13}C</math> (<math>CDCl_3</math>): 56.2 (<math>OCH_3</math>), 107.1 (<math>C^3</math>), 114.2 (<math>C^5</math>), 116.1 (<math>C^7</math>), 124.1 (<math>C^{10}</math>), 124.6 (<math>C^6</math>), 126.1 (<math>C^6</math>, <math>C^2</math>), 128.7 (<math>C^3</math>, <math>C^5</math>), 131.2 (<math>C^4</math>), 131.6 (<math>C^{11}</math>), 146.1 (<math>C^9</math>), 148.8 (<math>C^8</math>), 162.6 (<math>C^2</math>), 178.0 (<math>C=O</math>).</p>
3	<p>3',4'-метиленди-окси-5'-метокси-флаван</p> 	$C_{17}H_{12}O_5$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>): 4.0 (3H, с, <math>OCH_3</math>), 6.10 (2H, с, <math>H-2'</math>), 6.71 (1H, с, <math>H-3</math>), 7.11 (1H, д, <math>J=1.5</math> Гц, <math>H-6'</math>), 7.14 (1H, д, <math>J=1.5</math> Гц, <math>H-4'</math>), 7.43 (1H, дд, <math>J=7.9, 7.3</math> Гц, <math>H-6</math>), 7.55 (1H, д, <math>J=8.2</math> Гц, <math>H-8</math>), 7.69 (1H, ддд, <math>J=8.2, 7.3, 1.5</math> Гц, <math>H-7</math>), 8.22 (1H, дд, <math>J=7.9, 1.5</math> Гц, <math>H-5</math>).</p> <p>ЯМР <math>^{13}C</math> (<math>CDCl_3</math>): 56.36 (<math>OCH_3</math>), 100.74 (<math>C^6</math>), 102.34 (<math>C^2</math>), 106.93 (<math>C^3</math>, <math>C^4</math>), 117.98 (<math>C^8</math>), 123.89 (<math>C^{10}</math>), 125.23 (<math>C^6</math>), 125.69 (<math>C^5</math>), 126.14 (<math>C^5</math>), 133.71 (<math>C^7</math>), 138.45 (<math>C^{11}</math>), 143.87 (<math>C^7</math>), 149.55 (<math>C^3</math>), 159.13 (<math>C^9</math>), 162.96 (<math>C^2</math>), 178.34 (<math>C=O</math>).</p>
4	<p>Апигенин (5,7,4' – тригидроксифлаван, 5,7-дигидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4Н-хроман-4-он)</p> 	$C_{15}H_{10}O_5$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (<math>DMSO-d_6</math>): 7.93 (2H, д, <math>J=8.0</math>, <math>H^2</math>, <math>H^6</math>), 6.92 (2H, д, <math>J=8.0</math>, <math>H^3</math>, <math>H^5</math>), 6.77 (1H, д, <math>J=2.5</math>, <math>H^8</math>), 6.47 (1H, с, <math>H^3</math>), 6.21 (1H, д, <math>J=2.5</math>, <math>H^6</math>).</p> <p>ЯМР <math>^{13}C</math> (<math>DMSO-d_6</math>): 182.21 (<math>C^4</math>), 164.19 (<math>C^2</math>), 163.31 (<math>C^7</math>), 161.95 (<math>C^5</math>), 161.79 (<math>C^4</math>), 157.86 (<math>C^9</math>), 128.98 (<math>C^2</math>, <math>C^6</math>), 121.63 (<math>C^{11}</math>), 116.51 (<math>C^3</math>, <math>C^6</math>), 105.83 (<math>C^{10}</math>), 103.30 (<math>C^3</math>), 99.89 (<math>C^6</math>), 94.55 (<math>C^8</math>).</p>
5	<p>Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидрооксифлаван)</p> 	$C_{15}H_{10}O_7$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (<math>CD_3OD</math>): 6.1 (1H, д, <math>J=2.1</math>, <math>H_6</math>), 6.37 (1H, д, <math>J=2.1</math>, <math>H_8</math>), 6.87 (1H, д, <math>J=8.5</math>, <math>H_5</math>), 7.6 (1H, дд, <math>J=8.5, 2.1</math>, <math>H_6</math>), 7.74 (1H, д, <math>J=2.1</math>, <math>H_2</math>).</p> <p>ЯМР <math>^{13}C</math> (<math>CD_3OD</math>): 94.12 (<math>C_8</math>), 99.87 (<math>C_6</math>), 105.16 (<math>C_3</math>), 115.36 (<math>C_{10}</math>), 115.69 (<math>C_5</math>), 121.48 (<math>C_6</math>), 124.62 (<math>C_2</math>), 137.72 (<math>C_{11}</math>), 146.27 (<math>C_9</math>), 148.57 (<math>C_3</math>), 149.36 (<math>C_4</math>), 158.51 (<math>C_5</math>), 163.46 (<math>C_7</math>), 166.46 (<math>C_2</math>), 177.57 (<math>C_4</math>).</p>

