

УДК 615.322+577.121

КАЛИНА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ СТРЕССА

© 2011 В.Г. Спрыгин¹, Н.Ф. Кушнерова¹, С.Е. Фоменко¹, В.Ю. Мерзляков¹,
Т.В. Момот², Е.С. Другова¹, Л.Н. Лесникова¹

¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН,
г. Владивосток

² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

Поступила в редакцию 27.04.2011

Показано, что комплекс биологически активных веществ, входящий в состав экстракта из отходов от переработки калины Саржента (*Viburnum Sargentii*) - «Калифен», нормализует соотношение фракций нейтральных и фосфолипидов в печени животных после вертикальной фиксации крыс за дорзальную шейную складку. «Калифен» обнаруживает более выраженные стресс-протекторные свойства, чем элеутерококк, по способности восстанавливать метаболические реакции липидного обмена печени.

Ключевые слова: *вещества растительного происхождения, стресс, обмен липидов*

Разработка безотходной технологии переработки ягодного сырья дикорастущих растений Уссурийской тайги является актуальной задачей. Сегодня в массовом масштабе происходит только получение сока, а отжим (кожица, косточки, околоплодники, оси соцветий) остается невостребованным и выбрасывается, чем засоряет окружающую среду. В тоже время известно, что в этих частях растений присутствует широкий спектр биологически активных веществ (БАВ) [5], способных инактивировать супероксиданионы и выступать в качестве ловушек свободных радикалов [9], являющихся центральным звеном развития патологии в условиях стресса. Экстракция этих веществ из отжима ягод даст возможность разработки на их основе профилактических средств (в виде биологически активных добавок (БАД)) для снятия нарушений метаболических реакций в организме при стрессе.

В настоящее время люди все чаще сталкиваются с различного рода стрессовыми, субэкстремальными и экстремальными факторами.

Спрыгин Владимир Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: vsprygин@poi.dvo.ru

Кушнерова Наталья Федоровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии. E-mail: natasha50@mail.ru

Фоменко Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Мерзляков Валерий Юрьевич, младший научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: vut77@mail.ru

Момот Татьяна Викторовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: kushnerova83@mail.ru

Другова Елена Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: dryg-2005.84@mail.ru

Лесникова Лариса Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: lesnikova@poi.dvo.ru

Механизмы и последствия их действия на организм изучены еще очень слабо. Не вызывает сомнения одно: бурный научно-технический прогресс, урбанизация и акселерация жизни, повышение уровня эмоциональной напряженности, в том числе и вследствие развития международного терроризма привели к росту психосоматической патологии, включая широкий спектр сердечно-сосудистых заболеваний, среди которых атеросклеротический кардиосклероз, склероз коронарных сосудов, инфаркт миокарда вышли на первое место. Несмотря на то, что стресс является приспособительной реакцией организма в ответ на различные внешние и внутренние факторы воздействия, в жизни достаточно часто возникают ситуации, когда внутренних сил и резервов организма не хватает для поддержания гомеостаза и противостояния стрессу. Поэтому возникает вопрос, как помочь организму и смягчить повреждающее действие стресса на организм, то есть осуществить регуляцию стрессового состояния. Известен целый ряд препаратов, обладающих стресс-протекторным действием, так называемых адаптогенов, включающих широко известные средства традиционной народной медицины: женьшень, элеутерококк, лимонник, аралия, родиола розовая и т.д. Однако практически все они относятся к лекарственным растениям, обладают определенным уровнем токсичности и не являются компонентом традиционной пищи человека. В связи с этим была создана и предлагается к употреблению биологически активная добавка (БАД) к пище «Калифен»TM (свидетельство на товарный знак № 228327, ТУ 9168-079-00480052-07), которая была получена из калины (*Viburnum sargentii*) и запатентована как средство, обладающее антирадикальной активностью (патент RU 2220614).

