

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ КАЛИНЫ НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕССЕ

Лесникова Л.Н., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г.,
Мерзляков В.Ю., Другова Е.С.

ФГБУН Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, e-mail: lesnikova@poi.dvo.ru

Цель данного исследования – оценка эффективности применения экстракта из отвжима калины для коррекции показателей липидного обмена в печени крыс в условиях экспериментального стресса. Препаратом сравнения служил аптечный экстракт элеутерококка. Модель стресса – вертикальная фиксация за дорзальную складку в течение 22 часов. Работа проводилась с использованием методов микротонкослойной хроматографии. Отмечалось снижение величин главных фосфолипидов: фосфатилхолина и фосфатидилэтаноламина – при росте значений лизофракций. Накопление лизофосфолипидов в ткани печени способствует повышению проницаемости мембран гепатоцитов. Увеличилось количество фосфатидинозита, фосфатидилсерина, сфингомиелина, метаболически активных фракций, участвующих в работе мембраносвязанных ферментов. Выявлены изменения в соотношении отдельных фракций нейтральных липидов: снижение общего количества эфиров холестерина и эфиров жирных кислот сопровождалось увеличением содержания свободных жирных кислот, холестерина и триацилглицеринов. Сфингомиелин совместно с холестерином является стабилизатором клеточных мембран. Такие изменения в соотношении липидных компонентов указывают на повышение активности фосфолипаз и усиление перекисного окисления липидов. Введение животным в условиях стресса экстракта калины обусловило восстановление соотношения липидных фракций до контрольных значений. Результаты показали, что по эффективности восстановления липидного состава ткани печени экстракт калины превосходил экстракт элеутерококка как известного стресс-протектора. Доказано, что экстракт калины, содержащий нейтральные липиды, фосфолипиды и комплекс полифенольных соединений, может быть применен для профилактики нарушений липидного обмена в печени при стрессе.

Ключевые слова: стресс, печень, экстракт калины, элеутерококк, фосфолипиды, нейтральные липиды.

EFFECT OF VIBURNUM EXTRACT ON LIVER LIPID METABOLISM UNDER EXPERIMENTAL STRESS

Lesnikova L.N., Kushnerova N.F., Fomenko S.E., Sprygin V.G.,
Merzlyakov V.Yu., Drugova E.S.

Pacific Oceanological Institute named after V.I. Ilychev, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, e-mail: lesnikova@poi.dvo.ru

The purpose of this study is to evaluate the effectiveness of using extract from viburnum extract to correct lipid metabolism in the liver of rats under experimental stress. The comparison drug was a pharmaceutical extract of Eleutherococcus. The stress model is vertical fixation behind the dorsal fold for 22 hours. The work was carried out using microfine layer chromatography methods. There was a decrease in the values of the main phospholipids: phosphatylcholine and phosphatidylethanolamine with an increase in the values of lysofractions. The accumulation of lysophospholipids in liver tissue increases the permeability of hepatocyte membranes. The amount of phosphatidylinosite, phosphatidylserine, sphingomyelin, and metabolically active fractions of membrane-bound enzymes involved in the work has increased. Changes in the ratio of individual fractions of neutral lipids were revealed: a decrease in the total amount of cholesterol esters and fatty acid esters was accompanied by an increase in the content of free fatty acids, cholesterol and triacylglycerols. Sphingomyelin together with cholesterol is a stabilizer of cell membranes. Such changes in the ratio of lipid components indicate an increase in the activity of phospholipases and increased lipid peroxidation. The introduction of viburnum extract to animals under stress conditions caused the restoration of the ratio of lipid fractions to control values. The results showed that in terms of the effectiveness of restoring the lipid composition of liver tissue, viburnum extract was superior to eleutherococcus extract, as a well-known stress protector. It is proved that viburnum extract, containing neutral lipids, phospholipids and a complex of polyphenolic compounds, can be used to prevent disorders of lipid metabolism in the liver under stress.