Таблица 1. Соединения фенольной природы, идентифицированные в сырье первоцвета весеннего (продолжение)

№ п/п	Наименование вещества	Брутто- формула	Спектральные характеристики
6	<p>Кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидрооксифлавонон)</p> 	$C_{15}H_{10}O_6$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (DMSO): 8.10 (2H, д, <math>J=8.0</math>, H<sup>2'</sup>, H<sup>6'</sup>), 7.0 (2H, д, <math>J=8.0</math>, H<sup>3'</sup>, H<sup>5'</sup>), 6.54 (1H, д, <math>J=2.0</math>, H<sup>8</sup>), 6.28 (1H, д, <math>J=2.0</math>, H<sup>6</sup>). ЯМР <math>^{13}C</math> (DMSO): 93.50 (C<sup>8</sup>), 98.21 (C<sup>6</sup>), 103.16 (C<sup>10</sup>), 115.42 (C<sup>3'</sup>, C<sup>5'</sup>), 121.74 (C<sup>1'</sup>), 129.57 (C<sup>2'</sup>, C<sup>6'</sup>), 135.67 (C<sup>3</sup>), 146.81 (C<sup>2</sup>), 156.23 (C<sup>9</sup>), 159.25 (C<sup>4'</sup>), 160.72 (C<sup>5</sup>), 163.96 (C<sup>7</sup>), 175.90 (C<sup>4</sup>).</p>
7	<p>Цинарозид (лютеолин-7-O-β-D-глюкопиранозид)</p> 	$C_{21}H_{20}O_{11}$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (Aceton-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O): 3.42 (1H, т, <math>J=9.0</math>, H<sup>4'</sup>), 3.49 (1H, т, <math>J=9.0</math>, H<sup>2'</sup>), 3.56 (1H, т, <math>J=9.0</math>, H<sup>3'</sup>), 3.60 (1H, м, H<sup>5'</sup>), 3.68 (1H, дд, <math>J=12.2</math>, 5.6, H<sup>6a'</sup>), 3.85 (1H, дд, <math>J=12.2</math>, 1.8, H<sup>6b'</sup>), 5.10 (1H, д, <math>J=7.8</math>, H<sup>1'</sup>), 6.44 (1H, д, <math>J=1.8</math>, H<sup>6</sup>), 6.63 (1H, s, H<sup>3</sup>), 6.83 (1H, д, <math>J=1.8</math>, H<sup>8</sup>), 6.95 (1H, д, <math>J=8.0</math>, H<sup>5</sup>), 7.41 (1H, д, <math>J=8.0</math>, H<sup>6'</sup>), 7.43 (1H, уш.с., H<sup>2'</sup>). ЯМР <math>^{13}C</math> (Aceton-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O): 61.7 (C<sup>6''</sup>), 70.3 (C<sup>4''</sup>), 73.8 (C<sup>2''</sup>), 76.8 (C<sup>3''</sup>), 77.4 (C<sup>5''</sup>), 95.8 (C<sup>8</sup>), 100.5 (C<sup>6</sup>), 100.7 (C<sup>1'</sup>), 103.7 (C<sup>3</sup>), 106.3 (C<sup>10</sup>), 113.8 (C<sup>2'</sup>), 116.5 (C<sup>5'</sup>), 120.3 (C<sup>6'</sup>), 122.6 (C<sup>1</sup>), 146.3 (C<sup>3'</sup>), 150.4 (C<sup>4'</sup>), 158.0 (C<sup>9</sup>), 161.8 (C<sup>5</sup>), 163.9 (C<sup>7</sup>), 165.8 (C<sup>2</sup>), 183.1 (C<sup>4</sup>).</p>