Цель работы: изучение применения БАД «Калифен»TM для профилактики нарушений метаболических реакций в крови и печени животных при стрессе

Методы исследования. Суховоздушное сырье экстрагировали 40% этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1л на 1кг сырья. Калифен – водно-спиртовой (40%) экстракт, который представляет собой композицию различных классов веществ: лейкоантоцианов, катехинов, олигомерных проантоцианидинов, лигнина, флавонолов, органических кислот (фумаровой, аскорбиновой, глицериновой, галактурановой и др.), свободных аминокислот (гистидина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, треонина, серина, глицина, цистеина, метионина, изолейцина, тирозина и др.), сахаров (сахарозы, рафинозы) и других органических соединений. Полифенолы составляют свыше 60% сухого остатка экстракта. В качестве препарата сравнения использовали известный стресс-протектор «Экстракт элеутерококка» [4]. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г, содержащихся на стандартном рационе питания. Водные растворы комплекса полифенолов из калифена и аптечного экстракта элеутерококка (предварительно освобожденные от спирта экстракты путем упаривания в вакууме) вводили в дозе, эквивалентной 100 мг общих полифенолов/кг массы тела. Доза в 100 мг/кг соответствует известной терапевтической дозе для полифенольных гепатопротекторов [2]. Количество общих полифенолов в растворе определяли с помощью реактива Фолина-Чокальтеу [10]. В качестве экспериментальной модели острого стресса использовали вертикальную фиксацию животных за дорзальную шейную складку на 22 часа. Препараты вводили животным перорально 2 раза в течение эксперимента (до вертикальной фиксации и через 4 часа после). Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: 1-я – контроль (интактные животные), 2-я – стресс, 3-я – стресс+калифен, 4-я – стресс+элеутерококк. Крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Экстракты общих липидов из ткани печени готовили по методу [7]. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле [11], а их количественное определение по методу [12]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное определение проводили

методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле по методу [6]. Обнаружение пятен нейтральных липидов осуществляли с помощью паров йода. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов и фосфолипидов, соответственно. Результаты обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента (t), используя статистическую программу Instat (Graph Pad Software Inc.USA, 2005).

Результаты и обсуждение. Изучение состояния липидного обмена печени животных 2-й группы (стресс) относительно контрольных значений (таблица) характеризовалось увеличением свободных жирных кислот (СЖК) на 10% ($p<0,05$), что связано с активизацией периферического липолиза в жировой ткани в ответ на выброс в кровь катехоламинов. Отмеченное увеличение содержания триацилглицеринов (ТАГ) в печени на 9% ($p<0,05$) объясняется их ресинтезом из жирных кислот и глицерина, мобилизуемых при липолизе. Увеличение уровня холестерина (ХС) на 10% ($p<0,05$) можно объяснить активацией его синтеза из ацетил-КоА, который образуется в избытке при липолизе. Уменьшение содержания эфиров жирных кислот (ЭЖК) на 24% ($p<0,001$) и эфиров холестерина (ЭХС) на 15% ($p<0,001$) определяет нарушение этерифицирующей функции печени и, как следствие, синтеза и катаболизма липопротеинов. Полученные данные свидетельствуют о мобилизации липидов, как главных источников энергии, которые транспортируются в ткани в виде СЖК.

В печени стрессированных крыс наблюдались изменения в составе фракций фосфолипидов. Так, стресс вызвал равнозначное увеличение в 1,5 раза ($p<0,001$) содержания лизофракций фосфолипидов – лизофосфатилхолина (ЛФХ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ), что обусловлено увеличением активности фосфолипазы А₂. Одновременно отмечалось уменьшение содержания фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 15% ($p<0,01-0,001$). Повышение содержания метаболически активных фракций фосфатидилсерина (ФС) на 50% ($p<0,01$) и фосфатидилинозита (ФИ) на 29% ($p<0,01$) при стрессе обусловлено реализацией гормональных эффектов через аденилатциклазную систему, запускающую каскад химических реакций липолиза при стрессе. Уменьшение количества дифосфатидилглицерина (ДФГ) на 28% ($p<0,05$), маркерного фосфолипида мембран митохондрий, указывает на угнетение процессов синтеза АТФ, так как этот фосфолипид необходим для функционирования ферментов дыхательной цепи.