Keywords: stress, liver, viburnum extract, eleutherococcus, phospholipids, neutral lipids.

Введение

Переработка ягодного сырья сегодня занимает одно из важных мест в отечественной пищевой промышленности. Технология производства пищевых продуктов на основе ягод (сок, варенье, мармелад, джем, начинка для хлебобулочных изделий и др.) сопряжена с ростом ресурсопотребления. При этом происходит воздействие на окружающую природную среду, так как отходы от переработки ягод (косточки, кожица, кисть) должным образом не используются, а утилизируются на неконтролируемые свалки либо на мусорные полигоны для последующего сжигания. В результате образуются вредные и даже опасные токсические газы, негативно влияющие на экологию районов расположения перерабатывающих предприятий и сбора дикорастущих ягодных культур. Между тем известно, что в составе отходов от переработки ягодных растений присутствуют витамины, микро- и макроэлементы, соединения растительных полифенолов, проявляющих антиоксидантные свойства и способность к выведению из организма ионов тяжелых металлов [1, 2, 3]. В Уссурийской тайге произрастает значительное количество разнообразных ягодных культур: боярышник, рябина, виноград, лимонник, калина, шиповник и др. Проведенные ранее исследования выявили наличие в отжиме из осей соцветий, кожицы, семян, листьев и черешков ягодных культур широкого спектра полезных для здоровья человека биологически активных веществ [4]. В состав водно-спиртового экстракта из отжима калины входят полифенольные соединения, биофлавоноиды, микро- и макроэлементы. В выделенной из экстракта фракции общих липидов исследовались состав и соотношение отдельных фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ) [5]. В ряду ФЛ присутствуют фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилсерин (ФС). Данные фосфолипиды не только служат главными компонентами биомембран, но и способны к взаимному превращению, так как связаны между собой метаболически. Нейтральные липиды представлены как мембранообразующими фракциями (холестерин (ХС)), свободные жирные кислоты (СЖК)), так и компонентами-метаболитами для ряда биохимических реакций в живом организме: эфиры холестерина (ЭХС), эфиры жирных кислот (ЭЖК), триацилглицерины (ТАГ). Важно отметить наличие комплекса полифенолов (ПФ), которые обладают антиоксидантными свойствами и нейтрализуют активные формы кислорода (АФК) [6]. В соответствующих концентрациях АФК выполняют важные регуляторные функции в различных окислительно-восстановительных реакциях, сопряженных с работой механизмов сигнальной клеточной системы. Однако при их избытке АФК реагируют с молекулами белков, липидов, нуклеиновых кислот, обуславливая повреждение и изменение их структуры. При этом нарушается функционирование системы антиоксидантной защиты и резко снижается устойчивость организма в экстремальных условиях [7].

Негативное влияние стресса, испытываемого человеком в условиях глобальной урбанизации, экологических и политических ситуаций, – одна из актуальных проблем современной жизни. Характер ответа организма в условиях стресса зависит от продолжительности и интенсивности действия патологических факторов. При умеренном воздействии повышается активность механизмов биохимической адаптации к новым условиям, а длительное и интенсивное воздействие стрессовых факторов разной природы приводит к истощению метаболических резервов, повышенной концентрации АФК. Последние формируют состояние окислительного стресса за счет активизации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Результаты исследований, проведенных на животных, доказывают, что окислительный стресс обуславливает возникновение и развитие различных патологических процессов [8]. В организме человека оксидативный стресс вызывает атеросклероз, диабет, ожирение и иное, а также приводит к нарушениям в сердечной деятельности и, как результат, преждевременному старению организма [9]. В связи с этим возникает необходимость в профилактике стрессовых воздействий с помощью растительных экстрактов, содержащих широкий спектр биологически активных веществ, участвующих в метаболических реакциях организма.

Цель исследования – изучить влияние экстракта из отвжима калины на показатели липидного обмена печени крыс в условиях экспериментального стресса.