8	<p>Рутин (3-O-рутинозид кверцетина)</p> 	$C_{27}H_{30}O_{16}$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (CD<sub>3</sub>OD): 1.12 (3H, д, <math>J=6.3</math>, H<sup>6'''</sup>), 3.30- 3.85 (10H, м, H<sup>2''</sup>, H<sup>3''</sup>, H<sup>4''</sup>, H<sup>5''</sup>, H<sup>6''a</sup>, H<sup>6''b</sup>, H<sup>2'''</sup>, H<sup>3'''</sup>, H<sup>4'''</sup>, H<sup>5'''</sup>), 4.52 (1H, д, <math>J=1.5</math>, H<sup>1''</sup>), 5.10 (1H, д, <math>J=7.5</math>, H<sup>1'''</sup>), 6.20 (1H, д, <math>J=2.1</math>, H<sup>6</sup>), 6.38 (1H, д, <math>J=2.1</math>, H<sup>8</sup>), 6.88 (1H, д, <math>J=8.4</math>, H<sup>5</sup>), 7.63 (1H, дд, <math>J=8.5</math>, 2.2, H<sup>6'</sup>), 7.67 (1H, д, <math>J=2.05</math>, H<sup>2'</sup>). ЯМР <math>^{13}C</math> (CD<sub>3</sub>OD): 18.0 (C<sup>6'''</sup>), 68.7 (C<sup>6''</sup>), 69.9 (C<sup>5'''</sup>), 71.5 (C<sup>4'''</sup>), 72.3 (C<sup>2'''</sup>), 72.4 (C<sup>3'''</sup>), 74.1 (C<sup>4''</sup>), 75.9 (C<sup>2''</sup>), 77.4 (C<sup>5''</sup>), 78.3 (C<sup>3''</sup>), 95.1 (C<sup>8</sup>), 100.2 (C<sup>6</sup>), 102.6 (C<sup>1''</sup>), 105.0 (C<sup>1'''</sup>), 105.8 (C<sup>10</sup>), 116.3 (C<sup>5'</sup>), 118.0 (C<sup>2</sup>), 123.4 (C<sup>1</sup>), 123.8 (C<sup>6'</sup>), 135.9 (C<sup>3</sup>), 146.1 (C<sup>3'</sup>), 150.1 (C<sup>4'</sup>), 158.8 (C<sup>2</sup>), 159.7 (C<sup>9</sup>), 163.3 (C<sup>5</sup>), 166.3 (C<sup>7</sup>), 179.7 (C<sup>4</sup>).</p>
9	<p>Гиперозид (кверцетин-3-O-β-D-галактопиранозид)</p> 	$C_{21}H_{20}O_{12}$	<p>ЯМР <math>^1H</math> (CD<sub>3</sub>OD): 3.49 (1H, т, <math>J=6.0</math>, H<sup>5''</sup>), 3.56 (1H, м, H<sup>6''</sup>), 3.65 (2H, дд, <math>J=11.2</math>, 6.0, H<sup>6'a</sup>), 3.81 (1H, дд, <math>J=9.5</math>, 8.0, H<sup>2''</sup>), 3.86 (1H, м, H<sup>4''</sup>), 5.26 (1H, д, <math>J=7.6</math>, H<sup>1''</sup>), 6.23 (1H, д, <math>J=2.0</math>, H<sup>6</sup>), 6.43 (1H, д, <math>J=2.0</math>, H<sup>8</sup>), 6.89 (1H, дд, <math>J=8.6</math>, 2.0, H<sup>5'</sup>), 7.62 (1H, дд, <math>J=8.6</math>, 1.1, H<sup>6'</sup>), 7.82 (1H, д, <math>J=2.0</math>, H<sup>2'</sup>). ЯМР <math>^{13}C</math> (CD<sub>3</sub>OD): 62.10 (C<sup>6''</sup>), 70.12 (C<sup>4''</sup>), 73.25 (C<sup>2''</sup>), 75.18 (C<sup>3''</sup>), 77.37 (C<sup>5''</sup>), 94.91 (C<sup>8</sup>), 100.07 (C<sup>6</sup>), 105.16 (C<sup>1'</sup>), 105.66 (C<sup>10</sup>), 116.39 (C<sup>5'</sup>), 117.92 (C<sup>2</sup>), 123.16 (C<sup>6'</sup>), 123.34 (C<sup>1</sup>), 135.66 (C<sup>3</sup>), 146.12 (C<sup>3'</sup>), 150.06 (C<sup>4'</sup>), 158.56 (C<sup>9</sup>), 158.92 (C<sup>2</sup>), 163.19 (C<sup>5</sup>), 166.13 (C<sup>7</sup>), 179.61 (C<sup>4</sup>).</p>

# ПЕРВОЦВЕТ ВЕСЕННИЙ И МИТОХОНДРИИ КАРДИОМИОЦИТОВ

Таблица 2. Показатели хемилюминесценции в тест-системе, генерирующей активные формы кислорода