Таблица. Влияние растительных препаратов (калифена и элеутерококка) на содержание нейтральных и фосфолипидов в печени крыс при стрессе (% от суммы всех фракций; М±m)

Липидные фракции	Группы животных			
	контроль	стресс	стресс +калифен	стресс+элеуте рококк
нейтральные липиды				
ТАГ	18,61±0,55	20,36±0,44*	**18,46±0,26	**18,83±0,19
СЖК	17,96±0,61	19,66±0,27*	17,85±0,37	18,19±0,48
ЭЖК	17,04±0,14	12,00±0,25*	***17,76±0,44	***16,26±0,75
ХС	18,61±0,55	22,36±0,44***	*18,46±0,26	*18,83±0,19
ЭХС	16,83±0,13	13,40±0,39***	**18,11±0,44*	*15,32±0,75
Остаточная фракция	10,95±0,42	12,22±0,14	9,36±0,70	12,57±0,53
фосфолипиды				
ФХ	38,80±1,29	33,01±0,94**	***39,69±0,74	***40,34±1,03
ЛФХ	5,30±0,19	8,72±0,14***	***4,56±0,47	***4,23±0,62
СМ	10,53±0,76	12,06±0,20*	11,69±0,57	11,24±0,32
ФЭ	22,86±0,55	19,44±0,38***	***22,18±0,43	***21,67±0,26
ЛФЭ	4,99±0,23	7,90±0,35***	***4,17±0,31	***4,86±0,36
ФС	3,10±0,46	4,64±0,16**	***2,91±0,22	***3,09±0,11
ФИ	6,29±0,39	8,14±0,40**	**6,38±0,40	6,77±0,68
ФК	2,70±0,15	2,16±0,24	2,55±0,33	**2,49±0,27
ДФГ	5,43±0,52	3,93±0,25*	*5,87±0,27	*5,31±0,41

Примечание: различия статистически достоверны при: *- p<0,05; **- p<0,01; ***- p<0,001. Звездочки справа – сравнение с 1-й группой, звездочки слева - со 2-й группой. 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 в период стресса калифена (3-я группа) и экстракта элеутерококка (4-я группа) наблюдалась коррекция нарушений, им обусловленных. Так, в печени крыс обеих групп количество ТАГ и СЖК было на уровне контроля, а содержание ЭЖК и ЭХС было достоверно выше, чем таковое при «чистом» стрессе. Обращает на себя внимание достоверно высокое содержание ЭХС в печени животных при введении калифена (на 8%; p<0,05). В содержании фосфолипидных фракций в печени обеих групп животных отмечалось восстановление их соотношения до контрольных значений. Биохимический механизм данного феномена обусловлен тем, что растительные полифенолы, входящие в состав экстрактов стимулируют этерифицирующую функцию печени, подавленную стрессом (полифенолы активируют фермент лецитинхолестеринацилтрансферазу) [3]. Факт достоверного снижения уровня лизофракций (ЛФХ и ЛФЭ) свидетельствует об ингибировании фосфолипаз полифенолами препаратов [8]. Кроме того, растительные полифенолы, входящие в их состав, имеют способность улавливать свободные окисленные и пероксильные радикалы, образуя при этом

относительно стабильный феноксил-радикал, который сдерживает процессы перекисного окисления липидов и снимает состояние оксидативного стресса [9]. Также молекулы полифенолов, взаимодействуя с поверхностью мембран, способны образовывать мономолекулярные слои, увеличивающие прочность поверхностного слоя клеток, и, соответственно, снижать возможность атаки радикалами [1]. При сравнении выраженности эффектов Действия экстракта из отжима калины «Калифен» и элеутерококка, проявляются определенные преимущества первого, так как большинство исследуемых показателей были наиболее близкими к контрольным значениям.

Выводы. Отжим при переработке калины может быть использован для получения комплекса БАВ, обладающего стресс-протекторными свойствами. Введение экстракта из калины «Калифен» на фоне острого стресса способствует снижению интенсивности липолиза. Комплекс полифенолов, входящих в состав экстракта из отжима калины «Калифен» и экстракта элеутерококка, оказывают регуляторный эффект на метаболические реакции в печени крыс, измененные в условиях острого стресса. «Калифен» обнаруживает более выраженные

