

УДК 615.322.612.354.1

ОСИ СОЦВЕТИЙ ВИНОГРАДА АМУРСКОГО – ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

^{1,3}Момот Т.В., ^{1,2}Кушнерова Н.Ф.

¹Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток;

²ФГБУН «Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева» ДВО РАН, Владивосток;

³ФГБУН «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, Владивосток, e-mail: nkushnerova@poi.dvo.ru

Представлены результаты исследования влияния экстракта из осей соцветий винограда амурского, содержащего комплекс флавоноидов, свободных аминокислот, органических и фенольных кислот, фенольных альдегидов, в условиях экспериментального стресс-воздействия (вертикальная фиксация крыс за дорзальную шейную складку на 22 часа). Показано, что влияние стресса сопровождалось увеличением массы надпочечников на 42%. В сыворотке крови отмечалась гипертриглицеринемия, гиперхолестеринемия, рост лизофракций фосфолипидов, снижение фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina, эфиров холестерина. Введение экстракта способствовало нормализации показателей массы надпочечников и липидного обмена в сыворотке крови более эффективно, чем эталонный стресс-протектор «Экстракт элеутерококка®». При введении элеутерококка оставался повышенный уровень холестерина, свободных жирных кислот, лизофракций фосфолипидов, низкий уровень эфиров жирных кислот, эфиров холестерина и дифосфатидилглицерина. Показано, что оси соцветий винограда амурского представляют перспективный вид сырья для получения стресс-протекторных препаратов.

Ключевые слова: стресс, сыворотка крови, нейтральные липиды, фосфолипиды, виноград амурский, элеутерококк

AXES OF INFLORESCENCES OF GRAPES AMURTNSIS – PERSPECTIVE SOURCE FOR RECEIVING STRESS-PROTEKTIVE OF PREPARATIONS

^{1,3}Momot T.V., ^{1,2}Kushnerova N.F.

¹Biomedicine School of Far East Federal University, Vladivostok;

²Institution of the Russian academy of sciences V.I. Ilichev's pacific oceanological institute FEBRAS, Vladivostok;

³Institution of the Russian academy of sciences A.V. Zhirmunsky institute of marine biology FEBRAS, Vladivostok, e-mail: nkushnerova@poi.dvo.ru

Results of research of influence of extract from axes of inflorescences of grapes Amurensis, containing a complex flavonoides, free amino acids, organic and phenolic acids, phenolic aldehydes in the conditions of experimental a stress influence (vertical fixing of rats for a dorzalny cervical fold at 22 o'clock) are presented. It is shown that influence of a stress was followed by increase in mass of adrenal glands by 42%. In serum of blood the hypertriglycerinemia, a hypercholesterolemia, growth of lizofrakctions of phospholipids, decrease in a phosphatidilcholine, phosphatidilethanolamine, cholesterol air was noted. Introduction of extract promoted normalization of indicators of mass of adrenal glands and a lipidic metabolism in serum of blood is more effective, than a reference stress protector «Extract eleuterokokka®». At introduction of an eleuterokokk there was an increased level of cholesterol, free fatty acids, lizofrakction of phospholipids, low level of air of fatty acids, air of cholesterol and a diphosphatidilglicerine. It is shown that the axes of inflorescences of grapes Amurensis represent a perspective view of raw materials for receiving a stress-protective preparations.

Keywords: stress, blood serum, neutral lipids, phospholipids, grapes Amurensis, eleuterokokkus

В настоящее время серьезной проблемой современного общества является всеобщая подверженность стрессовым воздействиям (тяжелая физическая нагрузка, переохлаждение, перегревание, химический и эмоциональный стрессы и др.). По данным ВОЗ в последние годы смертность мужчин в возрасте от 35 до 44 лет от ишемической болезни сердца возросла на 60%. Болезни сердца и сосудов поражают людей и молодого возраста – 25–30 лет. Здесь находит свое отражение повреждающее действие стресса. Известно, что одним из основных механизмов в развитии нарушений, снижающих резервы здоровья при стрессе,

является активация перекисного окисления липидов и рассогласование каскада химических реакций антиоксидантной системы, изменения углеводно-липидного обмена, сопровождаемые сдвигом окислительно-восстановительного равновесия и нарушением энергообеспечения организма [2, 6]. Усиление свободно-радикальных и перекисных процессов, а также окислительный стресс лежат в основе патогенеза синдрома адаптационного перенапряжения, хронической усталости, атеросклероза и др. Перспективными корректорами метаболических изменений, возникающих при различных видах стресса, являются природные

полифенольные соединения, оказывающие антирадикальное и антиоксидантное действие [5, 9, 10]. Это делает актуальным изучение глубоких биохимических механизмов их влияния на организм и возможность фармакологической профилактики стресса. Природные ресурсы Дальнего Востока предоставляют широкие возможности для создания разнообразных фитопрепаратов. В настоящей работе был использован водно-спиртовой экстракт из осей соцветий винограда амурского (*Vitis amurensis*), в составе которого содержится до 65% фенольных соединений (лейкоантоцианы, катехины, флавонолы, лигнин и др.). В качестве препарата сравнения использовали известный стресс-протектор – аптечный экстракт элеутерококка.