Материал и методы исследования

Извлечение экстракта из исходного сырья осуществляли методом реперколяции 40%-ным этиловым спиртом. В качестве препарата сравнения применяли аптечный «Экстракт элеутерококка» – известный гепатопротектор. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г. Животных содержали на стандартном рационе питания в условиях вивария. Стресс вызывали путем вертикальной фиксации животных за дорзальную шейную складку на 22 часа [10]. Растворы экстрактов элеутерококка и калины вводили парентерально дважды: до вертикальной фиксации и через 4 часа после в дозе 100 мг общих ПФ на 1 кг массы тела (терапевтическая доза для полифенольных гепатопротекторов). Более 30% от сухого остатка экстракта калины составляли общие ПФ. Экспериментальные животные в количестве 40 особей были разделены на четыре равные группы: 1-я – контроль, 2-я – стресс, 3-я – стресс + экстракт калины, 4-я – стресс + экстракт элеутерококка. Эксперименты с животными проводили в соответствии: с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей; с Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Липидные

экстракты из ткани печени готовили согласно методу [11]. С помощью микротонкослойной хроматографии на силикагеле осуществляли разделение ФЛ и НЛ на отдельные фракции [12, 13]. Результаты представлены в процентах от общей суммы НЛ и ФЛ соответственно. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета программ InStat 3.0 (Graph Pad. Software Inc. USA, 2005).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование липидного обмена в печени животных, подвергнутых стрессу (2-я группа), показало, что фракционный состав НЛ характеризовался увеличением количества свободных жирных кислот (СЖК) на 9,0% ($p < 0,05$), триацилглицеринов (ТАГ) на 9,5% ($p < 0,05$) и холестерина (ХС) на 19,0% ($p < 0,05$) относительно контроля (рис. 1), что указывает на активацию периферического липолиза. В результате образуется избыточное количество ацетил-КоА, который и обуславливает активный синтез ХС.



Рис. 1. Влияние экстрактов из калины и элеутерококка на фракционный состав нейтральных липидов в печени крыс при стрессе. ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина. Различия статистически достоверны при: 1, а – $p < 0,05$; 2, б – $p < 0,01$; 3, в – $p < 0,01$. 1, 2, 3 – сравнение с контролем; а, б, в – сравнение со стрессом

К тому же скорость катаболизма липидов усиливает синтез жирных кислот и глицерина, что и определяет увеличение содержания ТАГ. На нарушение этерифицирующей функции печени указывает снижение уровня эфиров жирных кислот (ЭЖК) на 28% ($p < 0,001$) и эфиров холестерина (ЭХС) на 20% ($p < 0,001$).

При анализе фосфолипидного спектра при стрессе отмечалось снижение уровня главных структурных фосфолипидов (ФХ и ФЭ) в среднем на 18% ($p < 0,01-0,001$) (рис. 2).

При этом значительно увеличилось количество метаболически активных фракций – ФС на 27% ($p < 0,01$) и фосфатидинозита (ФИ) на 26% ($p < 0,01$), что обуславливает ферментативную активность $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФ-азы}$. Обращают на себя внимание существенные изменения в значениях лизофосфолипидов: повысилось содержание лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 34% ($p < 0,001$) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 32% ($p < 0,001$). Данный факт подтверждает повышение активности фермента фосфолипазы A_2 и усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). Дифосфатидилглицерин (ДФГ) – фосфолипид, участвующий в ферментативных реакциях дыхательной цепи. Снижение уровня ДФГ на 35% ($p < 0,05$) указывает на замедление процессов синтеза АТФ.



Рис. 2. Влияние экстрактов из калины и элеутерококка на фракционный состав фосфолипидов в печени крыс при стрессе. ФХ – фосфатидилхолин, ЛФЭ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилхолин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидинозит, ФК – фосфатидная кислота, ДФГ – дифосфатидилглицерин. Различия статистически достоверны при: 1, а – $p < 0,05$; 2, б – $p < 0,01$; 3, в – $p < 0,01$. 1, 2, 3 – сравнение с контролем; а, б, в – сравнение со стрессом

Показательно, что при стрессе отмечался повышенный уровень сфингомиелина (СМ) (12,96%, $p < 0,05$) по сравнению с контрольным значением (11,43%). Это компенсаторная реакция в ответ на снижение уровня ФХ. Представленные изменения в содержании отдельных фракций ФЛ и НЛ свидетельствуют о дисбалансе в соотношении липидных компонентов в ткани печени крыс 2-й группы.