стресс-протекторные свойства, чем элеутерококк, по способности восстанавливать метаболические реакции липидного обмена печени экспериментальных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Афанасьева, Ю.Г.* О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран / *Ю.Г. Афанасьева, Е.Р. Фахретдинова, Л.В. Спирихин, Р.С. Насибуллин* // Хим.-фарм. журнал. 2007. Т. 41, № 7. С. 12-14.
2. *Венгеровский, А.И.* Доклиническое изучение гепато-защитных средств / *А.И. Венгеровский, И.В. Маркова, А.С. Саратиков* // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9-12.
3. *Гаскина, Т.К.* Изменение скорости лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального перерождения печени / *Т.К. Гаскина, С.А. Курилович, В.Н. Горчаков* // Вопр. мед. хим. 1989. Т. 35, № 4. С. 24-28.
4. *Кушнерова, Н.Ф.* Биологически активные добавки как основа сохранения здоровья и продления профессионального долголетия / *Н.Ф. Кушнерова, В.Г. Спрыгин, С.Е. Фоменко, Т.В. Кушнерова* // Вестник ДВО РАН. 2007. № 6. С. 65-72.
5. *Спрыгин, В.Г.* Отходы от переработки Дальневосточных дикоросов – перспективные источники пищевых антиоксидантов / *В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова, С.Е. Фоменко* // Известия Самарского научно-го центра РАН. 2010. Т. 12, № 1 (3). С. 812-815.
6. *Amenta, J.S.* A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // *J. Lipid. Res.* 1964. Vol. 5, N 2. P.270-272.
7. *Folch, J.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue / *J. Folch, M. Less, G.H. Sloane-Stanley* // *Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. P. 497-509.
8. *Kropacova, K.* Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage / *K. Kropacova, E. Misurova, H. Hakova* // *Radiats. Biol. Radioecol.* 1998. Vol. 38, N 3. P. 411-415.
9. *Sanz, M.J.* Influence of a series of natural flavonoids on free-radical generating systems and oxidative stress / *M.J. Sanz, M.L. Ferrandiz, M. Cejudo et al.* // *Xenobiotica.* 1994. Vol. 24, N. 7. P. 689-699.
10. *Singleton, V.L.* Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / *V.L. Singleton, R. Orthofer et al.* // *Oxidants and Antioxidants*, Pt A. L. Packer. San Diego, Academic Press Inc., 1999. Vol. 299. P. 152-178.
11. *Svetachev, V.I.* A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids / *V.I. Svetachev, V.E. Vaskovsky* // *J. Chromatogr.* 1972. Vol. 67, N 2. P. 376-378.
12. *Vaskovsky, V.E.* A universal reagent for phospholipid analysis / *V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasenden* // *J. Chromatography.* 1975. Vol. 114, N 1. P.129-141.

GUELDER-ROSE – THE PERSPECTIVE REMEDY SOURCE OF STRESS PREVENTION

© 2011 V.G. Sprygin¹, N.F. Kushnerova¹, S.E. Fomenko¹, V.Yu. Merzlyakov¹,
T.V. Momot², E.S. Drugova¹, L.N. Lesnikova¹

¹ Pacific Oceanological Institute named after V.I. Ilyichev FEB RAS, Vladivostok
² Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunsky FEB RAS, Vladivostok

It is shown that complex of biologically active substances which is a part of waste extract from processing the guelder-rose (*Viburnum Sargentii*) - "Kalifen", normalizes a parity of fractions neutral and phospholipids in liver of animals after rats vertical fixing at dorsal cervical fold. «Kalifen» finds out more expressed stress-protective properties than eleutherococcus, on ability to restore metabolic reactions of liver lipid metabolism.

Key words: *phyto genesis substances, stress, lipids metabolism*

Vladimir Sprygin, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: vsprygin@poi.dvo.ru

Nataliya Kushnerova, Doctor of Biology, Professor, Chief of the Biochemistry Laboratory. E-mail: natasha50@mail.ru

Svetlana Fomenko, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Valeriy Merzlyakov, Minor Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: vum77@mail.ru

Tatiana Momot, Candidate of Medicine, Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: kushnerova83@mail.ru

Elena Drugova, Minor Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: dryg-2005.84@mail.ru

Larisa Lesnikova, Candidate of Biology, Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: lesnikova@poi.dvo.ru