Целью исследования явилось изучение нарушений липидного состава крови крыс при остром стрессе и их коррекция экстрактом из осей соцветий винограда амурского.

Материалы и методы исследования

Суховоздушное сырье экстрагировали 40% этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сырья. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе питания и в стандартных условиях вивария. Экспериментальную модель острого стресса воспроизводили путем вертикальной фиксации крыс за дорзальную шейную складку на 22 часа. Препараты вводили животным перорально 2 раза в течение эксперимента (до вертикальной фиксации и через 4 часа после). Водные растворы комплекса полифенолов из осей соцветий винограда и элеутерококка (предварительно освобожденные от спирта экстракты путем упаривания в вакууме) вводили в количестве 100 мг/кг массы тела общих полифенолов, что соответствует известной терапевтической дозе для полифенольных гепатопротекторов [3]. Животные были разделены на четыре группы по 10 крыс в каждой: 1-я – контроль (интактные животные), 2-я – стресс, 3-я – стресс + экстракт из осей соцветий винограда, 4-я – стресс + экстракт элеутерококка. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Кровь брали из шейной вены. После повреждающего воздействия измеряли массу надпочечников и количество изъязвлений на слизистой желудка. Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН.

Липиды из сыворотки крови экстрагировали по методу J. Folch et al. [8]. Разделение нейтральных липидов проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей гексан – серный эфир – уксусная кислота (90:10:1 по объему) [7]. Обнаружение пятен нейтральных липидов осуществляли с помощью паров йода, а их идентификацию – с применением

очищенных стандартов. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле [11], а их идентификацию и количественное определение по методу V.E. Vaskovsky et al. [12]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в % от суммы нейтральных липидов и фосфолипидов. Обработку результатов проводили с использованием статистического пакета InStat 3.0 (GraphPad Software Inc. USA, 2005) со встроенной процедурой проверки соответствия выборки закону нормального распределения. Для определения статистической значимости различий в зависимости от параметров распределения использовали параметрический t-критерий Стьюдента или непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Вертикальная фиксация крыс за дорзальную шейную складку вызывала формирование типичной картины стресса с характерными геморрагическими деструкциями желудка и гипертрофией надпочечников, масса которых повысилась на 42% ($8,43 \pm 0,25$ мг/100 г массы против $5,94 \pm 0,55$ мг/100 г массы в контроле; $p < 0,001$). Количество изъязвлений на слизистой желудка составило $2,7 \pm 0,08$ ед./жив., в контроле 0. Изучение липидного состава сыворотки крови животных 2-й группы (таблица) характеризовалось увеличением свободных жирных кислот на 33% по сравнению с контролем, что связано с активизацией периферического липолиза в жировой ткани в ответ на выброс в кровь катехоламинов (стрессовая реакция). Увеличение содержания триацилглицеринов в сыворотке крови на 22% по сравнению с контрольными величинами объясняется насыщением ими вновь синтезируемых в печени липопротеинов. Известно, что при стрессе в печени происходит ресинтез триацилглицеринов из жирных кислот и глицерина, мобилизуемых при липолизе, что способствует ее жировой инфильтрации.

Увеличение уровня холестерина на 20% обусловлено активацией его синтеза из ацетил-КоА, так как при стрессе происходит избыточное образование ацетата из жирных кислот в связи с усилением их распада при липолизе [4].

Уменьшение содержания эфиров холестерина на 17% свидетельствует о нарушении этерифицирующей функции печени и, как следствие, синтеза и катаболизма липопротеинов с преобладанием липопротеинов низкой плотности. При этом роль липидов в энергетике организма в условиях острого стресса значительно возрастает. Энергетический обмен переключается с «углеводного» типа на «липидный», что характерно для стадии

резистентности стресса [4, 6]. Среди фосфолипидных фракций характерно отметить достоверное снижение фосфатидилхолина на 7%, фосфатидилэтаноламина на 14% при одновременном увеличении лизофосфатидилхолина на 24% и лизофосфатидилэтано-

ламина на 32%. Обращает на себя внимание высокий уровень сфингомиелина (на 36%). Рост лизофракций обусловлен активацией фосфолипаз, тогда как увеличение сфингомиелина является компенсаторной реакцией на повышение проницаемости мембран.