Объём раствора ГЭТПВ, мл (количество высушенного экстракта, мг)	Показатели хемилюминесценции	
	S <sub>L</sub> , у.е.	H <sub>L</sub> , у.е
0,1 мл (1 мг)	34,94 ± 1,21*	17,04 ± 0,74*
0,2 мл (2 мг)	24,86 ± 1,05*	16,88 ± 0,92*
0,3 мл (3 мг)	24,65 ± 0,96*	14,54 ± 1,01*
0,5 мл (5 мг)	23,72 ± 0,72*	13,57 ± 0,84*
1 мл (10 мг)	27,24 ± 0,84*	12,69 ± 0,60*
Контроль (модельные системы без ГЭТПВ)	36,35 ± 0,84	18,52 ± 0,65

Примечание. Здесь и в таблице 3 показатели S<sub>L</sub> и H<sub>L</sub> выражены в у.е. от контрольных опытов. \* - p<0,05 - статистически достоверные различия между контролем и опытом (t-критерий Стьюдента).

Таблица 3. Показатели хемилюминесценции в модельной системе с липосомами

Объём раствора ГЭТПВ, мл (количество высушенного экстракта, мг)	Показатели хемилюминесценции	
	S <sub>L</sub> , у.е.	H <sub>L</sub> , у.е
0,1 мл (1 мг)	217,18 ± 0,86*	38,62 ± 0,79*
0,2 мл (2 мг)	205,67 ± 0,35*	43,52 ± 0,85*
0,3 мл (3 мг)	199,64 ± 0,74*	41,77 ± 0,70*
0,5 мл (5 мг)	127,71 ± 0,92*	22,81 ± 0,95*
1 мл (10 мг)	72,74 ± 0,75*	11,60 ± 0,67*
Контроль (модельные системы без ГЭТПВ)	273,74 ± 0,65	42,22 ± 0,53

Таблица 4. Функциональное состояние митохондрий сердца крыс при экспериментальной хронической сердечной недостаточности

Группы животных/исследуемые показатели		Интактная + дист. вода	ИЗО + дист. вода	ИЗО + ГЭТПВ 30 мг/кг	ИЗО + милдронат 50 мг/кг
Скорость потребления кислорода, нмоль O <sub>2</sub> /мин/ мг белка	V <sub>2</sub>	39,95±10,28	39,56±10,21 (-1,0%)	39,37±11,23 (-0,5%)	38,77±11,36 (-2,0%)
	V <sub>3</sub> (I)	94,50±26,3	44,12±20,43* (-53,3%)	78,20±20,06# (77,2%)	70,13±21,59 (58,9%)
	V <sub>4</sub> (I)	25,60±6,02	26,25±8,71 (2,5%)	27,82±5,99 (6,0%)	22,98±6,83 (-12,5%)
	V <sub>3</sub> (I, II)	110,21±14,99	40,10±21,12* (-63,6%)	66,27±26,15 (65,3%)	47,19±17,16 (17,7%)
	V <sub>4</sub> (I, II)	20,58±5,36	20,41±6,54 (-0,8%)	19,48±3,92 (-4,6%)	16,72±6,17 (-18,1%)
	V <sub>3</sub> (II)	57,87±17,93	17,03±9,85* (-70,6%)	36,55±11,33# (114,6%)	25,92±16,18 (52,2%)
	V <sub>4</sub> (II)	11,95±2,71	10,10±3,58 (-15,5%)	10,05±3,53 (-0,5%)	7,76±2,45 (-23,2%)
V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	I	3,99±0,92	1,70±0,69* (-57,4%)	2,97±1,08# (74,7%)	3,20±0,90# (88,2%)
	II	4,77±0,96	1,91±0,9* (-60,0%)	3,80±1,03# (99,0%)	3,58±1,9 (87,4%)
	I+II	5,09±0,69	1,94±0,87* (-61,9%)	3,39±1,04# (74,7%)	2,93±0,8 (51,0%)

Примечание. \* - p< 0,05 по сравнению с интактной группой, U- критерий Манна-Уитни; # - p<0,05 по сравнению с контрольной группой, по критерию Крускала-Уоллиса с пост-тестом Данна для множественных сравнений. I, II - первый и второй комплексы дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов.

