

УДК 615.322+577.121

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТЖИМА ПОСЛЕ ОТДЕЛЕНИЯ СОКА ИЗ ПЛОДОВ РЯБИНЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2014 Т.В. Момот<sup>1,3</sup>, Н.Ф. Кушнерова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета

<sup>2</sup> Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН,  
г. Владивосток

<sup>3</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

Поступила в редакцию 03.04.2014

Показано, что комплекс биологически активных веществ, входящий в состав экстракта из отжима плодов рябины (*Sorbus amurensis* Koechne) нормализует размерные характеристики эритроцитов, показатели антиоксидантной системы и липидные составляющие мембран у животных после стресс-воздействия (вертикальная фиксация за дорзальную шейную складку на 22 часа). Экстракт рябины обнаруживает более выраженные фармакологические свойства, чем коммерческий препарат «Экстракт элеутерококка», по способности восстанавливать размерные характеристики эритроцитов и показатели липидной составляющей их мембран у животных.

Ключевые слова: *экстракт рябины, экстракт элеутерококка, стресс, эритроцит, липиды*

В последние годы во всем мире растет интерес к исследованию и применению для профилактики заболеваний населения препаратов природного происхождения, представляющих собой экстракты, выделенные из них компоненты, порошки из растительного и животного сырья. В России на фармацевтическом рынке представлены средства традиционной и народной медицины из растений Уссурийской тайги. Это экстракт женьшеня, экстракт элеутерококка, настойка аралии, настойка родиолы розовой, настойка лимонника. Однако запасы этих растений снижаются ежегодно в связи с преимущественным использованием корней и семян. Следовательно, очевидна актуальность и необходимость поиска и изучения новых источников сырья, в частности, использование отходов от переработки (отжим) после отделения сока ягод и плодов, особенно если они являются конечным бросовым продуктом в технологической цепи. Отходы от переработки представляют ценное сырье для получения биологически активных веществ. Это большой возобновляемый сырьевой резерв, который в настоящее время не утилизируется и не используется должным образом. Интерес к этому направлению исследований обусловлен тем,

что в настоящее время становится все более актуальным вопрос о фармакологической регуляции стресса, механизмы и воздействие которого на организм нельзя считать окончательно изученными. Известно, что усиление свободно-радикальных и перекисных процессов, а также оксидативный стресс лежат в основе патогенеза синдрома адаптационного перенапряжения, хронической усталости, атеросклероза и др. [4]. Перспективными корректорами метаболических изменений, возникающих при различных видах стресса, являются природные полифенольные соединения, оказывающие антирадикальное и антиоксидантное действие [3]. Однако в аптечной сети в качестве стресс-протектора, разработанного из природного сырья, представлен только «Экстракт элеутерококка». В связи с этим целью работы явилось изучение влияния экстракта из отжима плодов рябины (*Sorbus amurensis* Koechne) при экспериментальном стресс-воздействии.

**Методы исследования.** Сухой отжим после отделения сока рябины измельчали до размеров частиц, равных 0,1-0,5 см и экстрагировали 40% этанолом, где в процессе реперколяции из 1 кг сырья выход экстракта составлял 1 л. Экстракт содержит в составе экстрактивных веществ, в среднем, 11% общих полифенолов, представленных катехинами, кверцетином, флавонолами, лигнином, органическими кислотами, каротиноидами и рядом других органических соединений. Готовый экстракт обладает низкой

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

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

токсичностью ( $LD_{50}$  составляет 56 мг/кг) и не оказывает вредного действия при длительных введениях в желудок и парентерально, что позволяет провести экспериментальные исследования, показавшие выраженное стресс-протекторное действие экстракта. В качестве препарата сравнения использовали полифенольный комплекс из аптечного экстракта элеутерококка. Препараты вводили животным внутрижелудочно через зонд 2 раза в течение эксперимента (до вертикальной фиксации и через 4 часа после). Водные растворы (предварительно освобожденные от спирта путем упаривания в вакууме) сухих остатков экстрактов отжима рябины и элеутерококка вводили в количестве 100 мг общих полифенолов/кг массы тела [2]. Эксперимент проводили на белых крысах-самцах линии Вистар с массой тела 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария и на стандартном рационе питания. Стресс вызывали путем вертикальной фиксации животных за дорзальную шейную складку на 22 часа. Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: 1-я – контрольная (интактные животные), 2-я – стресс, 3-я – стресс+экстракт из отжима рябины, 4-я – стресс+экстракт элеутерококка. 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 (Страсбург, 1986). У животных определяли массу надпочечников и количество изъязвлений на слизистой желудка. Кровь для исследований собирали из шейной вены животных в вакуэты с 1% раствором гепарина. Средний диаметр и объем эритроцита определяли на гематологическом анализаторе «Abacus» (Diatop, Австрия). Осмотическую резистентность эритроцитов к изменению концентрации NaCl рассчитывали по методу Б.Л. Эндрю [6]. Активность супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), уровень малонового диальдегида и восстановленного глутатиона оценивали по методам, описанным в руководстве Т.П. Новгородцевой и др. [5]. Эритроцитарную массу получали трехкратным центрифугированием в физрастворе. Мембраны эритроцитов – путем гемолиза эритроцитов в дистиллированной воде. Экстракты общих липидов из мембран эритроцитов выделяли по методу J. Folch et al. [8]. Определение общих фосфолипидов осуществляли по методу V.E. Vaskovsky et al. [11]. Количественное определение холестерина проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле [7]. Количественные данные обрабатывали 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. Исследование одобрено Комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН.