Влияние растительных препаратов на содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в сыворотке крови крыс при стрессе (% от суммы всех фракций; $M \pm m$)

Липидные фракции	1-я группа Контроль	2-я группа Стресс	3-я группа Стресс + экстракт осей соцветий винограда	4-я группа Стресс + экстракт элеутерококка
Нейтральные липиды				
ТАГ	19,67 ± 0,62	23,81 ± 0,77 ³	18,76 ± 0,64	21,71 ± 0,70 ¹
СЖК	6,00 ± 0,17	7,97 ± 0,28 ³	5,22 ± 0,12	7,05 ± 0,24 ²
ЭЖК	24,07 ± 0,63	24,05 ± 0,82	25,55 ± 0,72	23,00 ± 0,68
ХС	14,86 ± 0,45	17,89 ± 0,64 ³	14,53 ± 0,48	15,97 ± 0,40 ¹
ЭХС	24,48 ± 0,66	20,41 ± 0,56 ³	25,00 ± 0,63	23,11 ± 0,72 ¹
Остаточная фракция	10,92 ± 0,49	5,87 ± 0,47	10,94 ± 0,77	9,16 ± 0,59
Фосфолипиды				
ФХ	63,19 ± 0,89	59,00 ± 0,95 ²	64,00 ± 0,79	62,04 ± 1,11
ЛФХ	7,94 ± 0,26	9,86 ± 0,38 ³	7,33 ± 0,42	8,72 ± 0,23 ¹
СМ	8,88 ± 0,23	12,05 ± 0,31 ³	8,15 ± 0,07	9,20 ± 0,36
ФЭ	9,71 ± 0,57	8,43 ± 0,26 ¹	10,25 ± 0,26	9,63 ± 0,30 ¹
ЛФЭ	3,19 ± 0,14	4,22 ± 0,13 ³	2,71 ± 0,14	3,77 ± 0,16 ¹
ФИ	4,17 ± 0,16	4,37 ± 0,17	4,46 ± 0,20	3,89 ± 0,17
ДФГ	2,92 ± 0,05	2,06 ± 0,04 ³	3,10 ± 0,11	2,75 ± 0,05 ¹

Примечание. Различия статистически достоверны при: ¹ - $p < 0,05$; ² - $p < 0,01$; ³ - $p < 0,001$ по сравнению с контролем. ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ДФГ – дифосфатидилглицерин

При введении экспериментальным животным экстракта из осей соцветий винограда (3-я группа) или экстракта элеутерококка (4-я группа) в период стресса наблюдалась коррекция вызванных им нарушений биохимических показателей сыворотки крови (таблица). В группе животных, получавших экстракт из осей соцветий винограда, по сравнению со 2-й группой (стресс), на 23% снизилась гипертрофия надпочечников ($6,53 \pm 0,23$ мг/100 г; $p < 0,01$), тогда как при введении элеутерококка – на 9% ($7,67 \pm 0,13$ мг/100 г; $p < 0,05$). Отсутствовали изъязвления на слизистой желудка. Данный феномен объясняется тем, что молекулы полифенолов, взаимодействуя с поверхностью слизистой желудка, способны образовывать мономолекулярные слои, увеличивающие прочность поверхностного слоя клеток [1], соответственно, снижая возможность язвообразования.

При исследовании показателей липидного обмена в сыворотке крови крыс

3-й группы обращает на себя внимание сохранение содержания фракций нейтральных и фосфолипидов на уровне контроля (таблица). В то же время в 4-й группе сохраняется достоверно повышенный, относительно контроля, уровень свободных жирных кислот (на 25%), холестерина (на 10%), лизофосфатидилхолина (на 19%), лизофосфатидилэтаноламина (на 39%), сфингомиелина (на 13%), а также пониженный уровень эфиров холестерина (на 8%) и дифосфатидилглицерина (на 12%). Анализируя полученные результаты, можно предположить, что растительные полифенолы снижают эффект выброса катехоламинов надпочечниками при стрессе, что подтверждается уменьшением их гипертрофии. Это влечет за собой меньшую активность липолиза в жировой ткани, в результате чего величины триацилглицеринов и свободных жирных кислот в сыворотке крови сохраняются на уровне контроля. Также сохраняется этерифицирующая функция печени, но

степень выраженности в росте эфиров холестерина в 3-й и 4-й группах относительно 2-й группы (стресс) различается. Так, при введении экстракта из осей соцветий винограда функция эфиобразования была более интенсивной (увеличение на 22%), чем таковая при введении элеутерококка (увеличение на 13%). Это важный показатель, так как предполагает сохранение синтеза фосфолипидов, блокируемого при стрессе [4]. Кроме этого, экстракт из осей соцветий винограда значительно превосходил экстракт элеутерококка по способности снижать гипертрофию надпочечников. По остальным показателям экстракт из осей соцветий винограда проявлял свойства, сходные с таковыми у экстракта элеутерококка. Наряду с элеутерококком экстракт из осей соцветий винограда может быть рекомендован в качестве стресс-протекторного средства.

