

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-22-26

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *SARGASSUM PALLIDUM* И ЭЛЕУТЕРОКОККА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНО-ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С. Е. Фоменко*, Н. Ф. Кушнерова, В. Г. Спрыгин¹

Исследовано влияние экстракта из морской бурой водоросли *Sargassum pallidum* и экстракта элеутерококка на показатели углеводного и липидного обмена в печени мышей при стрессе. Экспериментальный острый стресс моделировали однократной вертикальной фиксацией животных за дорсальную шейную складку на 24 ч. Экстракт *S. pallidum* и элеутерококка вводили за 1 ч до вертикальной фиксации и через 6 ч после фиксации. При введении экспериментальным животным экстрактов *S. pallidum* и элеутерококка в период стресса отмечалась коррекция биохимических нарушений, им обусловленных. Применение экстракта *S. pallidum* вызвало увеличение в печени мышей концентраций НАД⁺ на 49 % ($p < 0,001$), пирувата на 31 % ($p < 0,05$) и снижение содержания лактата на 25 % ($p < 0,001$), триацилглицеринов на 12 % ($p < 0,01$) и холестерина на 17 % ($p < 0,001$) по сравнению с таковыми показателями в группе “чистый стресс” без применения протекторных средств. Экстракт *S. pallidum*, вводимый на фоне стресса (доза 100 мг/общих полифенолов/кг, внутривенно, дважды), по своей эффективности не только не уступает действию экстракта элеутерококка, вводимого аналогичным способом в той же дозе, но и превосходит его по способности снижать уровень триацилглицеринов и холестерина.

Ключевые слова: стресс; печень; углеводы; липиды; экстракт *Sargassum pallidum*; экстракт элеутерококка; мыши.

ВВЕДЕНИЕ

В ответ на любое сильное неблагоприятное воздействие внутреннего или внешнего характера нарушается комплексное функциональное равновесие органов и систем целостного организма. В этих условиях организм реагирует включением эволюционно выработанной и генетически закрепленной стресс-системы, направленной на адаптацию организма к изменившимся условиям [10]. Основным признаком активации стресс-системы является повышенный выброс катехоламинов и глюкокортикоидов надпочечниками, которые способствуют мобилизации всех функций органов и тканей. Секретируемые при стрессе стероидные гормоны оказывают влияние на липидный и углеводный обмен [5]. Это обуславливает необходимость поиска природных комплексов с высокой биологической активностью, способных оптимизировать метаболические процессы в организме для предупреждения стресс-индуцированных расстройств (язвы желудочно-кишечного тракта, атеросклероз, гипертоническая

болезнь и др.). Метаболические нарушения в организме могут проявляться как при хроническом, так и при остром стрессе, все зависит от характера стресс-воздействия и интенсивности возбуждения адренергической и гипофиз-адреналовой систем.

В настоящее время особое внимание привлекают массовые виды морских водорослей. Ранее нами было показано, что экстракт морской бурой водоросли *Sargassum pallidum* в условиях экспериментального стресс-воздействия проявлял выраженные антиоксидантные и антирадикальные свойства [12]. Профилактическое введение водорослевого экстракта при стрессе оказывало положительное влияние на состояние внутренних органов и слизистой оболочки желудка, предотвращало активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови и печени животных, что с учетом роли печени в углеводном и липидном обмене может предупреждать нарушение их метаболизма.

S. pallidum является распространенным видом водорослей, произрастающих в прибрежных водах Японского моря Дальнего Востока. Данный вид относится к отряду бурых водорослей семейства саргассовых (Sargassaceae). *S. pallidum* традиционно используется в странах Юго-Восточной Азии как пищевой продукт с высокой биологической ценностью, а также как сырье

¹ ФГБУН “Тихоокеанский океанологический институт имени В. И. Ильичева ДВО РАН”, Россия, 690041, Владивосток, ул. Балтийская, 43.