Таблица 5. Влияние ГЭТПВ и милдроната на процессы ПОЛ и антиоксидантную систему митохондрий сердца крыс при экспериментальной хронической сердечной недостаточности

Показатели	Группы животных			
	Интактная + дист. вода	ИЗО + дист. вода	ИЗО + ГЭТПВ 30 мг/кг	ИЗО + милдронат 50 мг/кг
Малоновый диальдегид, мМ/мг белка	2,67±0,29	4,13±0,17* (54,7%)	3,48±0,21# (-15,7%)	3,99±0,04 (-3,4%)
Супероксиддисмутазы, усл.ед./мг белка	43,08±2,48	35,54±2,08* (-17,5%)	55,56±6,47# (56,3%)	40,07±4,92 (12,7%)
Каталаза, мг H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/мг белка	35,83±1,84	29,25±1,97 (-18,4%)	30,01±1,90 (2,6%)	29,49±2,08 (0,8%)
Глутатионпероксидаза, мМ глутатиона/мин/мг белка	110,26±13,25	115,11±12,41 (4,4%)	119,96±14,45 (4,2%)	132,00±18,35 (14,7%)

Примечание. \* - p< 0,05 по сравнению с интактной группой по критерию Манна-Уитни; # - p<0,05 по сравнению с контрольной группой по критерию Крускала-Уоллиса с пост-тестом Данна.

соответственно, по сравнению с животными группы негативного контроля. Милдронат также способствовал увеличению данного показателя на 58,9% при использовании в качестве субстрата окисления малата и на 52,2% для сукцината (табл. 5).

Нестимулированная скорость потребления кислорода ( $V_4$ ) в митохондриях крыс с экспериментальной ХСН, получавших ГЭТПВ, как для комплекса I, так и для комплекса II, существенно не отличалась от таковой группы негативного контроля. Милдронат способствовал снижению данного показателя для двух комплексов, однако статистически достоверных различий выявлено не было (табл. 5).

Коэффициент дыхательного контроля у крыс, которым вводили изопротеренол и ГЭТПВ, увеличился в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) для комплекса I и в 2 раза ( $p < 0,05$ ) для комплекса II по сравнению с негативным контролем. Отношение  $V_3/V_4$  в митохондриях кардиомиоцитов животных, получавших милдронат, было в 1,9 раза выше, чем у животных контрольной группы как для комплекса I ( $p < 0,05$ ), так и для комплекса II дыхательной цепи (табл. 5). У крыс, которым моделировали ХСН и вводили ГЭТПВ, концентрация МДА была достоверно ниже на 15,7% ( $p < 0,05$ ), чем у группы негативного контроля (табл. 5).

Суммарная активность СОД у животных опытных групп, получавших ГЭТПВ и милдронат, была на 56,3% ( $p < 0,05$ ) и 12,7% соответственно выше по сравнению с группой негативного контроля. При этом активность ГП и каталазы существенно не изменялась (табл. 5).

Таким образом, ГЭТПВ ограничивает развитие митохондриальной дисфункции у крыс, которым вводили изопротеренол, о чём свидетельствует повышение КДК, суммарной активности СОД и снижение концентрации вторичных продуктов ПОЛ в митохондриях сердца животных, получавших вещество, по сравнению с показателями контрольной группы.

Гипоксия при ХСН является следствием снижения объема кровотока и гипертрофии кардиомиоцитов, в которых из-за слишком больших размеров распределение кислорода происходит неравномерно. В этих условиях в клетках сердца вырабатываются факторы, вызывающие снижение активности комплексов I, II и IV дыхательной цепи (фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ), оксид азота, повышающие сродство IV комплекса к кислороду (гипоксией индуцированный фактор (hypoxia-inducible factors, HIF-1)), уменьшающие выход цитохрома c в цитоплазму (белок, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли (TNF receptor associated protein 1, TRAP1)). Перечисленные события способствуют ограничению продукции активных форм кислорода и открытию митохондриальных пор переходной проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), то есть носят адаптационный характер [19]. Однако при длительной гипоксии и снижении синтеза АТФ продукция АФК будет нарастать и приводить к снижению функциональной активности

митохондрий [20]. Нарушения в работе митохондрий могут быть причиной и следствием избыточного образования АФК, а также снижением буферной емкости системы антиоксидантной защиты. Также при ХСН увеличивается апоптоз – запрограммированная гибель клеток миокарда и сосудов, в запуске которого митохондрии принимают непосредственное участие. Важным процессом в запуске митохондриального пути развития апоптоза является нарушение трансмембранного потенциала митохондрий вследствие повышения концентрации  $Ca^{2+}$ , открытие транзитных пор во внутренней мембране, нарушение синтеза NADH, расходование АТФ на поддержание потенциала и открытие mPTP во внешней мембране [21].