Введение экстрактов калины (3-я группа) и элеутерококка (4-я группа) экспериментальным животным способствовало положительной динамике в нормализации липидного обмена. Так, количество СЖК в печени животных, которым вводили экстракт калины, составляло 18,65% (в контроле 18,76%), ТАГ – 19,26% ($p < 0,01$) (в контроле 19,41%). А аналогичные показатели в группе животных при введении экстракта элеутерококка были 19,63% и 18,83% ($p < 0,01$) соответственно. Следовательно, содержание СЖК и ТАГ в обеих группах животных было равным контрольным значениям. При этом после введения экстракта калины уровень ЭХС (18,91%, $p < 0,01$) и ЭЖК (18,56%, $p < 0,001$) был достоверно выше в сравнении с «чистым» стрессом (17,63% и 17,84% соответственно). В печени животных 4-й группы данные фракции имели более низкие значения: ЭХС составляли 16,12% ($p < 0,05$), а ЭЖК – 17,06% ($p < 0,001$). Таким образом, применение обоих экстрактов препятствовало накоплению ТАГ и СЖК и способствовало сохранению этерифицирующей функции печени, что предполагает их восстановительные свойства.

Во фракциях фосфолипидов следует отметить более высокое содержание ФХ не только в сравнении с соответствующим показателем у животных 2-й группы (стресс), но и с аналогичным показателем контрольной группы. Так, количество ФХ при применении экстрактов калины и элеутерококка составляло 41,59% ($p < 0,001$) и 40,44% ($p < 0,001$) соответственно. При стрессе этот показатель был 32,06%, в контрольной группе животных – 37,75%. А содержание ФЭ в печени животных 3-й и 4-й групп соответствовало контрольному значению, но было выше, чем при стрессе.

При этом количество ЛФХ и ЛФЭ достоверно уменьшилось и максимально приблизилось к контрольному уровню, что объясняется подавлением активности фосфолипаз полифенолами, входящими в состав экстрактов. Обладая способностью улавливать свободные радикалы, полифенольные соединения тем самым замедляют процессы перекисного окисления липидов, что, в свою очередь, позволяет смягчить состояние окислительного стресса [14]. Отмечалось увеличение количества фосфатидной кислоты, являющейся источником фосфолипидов. На усиление активности ферментов дыхательной цепи и синтеза молекул АТФ указывает повышение уровня ДФГ в ткани печени экспериментальных животных. Таким образом, введение экстрактов калины и элеутерококка способствовало восстановлению соотношения фракций ФЛ в печени обеих групп животных. Применение экстракта калины показало более выраженный восстановительный эффект, в отличие от экстракта элеутерококка.

Заключение

Результаты проведенных исследований показывают, что при стрессе в липидном обмене печени животных наблюдались изменения, сопровождающиеся нарушением в

составе и соотношении отдельных фракций нейтральных липидов и фосфолипидов. Повышение содержания свободных жирных кислот и триацилглицеринов указывает на развитие жирового гепатоза. Интенсивность липолитических реакций в жировой ткани обуславливает выход жирных кислот в кровяное русло и активный транспорт их в печень. Дальнейшее окисление ЖК сопровождается образованием ацетил-КоА, который в большой концентрации приводит к возникновению и развитию атеросклероза. Рост величин фракций ЛФХ и ЛФЭ при одновременном снижении уровня соответствующих фосфолипидов (ФХ и ФЭ) подтверждает известные в литературе данные об усилении перекисного окисления липидов и активации фосфолипаз.