**Результаты и 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 40% ( $8,40 \pm 0,22$  мг/100 г массы против  $6,00 \pm 0,37$  мг/100 г массы в контроле;  $p < 0,001$ ). Количество кровоизлияний на слизистой желудка составило  $3,0 \pm 0,06$  шт/жив, в контроле – 0. При исследовании размерных характеристик эритроцитов (средний диаметр и средний объем) отмечались однонаправленные их изменения в сторону увеличения. Так, средний диаметр эритроцитов превышал контрольные значения на 22%, что составляло  $7,85 \pm 0,09$  мкм по сравнению с  $6,46 \pm 0,02$  мкм в контроле ( $p < 0,001$ ), а средний объем – на 79% ( $96,74 \pm 2,17$  мкм<sup>3</sup> против  $53,92 \pm 1,81$  мкм<sup>3</sup> в контроле;  $p < 0,001$ ). Снизился порог начала гемолиза эритроцитов до  $0,50 \pm 0,02\%$  NaCl и завершения гемолиза при концентрации NaCl  $0,45 \pm 0,02\%$  (в контроле начало гемолиза происходило при  $0,45 \pm 0,01\%$ , а завершение при  $0,35 \pm 0,01\%$  NaCl). При стрессе отмечалось повышение активности супероксиддисмутазы (на 45%) и снижение количества восстановленного глутатиона (на 35%) (табл. 1).

Содержание общих фосфолипидов в мембранах эритроцитов стрессированных крыс было ниже на 20% относительно контрольных величин, при этом количество холестерина выше на 29%. Это обусловило повышение коэффициента холестерин/фосфолипиды до  $0,58 \pm 0,02$  (в контроле  $0,37 \pm 0,02$ ). Такие изменения изученных биохимических показателей свидетельствуют о напряжении системы антиоксидантной защиты. Увеличение концентрации малонового диальдегида на 33% определяет активацию перекисного окисления липидов, а также повышение проницаемости мембран. Таким образом, воздействие стресса сопровождается рассогласованием системы антиоксидантной защиты мембран, активацией перекисного окисления липидов, что обуславливает изменение размерных характеристик и снижение устойчивости клеток к гемолитическому агенту.

**Таблица 1.** Влияние растительных препаратов (экстракт рябины, элеутерококк) на биохимические показатели эритроцитов крыс при стрессе ( $M \pm m$ )

Биохимические параметры	1 группа Контроль (интактные)	2 группа стресс	3 группа стресс+экстракт рябины	4 группа стресс+элеутерококк
супероксид-дисмутаза (ед/мг белка)	12,87±0,60	18,66±1,13 <sup>3</sup>	12,69±0,67	14,93±0,70 <sup>1</sup>
восстановленный глутатион (нмоль/мг белка)	1,71±0,07	1,11±0,02 <sup>3</sup>	1,83±0,05	1,67±0,03
малоновый диальдегид (мкмоль/мл)	5,80±0,19	7,71±0,27 <sup>3</sup>	5,78±0,30	6,78±0,32 <sup>1</sup>
общие фосфолипиды (% от общих липидов)	65,11±1,43	52,44±1,68 <sup>3</sup>	64,78±1,25	60,37±1,39 <sup>1</sup>
холестерин (% от общих липидов)	23,80±1,48	30,62±1,32 <sup>2</sup>	24,42±1,39	27,58±0,69 <sup>1</sup>
коэффициент холестерин/фосфолипиды	0,37±0,02	0,58±0,02 <sup>3</sup>	0,38±0,02	0,46±0,02 <sup>2</sup>

Примечание: различия статистически значимы при –<sup>1</sup> -  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> -  $p < 0,01$ ; <sup>3</sup> -  $p < 0,001$  по сравнению с контролем