Полученные данные об отсутствии у крыс с экспериментальной ХСН стимуляции скорости поглощения кислорода митохондриями при добавлении ADP в метаболическом состоянии  $V_3$  как при использовании в качестве субстратов окисления малата, так и сукцината дыхательной цепи, свидетельствуют о нарушениях в работе митохондрий кардиомиоцитов, что согласуется с литературными данными [19]. Невысокие значения коэффициента дыхательного контроля в данной группе животных указывают на снижение энергопродукции. Поскольку стимуляция дыхания ADP очень низкая и практически одинаковая для обоих комплексов, вероятной причиной снижения функциональной активности митохондрий может быть нарушение проницаемости внутренней и внешней мембран и уменьшение электрохимического потенциала. Установлено, что мембранный потенциал митохондрий кардиомиоцитов крыс при хронической сердечной недостаточности достоверно снижается [22]. Причиной дисфункции митохондрий при экспериментальной ХСН является окислительный стресс, о развитии которого свидетельствует увеличение концентрации МДА в митохондриях кардиомиоцитов и снижение суммарной активности СОД, что согласуется с литературными данными [23].

Вероятно, ГЭТПВ ограничивает формирование АФК. В его состав входит широкий спектр гидрофильных и липофильных биологически активных соединений, среди которых важное место занимают полифенольные соединения, а именно флавоноиды, представленные в виде известных агликонов и гликозидов, а также полиметоксилированные. Флавоноиды подавляют перекисные процессы уже на начальной стадии. Они играют роль ловушек супероксид-радикала и перекиси водорода, ограничивая дальнейшее образование более токсичных продуктов [24].

В наших экспериментах ГЭТПВ оказывал антиоксидантное действие в модельных системах *in vitro*. Возможно, что антиоксидантная активность ГЭТПВ обусловлена способностью флавоноидов, входящих в его состав, хелатировать ионы металлов переменной валентности, в частности ионы железа. Известно, что антиоксиданты-хелаторы выводят ионы двухвалентных металлов из реакций генерации радикалов (например, Fenton и Haber-Weiss), препятствуя их накоплению, и тем самым



проявляют свои антиоксидантные свойства на уровне инициации ПОЛ [25].

Другим возможным механизмом антиоксидантного действия ГЭТПВ является нейтрализация свободных радикалов, так для присутствующих в экстракте флавоноидов (апигенина, кверцетина, рутина, кемпферола) доказана антирадикальная активность по отношению к пероксильным радикалам [26].

У животных, получавших ГЭТПВ, также отмечено снижение уровня МДА и увеличение активности СОД, что свидетельствует об ограничении развития окислительного стресса. В ранее проведенных нами исследованиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в биологических пробах плазмы крови, клеток сердца и митохондрий кардиомиоцитов крыс при введении ГЭТПВ, установлено, что рутин попадает в кровь животных, распределяется в кардиомиоцитах и проникает в митохондрии (результаты не опубликованы). Это даёт основание полагать, что флавоноиды, входящие в состав ГЭТПВ, могут попадать в митохондрии и оказывать прямое антиоксидантное действие. Кроме того, есть данные, что флавоноиды препятствуют открыванию ЦсА (циклоспорин А)-нечувствительных высокопроницаемых пор, ответственных за апоптоз клеток и регулируют экспрессию коннексина-43 (Cx43) – основного белка щелевых контактов, важного для межклеточной коммуникации и функционирования кардиомиоцитов [27]. Вероятно, вышесказанным можно объяснить значительное улучшение функциональных показателей митохондрий у животных, получавших ГЭТПВ, по сравнению с группой негативного контроля. При использовании в качестве субстрата окисления малата скорость поглощения кислорода после добавления ADP достоверно повышалась, сопряжение между дыханием и фосфорилированием восстанавливалось. Ещё более выраженное действие ГЭТПВ оказывал на дыхательный комплекс II, активность которого обычно возрастает при гипоксии.

Милдронат также ограничивал повреждающее действие ХСН на митохондрии, однако его влияние было больше выражено для комплекса I дыхательной цепи. В его присутствии улучшение сопряжения обусловлено повышением стимулированной скорости дыхания и снижением дыхания после истощения ADP, что, вероятно, связано с ограничением утечки электронов из цепи переноса электронов. Милдронат – миокардиальный цитопротектор, известный по своему действию на отдельные звенья метаболической цепи в кардиомиоцитах, в результате чего снижается скорость окисления длинноцепочечных жирных кислот и стимулируется аэробный гликолиз в зоне ишемии, повышается энергетический потенциал клетки, таким образом, обеспечивая коррекцию метаболизма и энергопродукции клеток миокарда в условиях ишемии и гипоксии [28]. Основными источниками энергии для кардиомиоцитов являются свободные жирные кислоты (СЖК), а при повышенной нагрузке – глюкоза. При окислении СЖК используется на 30% больше кислорода,

чем при окислении глюкозы. В условиях ХСН клетки испытывают кислородное голодание, метаболизм их изменяется. СЖК и недостаток кислорода провоцируют образование недоокисленных активных форм жирных кислот в виде ацилкарнитина и ацилкоэнзима А, которые способствуют разрушению мембран и нарушают процесс образования ADP, что приводит к гибели клетки.