Применение экстрактов из отвара калины и элеутерококка восстанавливало баланс фракционного состава НЛ и ФЛ в печени опытных животных до контрольного уровня. По степени выраженности восстановительного эффекта экстракт калины превосходил экстракт элеутерококка. По-видимому, такое проявление гепатозащитного действия экстракта калины обусловлено наличием в его составе комплекса полифенольных соединений, а также важных липидных компонентов, способствующих восстановлению и стабилизации процессов метаболизма липидов в условиях стресса.

Таким образом, применение экстракта из отвара калины в качестве профилактического средства при стрессе представляется актуальным и перспективным.

Список литературы

1. Четкина А.Ю., Мурадова М.Б., Проскура А.В., Лепешкин А.И., Надточий Л.А., Хашим М.А. Комплексная переработка ягод брусники и клюквы // Ползуновский вестник. 2021. № 2. С. 75-81. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.02.010.
2. Бакин И.А., Мустафина А.С., Вечтомова Е.А., Колбина А.Ю. Использование вторичных ресурсов ягодного сырья в технологии кондитерских и хлебобулочных изделий // Техника и технология пищевых производств. 2017. Т. 45. № 2. С. 5-12.
3. Федорцов Н.М., Будкевич Р.О. Перспективы использования полифенолов в качестве источников антиоксидантов для функционального питания // Современная наука и инновации. 2022. № 3. С. 70-87. DOI: 10.37493/2307-910x.2022.3.6.
4. Dziadek K.A., Kopec A, Nabaszewska M. Potential of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by-products: bioactive compounds and antioxidant activity of leaves and petioles // European Food Research and Technology. 2019. Vol. 245. P. 763-772. DOI: /10.1007/s00217-018-3198-x.

5. Момот Т.В., Кушнерова Н.Ф. Обоснование выбора сырьевых источников из дальневосточной флоры для получения фармацевтических препаратов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2016. Т. 18. № 2. С. 146-149.
6. Дергачева Д.И., Кляйн О.И., Мариничев А.А., Гесслер Н.Н. Антиоксидантное действие природных полифенолов на митохондрии печени крыс с токсическим гепатитом // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2020. Т. 37. № 3. С. 197-207. DOI: 10.31857/50233475520020036.
7. Дудинская Е.Н., Мачехина Л.В., Ерусланова К.А., Доготарь О.А., Рыльцева Л.П., Лызлова Н.Ю., Щепин Н.А., Котовская Ю.В., Ткачева О.Н. Антигипертензивная терапия: возможность управления процессами репликативного клеточного старения // Российский кардиологический журнал. 2020. Т. 25(3S). С. 7-15. DOI: /10.15829/1560-4071-2020-3974.
8. Гильдилов Д.И. Окислительный стресс у животных: взгляд патофизиолога // Российский ветеринарный журнал. 2020. № 4. С. 10-18. DOI: 10.32416/2500-4379-2020-4-10-18.
9. Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Кандалинцева Н.В., Мартинович Г.Г., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс при старении // Успехи геронтологии. 2020. Т. 33. № 1. С. 10-22. DOI: 10.349.22/AE.2020.33.1.001.
10. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Рахманин Ю.А. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // Гигиена и санитария. 2005. № 5. С. 17-21.
11. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // Journal of Biological Chemistry. 1957. Vol. 226. Is. 1. P. 497-509. DOI: 19.1016/s0021-9258(18)64849-5.
12. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // Chromatography. 1972. Vol. 67. Is. 2. P. 376-378. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)91245-2.
13. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // Journal of Lipid Research. 1964. Vol. 5. Is. 2. P. 270-272. DOI: 10.1016/S0022-2275(20)40251-2.
14. Белова Е.А., Кавушевская Н.С., Кривых Е.А., Коваленко Л.В. Антирадикальная активность полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium* и влияние их на оксидативный статус // Вестник Новгородского Государственного Университета, Серия: Медицинские науки. 2022. №. 1(126). С. 47-51. DOI: 10.34680/2076-8052.2022.1(126).47-51.