* e-mail: fomenko29@mail.ru

для получения препаратов альгиновой кислоты (полисахаридный комплекс). Известно, что бурые водоросли содержат значительные количества полифенольных соединений, доминирующей группой которых являются флоротаннины, обладающие широким спектром биологической активности [6]. Содержание общих полифенолов, определенное с помощью реактива Фолина — Чокальтеу [17], составляет до 50 % от сухого остатка экстракта *S. pallidum*. В составе экстракта также содержатся минералы, полисахариды, терпеноиды, гликолипиды, фитостеролы, полиненасыщенные жирные кислоты и др., благодаря чему *S. pallidum* в виде водных и спиртовых экстрактов широко используется в традиционной китайской медицине [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение профилактического влияния водно-спиртового экстракта, выделенного из таллома морской водоросли *S. pallidum*, на нарушения углеводного и липидного обмена печени мышей при экспериментальном стрессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы водоросли *S. pallidum* собирали в августе 2015 г. в бухте Алексеева о. Попова залива Петра Великого Японского моря, промывали морской, затем дистиллированной водой, сушили при $t < 50$ °С. Высушенный таллом измельчали до размера частиц 0,5 – 1 мм и экстрагировали 70 % этиловым спиртом. Экстракцию проводили методом реперколяции, выход экстракта составлял 1 л из 1 кг сухого сырья. После отстаивания экстракт фильтровали, упаривали под вакуумом при температуре не выше 37 °С. При определении химического состава экстракта доминирующей среди биологически активных соединений являлась полифенольная фракция, поэтому стандартизацию экстракта проводили по суммарному содержанию полифенолов и выражали в мг-экв флороглюкинола. Оно составляло 450 мг-экв флороглюкинола/г сухого экстракта.

Эксперимент проводили на белых беспородных мышцах-самцах массой 20 – 30 г, выведенных в питомнике лабораторных животных РАМН “Столбовая” (г. Чехов, Московская обл.). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и

на стандартном корме. Острый стресс моделировали вертикальной фиксацией животных за дорсальную шейную складку на 24 ч. Данное стресс-воздействие является одной из классических моделей острого стресса, которая позволяет получить основные метаболические изменения в организме, характерные для стресса [3]. Препараты вводили в желудок через зонд дважды: за 1 ч до вертикальной фиксации и через 6 ч после фиксации. В качестве препарата сравнения использовали известный стресс-протектор — аптечный экстракт элеутерококка жидкий, который представляет собой спиртовое извлечение из корневищ с корнями элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus*). Технические характеристики экстракта элеутерококка: производитель ОАО “Дальхимфарм”, Хабаровск; номер серии 130713, годен до 08.18. Спецификация: сухой остаток — 6,3 %; сумма элеутерозидов — 0,15 %; элеутерозид В — 0,025 %.

Экстракты *S. pallidum* и элеутерококка освобождали от спирта упариванием в вакуумном испарителе, довели дистиллированной водой до требуемого объема и вводили мышам внутривенно через зонд в виде водной взвеси. Разведение проводили таким образом, чтобы доза, принятая в данном исследовании — 100 мг общих полифенолов/кг массы [1], составила по объему 5 мл/кг, что соответствовало 0,1 – 0,15 мл разведенного препарата на 1 особь. Животные из группы “стресс” получали дистиллированную воду в объеме, равном объему вводимых препаратов. Кровь для исследований собирали из шейной вены животных в вакуэты с 1 % раствором гепарина. Печень после извлечения промывали в физиологическом растворе, замораживали в рефрижераторе при $t = -80$ °С для дальнейшего определения биохимических показателей. В ходе исследования были выделены 4 группы животных по 10 мышей в каждой: 1-я группа — контроль (интактные); 2-я группа — стресс; 3-я группа — стресс + экстракт *S. pallidum*; 4-я группа — стресс + экстракт элеутерококка. Животных выводили из эксперимента через 24 ч декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением “Правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для

Таблица 1. Влияние экстрактов из морской бурой водоросли *S. pallidum* и элеутерококка на показатели углеводного обмена в печени и крови мышей при остром стрессе ($M \pm m$)