Выводы

1. Применение экстракта из осей соцветий винограда амурского при стресс-воздействии сопровождалось выраженным стресс-протекторным действием, которое проявлялось в восстановлении массы надпочечников и нормализации липидного обмена.

2. Механизм стресс-протекторного действия комплекса биологически активных веществ экстракта из осей соцветий винограда амурского и экстракта элеутерококка обусловлен тем фактом, что растительные полифенолы, входящие в их состав, имеют способность улавливать свободные оксигенные и пероксильные радикалы, образуя при этом относительно стабильный феноксил-радикал, который сдерживает процессы перекисного окисления липидов и снимает состояние оксидативного стресса.

3. По исследованным показателям экстракт из осей соцветий винограда амурского показывает более высокую биологическую активность, чем таковая у препарата сравнения «Экстракт элеутерококка®».

4. Оси соцветий винограда амурского являются перспективным видом сырья для получения стресс-протекторных препаратов, содержащих флавоноиды.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, проект № 1326.

Список литературы

1. Афанасьева Ю.Г., Фахретдинова Е.Р., Спирихин Л.В., Насибуллин Р.С. О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран // Хим.-фарм. журн. – 2007. – Т. 41, № 7. – С. 12–14.
2. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. – СПб.: Наука, 1992. – 148 с.
3. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатопротективных средств // Ведомости фарм. комитета. – 1999. – № 2. – С. 9–12.

4. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Рахманин Ю.А. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // Гигиена и сан. – 2005. – № 5. – С. 17–21.

5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

6. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983. – 233 с.

7. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid res. – 1964. – Vol. 5, № 2. – P. 270–272.

8. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, № 1. – P. 497–509.

9. Packer L., Rimbach G. and Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (pinus maritima) bark, pycnogenol // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, № 5–6. – P. 704–724.

10. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease // The Int. J. of Biochem. and Cell Biol. – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.

11. Svetachev, V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // J. Chromatography. – 1972. – Vol. 67, № 2. – P. 376–378.

12. Vaskovsky V.E. Kostetsky E.Y., Vasenden I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatography. – 1975. – Vol. 114, № 1. – P. 129–141.

References

1. Afanas'eva Yu.G., Fahretdinova E.R., Spirihin L.V., Nasibullin R.S. Khim.-farm. zhurn., 2007, T. 41, no. 7, pp. 12–14.

2. Baraboi V.A., Brehman I.I., Golotin V.G., Kudryashov Yu.B. Perekisnoe okislenie i stress, SPb.: Nauka, 1992, 148 p.

3. Vengerovskii A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. Vedomosti farm. Komiteta, 1999, no. 2, pp. 9–12.

4. Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Fomenko S.E., Rahmаниn Yu.A. Gigiena i san., 2005, no. 5, pp. 17–21.

5. Men'shikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. i dr. Okislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty, M.: Slovo, 2006, 556 p.

6. Panin L.E. Biohimicheskie mehanizmy stressa, Novosibirsk: Nauka, 1983, 233 p.

7. Amenta J.S. J. Lipid Res, 1964, Vol. 5, no. 2, pp. 270–272.

8. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. J. Biol. Chem., 1957, Vol. 226, no. 1, pp. 497–509.

9. Packer L., Rimbach G. and Virgili F. Free Radic. Biol. Med., 1999, Vol. 27, no. 5–6, pp. 704–724.

10. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. The Int. J. of Biochem. and Cell Biol., 2007, Vol. 39. pp. 44–84.

11. Svetachev, V.I., Vaskovsky V.E. J. Chromatography, 1972, Vol. 67, no. 2, pp. 376–378.

12. Vaskovsky V.E. Kostetsky E.Y., Vasenden I.M. J. Chromatography, 1975, Vol. 114, no. 1. pp. 129–141.

Рецензенты:

Богданович Л.Н., д.б.н., заведующая лабораторией инновационных медико-биологических исследований и технологий, ФГБУЗ Медицинское объединение ДВО РАН, г. Владивосток;

Палагина М.В., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией фундаментальных и прикладных проблем товароведения, Школа экономики и менеджмента Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 17.10.2014.