Милдронат является аналогом  $\gamma$ -бутиробетаина и, угнетая  $\gamma$ -бутиробетаингидроксилазу, останавливает синтез карнитина, который является переносчиком жирных кислот в митохондрии. Таким образом, блокируется не только транспорт СЖК в митохондрии и их карнитинзависимое окисление с большой затратой кислорода, но и увеличивается концентрация  $\gamma$ -бутиробетаина. Последний стимулирует биосинтез оксида азота (NO) – медиатора NO-зависимой стресс-лимитирующей системы, универсального регулятора процесса адаптации [29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, при экспериментальной ХСН, вызванной введением изопротеренола крысам в дозе 2,5 мг/кг внутривенно 2 раза в день в течение 21 дня, наблюдается снижение скорости потребления кислорода в метаболическом состоянии  $V_3$  и коэффициента дыхательного контроля, накопление продуктов ПОЛ и снижение активности ферментов антиоксидантной защиты в митохондриях сердца крыс.

ГЭТПВ и милдронат способствуют ограничению образования АФК, развития процессов ПОЛ, повышению суммарной активности СОД, улучшению окислительной и фосфорилирующей функций митохондрий кардиомиоцитов животных с экспериментальной ХСН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aiba T, Tomaselli G.F. (2010) Curr. Opin. Cardiol., **25**, 29-36.
2. Moris D., Spartalis M., Tzatzaki E., Spartalis E., Karachaliou G.S., Triantafyllis A.S., Karaolani G.I., Tsilimigras D.I., Theocharis S. (2017) Ann. Transl. Med., **5**(16), 324.
3. Santos C.X., Raza S., Shah A.M. (2016) Int. J. Biochem. Cell Biol., **74**, 145-151.
4. Bayeva M., Gheorghide M., Ardehali H. (2013) J. Am. Coll. Cardiol., **61**(6), 599-610.
5. Goh K.Y., Qu J., Hong H., Liu T., Dell'Italia L.J., Wu Y., O'Rourke B., Zhou L. (2016) Cardiovasc. Res., **109**(1), 79-89.
6. Tsutsui H., Kinugawa S., Matsushima S. (2011) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **301**(6), 2181-2190.
7. Bayeva M., Ardehali H. (2010) Curr. Hypertens. Rep., **2**, 426-432.
8. Lu Z., Xu X., Hu X., Fassett J., Zhu G., Tao Y., Li J., Huang Y., Zhang P., Zhao B., Chen Y. (2010) Antioxid. Redox. Signal., **3**, 1011-1022.
9. Siwik D.A., Colucci W.S. (2004) Heart Fail. Rev., **9**(1), 43-51.
10. Латыпова Г.М., Бубенчикова В.Н., Катаев В.А., Романова З.Р. (2011) Растения рода "первоцвет" как перспективные источники профилактических и лекарственных средств. Уфа, "Здравоохранение Башкортостана", 108 с.

11. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1989, 400 с.
12. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. (1995) Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. Уфа, 92 с.
13. Shibata M., Takeshita D., Obata K., Mitsuyama S., Ito H., Zhang G.X., Takaki M. (2011) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **301**(5), 2154-2160.
14. Brand M.D., Nicholls D.G. (2011) Biochem. J., **435**, 297-312.
15. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) в кн.: Современные методы в биохимии, Медицина, М., 66-68.
16. Моин В.М. (1986) Лаб. дело, №12, 12-16.
17. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
18. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Вопр. мед. химии, **36**(2), 88-91.
19. Heather L.C., Cole M.A., Tan J.J., Ambrose L.J., Pope S., Abd-Jamil A.H., Carter E.E., Dodd M.S., Yeoh K.K., Schofield C.J., Clarke K. (2012) Basic Res. Cardiol., **107**(3), 268.
20. Dai D.F., Chiao Y.A., Martin G.M., Marcinek D.J., Basisty N., Quarles E.K., Rabinovitch P.S. (2017) Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., **146**, 203-241.
21. Aimo A., Borrelli C., Vergaro G., Piepoli M.F., Caterina A.R., Mirizzi G., Valleggi A., Raglianti V., Passino C., Emdin M., Giannoni A. (2016) Curr. Pharm. Des., **22**(31), 4807-4822.
22. Степанов А.В., Байдюк Е.В., Сакута Г.А. (2016) Цитология, **58**(11), 875-882.
23. Bonafede R.J., Calvo J.P., Fausti J.M.V., Puebla S., Gambarte A.J., Manucha W. (2017) Clin. Investig. Arterioscler., **29**(3), 120-126.
24. Maietti A., Brighenti V., Bonetti G., Tedeschi P., Prencipe F.P., Benvenuti S., Brandolini V., Pellati F. (2017) J. Pharm. Biomed. Anal., **142**, 28-34.
25. Базарнова Ю.Г., Веретнов Б.Я. (2004) Вопр. питания, **73**(3), 35-42.
26. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Станкевич Н.М., Ермаков С.Б., Яшакина И.А. (2005) Растительные ресурсы, №2, 106-115.
27. Wang H.H., Zeng J., Wang H.Z., Jiang Y.X., Wang J., Zhou P.P. (2015) Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, **31**(3), 201-206.
28. Стаценко М.Е., Туркина С.В., Тыщенко И.А., Фабрицкая С.В., Полетаева Л.В. (2017) Фарматека, **6**, 75-80.
29. Кукес В.Г., Жернакова Н.И., Горбач Т.В., Ромащенко О.В., Румбеиш В.В. (2013) Вестник РАМН, №1, 42-46.

Поступила: 20. 04. 2018.  
Принята к печати: 07. 06. 2018.

# INFLUENCE OF THE DENSE EXTRACT FROM HERB OF *PRIMULA VERIS* L. ON THE OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT AND THE FUNCTIONAL STATE OF THE CARDIOMYOCYTES MITOCHONDRIA OF RATS WITH EXPERIMENTAL CHRONIC HEART FAILURE

T.A. Popova<sup>1</sup>, E.A. Muzyko<sup>1</sup>, M.V. Kustova<sup>1</sup>, M.A. Bychenkova<sup>2</sup>, V.N. Perfilova<sup>1</sup>,  
I.I. Prokofiev<sup>1</sup>, M.A. Samoylova<sup>1</sup>, I.N. Tyurenkov<sup>1</sup>, G.M. Latypova<sup>2</sup>, V.A. Kataev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Volgograd State Medical University,

1 Pavshikh Bortsov sq., Volgograd, 400131 Russia; e-mail: vnperfilova@mail.ru

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, 3 Lenina str., Ufa, 450008 Russia

Experimental chronic heart failure (CHF), caused by administration of L-isoproterenol (2.5 mg/kg twice a day intraperitoneally for 21 days), promotes uncoupling of respiration and oxidative phosphorylation. The rate of mitochondrial oxygen consumption in the metabolic state V<sub>3</sub> by Chance in animals with CHF decreased by 53.3% (p<0.05) with malate using (as an oxidation substrate feeding complex I of the electron transport chain (ETC)), by 70.6% (p<0.05) with succinate using (complex II substrate) and by 63.6% (p<0.05) when malate and succinate were added simultaneously. The respiratory control ratio significantly decreased 2.3 times for complex I, 2.5 for complex II, and 2.6 times for the simultaneous operation of two respiratory chain complexes in mitochondria of CHF rats compared to intact animals. Mitochondrial dysfunction in experimental CHF is evidently due to the development of oxidative stress. It was revealed that the content of malonic dialdehyde (MDA) in the group of rats with experimental CHF was higher by 54.7% (p<0.05), as compared with intact animals. The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase was lower by 17.5% (p<0.05), and by 18.4%, respectively than in the intact group. The dense extract from herba of *Primula veris* L. (DEHPV) 30 mg/kg limits the development of mitochondrial dysfunction in rats with experimental CHF, as evidenced by an increase in the role of V<sub>3</sub> respiration for the first and second respiratory chain complexes in 1.7 (p<0.05) and 2.0 times (p<0.05), respectively, the ratio of respiratory control (RCR) – 1.7 times (p<0.05) for complex I and 2 times (p<0.05) for complex II compared with the negative control. The concentration of MDA was by 15.7% (p<0.05), lower and the activity of SOD was by 56.3% (p<0.05) higher.

**Key words:** chronic heart failure; mitochondrial dysfunction; oxidative stress; dense extract from herba of *Primula veris*