Показатель	Группа			
	1. Контроль (интактные)	2. Стресс	3. Стресс + <i>S. pallidum</i>	4. Стресс + элеутерококк
Глюкоза, ммоль/л	5,92 ± 0,14	3,31 ± 0,17 ³	4,94 ± 0,29 ^{2, Б}	4,56 ± 0,16 ^{3, Б}
НАД ⁺ , мкмоль/г	0,371 ± 0,011	0,251 ± 0,017 ³	0,375 ± 0,014 ^Б	0,336 ± 0,020 ^Б
Лактат, мкмоль/г	2,26 ± 0,15	3,30 ± 0,14 ³	2,47 ± 0,11 ^Б	2,31 ± 0,10 ^Б
Пируват, мкмоль/г	0,154 ± 0,017	0,137 ± 0,010	0,179 ± 0,013 ^А	0,166 ± 0,014
НАД ⁺ /НАДН (пируват/лактат)	614 ± 16	374 ± 7 ³	653 ± 11 ^Б	647 ± 16 ^Б

Здесь и в табл. 2: изменения статистически достоверны при ¹ $p < 0,05$, ² $p < 0,01$, ³ $p < 0,001$ — по сравнению с контролем; ^А $p < 0,05$, ^Б $p < 0,01$, ^В $p < 0,001$ — со 2-й группой; ^Г $p < 0,05$, ^Д $p < 0,01$, ^Е $p < 0,001$ — с 3-й группой.

экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 1986). Исследование одобрено комиссией по вопросам этики Тихоокеанского океанологического института имени В. И. Ильичева ДВО РАН (протокол № 10 от 15.03.2016 г.).

О состоянии углеводного обмена судили по содержанию следующих метаболитов в гомогенате печени: пирувата, лактата, уровню окисленной формы кофермента НАД⁺ [15], а также содержанию глюкозы в крови (стандартный биохимический набор “Биотест”, Чехия) с помощью спектрофотометра UNICO модель 2800 “United Products & Instruments, Inc”, США. Коэффициент НАД⁺/НАДН рассчитывали по соотношению метаболитов в реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой (ЛДГ) (пируват/лактат) [4]. Экстракты общих липидов из ткани печени готовили по методу J. Folch, et al. [11]. Хроматографическое распределение нейтральных липидов проводили методом одномерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле [9]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ InStat 3.0 (GraphPad Software Inc. USA, 2005), включающего функцию 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие острого стресса (вертикальная фиксация) сопровождалось выраженными изменениями в состоянии углеводного и липидного обмена у мышей (табл. 1, 2). Так, достоверно снижалось содержание глюкозы крови на 44 % и количество окисленной формы кофермента НАД⁺ в ткани печени – на 32 %. При этом отношение НАД⁺/НАДН, рассчитанное по ЛДГ-реакции, снизилось более чем в 1,5 раза, что указывает на сдвиг окислительно-восстановительного баланса в сторону увеличения восстановленных эквивалентов и развитие тканевой гипоксии [7]. Данный феномен сопровождается снижением активности

НАД⁺-зависимых дегидрогеназ в цикле Кребса и синтеза АТФ [16].

В условиях гипоксии, сопровождающей стресс, гликолиз завершается преимущественно образованием молочной кислоты. Подтверждением этому является увеличение в печени содержания лактата на 46 % и снижение количества пирувата на 11 %, по сравнению с контролем. Таким образом, на данном этапе стресс-воздействия развивается гипогликемия, наблюдается активация анаэробного гликолиза и накопление недоокисленных продуктов метаболизма в печени. В условиях напряжения адаптационных процессов анаэробный метаболизм углеводов играет ведущую роль в поддержании гомеостаза. Кроме того, необходима постоянная концентрация глюкозы в мозге, и ее снижение в крови свидетельствует о перераспределении мобильных энергетических ресурсов в пользу активно функционирующих органов [2].

Состояние липидного обмена печени крыс под действием стресса (табл. 2) характеризовалось достоверным увеличением содержания триацилглицеридов (ТАГ) на 10 % и холестерина (ХС) на 8 % при одновременном снижении количества эфиров холестерина (ЭХС) на 12 %, по сравнению с контролем.