При введении экстракта рябины и элеутерококка (3-я и 4-я группы) на фоне стресса (таблица), по сравнению с таковыми показателями у крыс 2-й группы (стресс), нормализовался вес надпочечников и практически отсутствовали язвы слизистой желудка. При сравнении физиологических и биохимических параметров в эритроцитах крыс 3-й группы (экстракт рябины) с таковыми в контроле следует отметить отсутствие достоверных различий, тогда как в 4-й группе (элеутерококк) они были выявлены по ряду показателей. Так, средний диаметр эритроцитов превышал контрольные значения на 6% ( $6,87 \pm 0,03$  мкм;  $p < 0,001$ ), средний объем на 20% ( $70,08 \pm 2,5$  мкм<sup>3</sup>). Оба экстракта препятствовали стрессорному снижению осмотической резистентности эритроцитов. Однако, если в 3-й группе порог начала и завершения гемолиза был сдвинут в сторону большей устойчивости к гемолизирующему агенту (начало при  $0,40 \pm 0,02\%$  NaCl, завершение при  $0,30 \pm 0,01\%$  NaCl), то в 4-й группе устойчивость эритроцитов еще была понижена (начало при  $0,47 \pm 0,01\%$  NaCl, завершение при  $0,37 \pm 0,01\%$  NaCl). Также активность супероксиддисмутазы превышала контроль на 16%, а количество малонового альдегида на 17%. При этом общие фосфолипиды в мембране эритроцитов крыс 4-й группы были снижены на 8%, а холестерина на 16%, что способствовало повышенному коэффициенту холестерин / фосфолипиды на 24%.

**Выводы:** действие стресс-вертикальной фиксации крыс вызывает напряжение системы антиоксидантной защиты и разбалансировку липидного состава мембран эритроцитов, что

сопровождается изменением их размерных характеристик и, как следствие, функциональных свойств. Введение растительных экстрактов препятствует таким нарушениям. Это обусловлено тем, что растительные полифенолы, входящие в состав экстрактов ингибируют фосфолипазы [9]. Также растительные полифенолы являются «ловушками» свободных радикалов, что сдерживает процессы перекисного окисления липидов [10]. Молекулы полифенолов взаимодействуют с поверхностью мембран, и этим увеличивают прочность поверхностного слоя клеток, что препятствует язвообразованию и расширяет порог осмотической устойчивости [1]. Однако при сравнении эффектов действия экстракта из отвара рябины и элеутерококка, наиболее близкими к контрольным значениям были величины изученных параметров эритроцитов в 3-й группе (экстракт рябины). Также оба экстракта обладают мембранозащитными свойствами при действии стрессовых факторов. Совместное применение экстракта из отвара рябины давало больший защитный эффект в отношении показателей антиоксидантной защиты и физиологических характеристик эритроцитов. Применение растительных экстрактов может решить проблему развития стрессовых заболеваний.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Афанасьева, Ю.Г. О механизме взаимодействия некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран / Ю.Г. Афанасьева, Е.Р. Фахретдинова, Л.В. Спирхин, Р.С. Насибуллин // Хим.-фарм. журн. 2007. Т. 41, № 7. С. 12-14.

2. Венгеровский, А.И. Доклиническое изучение гепатозащитных средств / А.И. Венгеровский, И.В. Маркова, А.С. Саратиков // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9-12.
3. Кушнерова, Н.Ф. Использование биологически активной добавки, приготовленной на основе ягод калины, для предотвращения физиологических и биохимических изменений эритроцитов, возникающих при различных стрессах / Н.Ф. Кушнерова, С.Е. Фоменко, Л.Н. Лесникова и др. // Вопросы питания. 2011. Т. 80, № 1. С. 64-69.
4. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин и др. // Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
5. Новгородцева, Т.П. Руководство по методам исследования параметров системы «Перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» в биологических жидкостях / Т.П. Новгородцева, Э.А. Эндакова, В.И. Янькова. – Владивосток: Изд-во Дальневосточного университета, 2003. 80 с.
6. Эндрю, Б.Л. Экспериментальная физиология. – М.: Мир, 1972. 324 с.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 // Xenobiotica. 1994. Vol. 24, N. 7. P. 689-699.
11. 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.

## USING THE EXTRACTION AFTER JUICE SEPARATION FROM MOUNTAIN ASH FRUITS FOR RECEIVING THE STRESS-PROTECTION DRUGS

© 2014 Т.В. Момот<sup>1,3</sup>, N.F. Kushnerova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Biomedicine School at Far East Federal University

<sup>2</sup> Pacific Oceanologic Institute named after V.I. Ilyichev DVO RAS, Vladivostok

<sup>3</sup> Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy DVO RAS, Vladivostok

It is shown that the complex of biologically active agents which is a part of extract from separation of mountain ash (*Sorbus amurensis* Koechne) fruits normalizes dimensional characteristics of erythrocytes, indicators of antioxidant system and lipid components of membranes at animals after a stress influence (vertical fixing for a dorsal cervical fold for 22 hours). Extract of mountain ash finds more expressed pharmacological properties, than the commercial drug "Eleutherococcus extract" on ability to restore dimensional characteristics of erythrocytes and indicators of a lipid component of their membranes at animals.

Key words: *mountain ash extract, eleutherococcus extract, stress, erythrocyte, lipids*

---

*Tatiana Momot, Candidate of Medicine, Associate Professor at the Department of Fundamental Medicine, Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: kushnerova83@mail.ru*  
*Nataliya Kushnerova, Doctor of Biology, Professor, Head of the Biochemistry Department. E-mail: natasha50@mail.ru*