Под влиянием стресса активируется периферический липолиз в жировой ткани, что сопровождается усилением потока жирных кислот и глицерина в печень с их последующим ресинтезом в ТАГ. Указанный эффект обусловлен стимулирующим влиянием катехоламинов на адипоциты, что сопровождается мобилизацией ТАГ и эстерификацией свободных жирных кислот (СЖК) [5]. Повышенное содержание ХС связано с активацией его биосинтеза из ацетил-КоА, образующегося при окислении жирных кислот на фоне угнетения их митохондриального окисления [8], а также в результате ингибирования перекисями липидов ключевого фермента катаболизма ХС 7- α -гидроксилазы [13]. Уменьшение содержания ЭХС свидетельствует о нарушении этерифицирующей функции печени. Полученные данные определяют липиды как главные источники энергии, которые компенсируют отмеченное выше снижение интенсивности углеводного обмена. По мнению ряда авторов [5], подобные изменения являются отражением перестройки метаболизма с углеводного на липидный путь.

Таблица 2. Влияние экстрактов из морской бурой водоросли *S. pallidum* и элеутерококка на содержание фракций нейтральных липидов в печени мышей при стрессе (в % от суммы всех фракций; $M \pm m$)

Показатель	1 группа, контроль (интактные)	2 группа, стресс	3 группа, стресс + <i>S. pallidum</i>	4 группа, стресс + элеутерококк
ТАГ	21,91 \pm 0,25	24,19 \pm 0,84 ²	21,25 \pm 0,16 ^б	22,08 \pm 0,21 ^{а, д}
Свободные жирные кислоты	16,24 \pm 0,24	14,88 \pm 0,45	15,79 \pm 0,13 ^б	15,85 \pm 0,21 ^б
Эфиры жирных кислот	15,49 \pm 0,20	15,28 \pm 0,56	15,21 \pm 0,29	15,22 \pm 0,31
ХС	14,95 \pm 0,21	16,21 \pm 0,44 ¹	13,50 \pm 0,42 ^{1, в}	14,73 \pm 0,15 ^{б, г}
ЭХС	16,97 \pm 0,11	14,90 \pm 0,23 ²	16,76 \pm 0,21 ^в	18,78 \pm 0,32 ^{3, в, е}
Остаточная фракция	14,44 \pm 0,15	14,54 \pm 0,35	17,49 \pm 0,15	13,34 \pm 0,46

В группах животных, получавших профилактические экстракты *S. pallidum* (3-я группа) и элеутерококка (4-я группа) в период стресс-воздействия, прослеживается тенденция к нормализации биохимических показателей. Отмечалось повышение количества глюкозы крови по сравнению с таковым уровнем во 2-й группе, однако при сравнении с контролем ее значение было достоверно ниже. Увеличение количества пирувата и НАД⁺ в печени мышей, по сравнению с таковыми показателями в группе животных, не получавших протекторных средств, способствовало росту коэффициента НАД⁺/НАДН (до 653 и 647 соответственно против 374 во 2-й группе), что предполагает нормализацию реакций аэробного гликолиза и снятию тканевой гипоксии. При анализе показателей липидного обмена в печени мышей 3-й и 4-й групп (табл. 2) обращает на себя внимание сохранение значений ТАГ и СЖК на уровне контроля. В то же время количество ХС было достоверно ниже в обеих группах, а содержание ЭХС — достоверно выше, чем таковые показатели во 2-й группе мышей при стресс-воздействии без применения экстрактов. При сравнении профилактического действия 2 препаратов на показатели углеводного и липидного обмена необходимо отметить, что протекторный эффект экстракта *S. pallidum* не уступал таковому для элеутерококка, однако по способности снижать уровень ТАГ и ХС превосходил таковой.

Таким образом, введение природных комплексов сопровождалось восстановлением окислительно-восстановительного баланса (по соотношению НАД⁺/НАДН), определяющего функционирование углеводно-липидного и энергетического обмена. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракт *S. pallidum*, обогащенный комплексом флоротаннинов, проявляет выраженный защитный эффект в условиях экспериментального острого стресс-воздействия.

Биохимический механизм действия экстракта *S. pallidum* обусловлен тем, что содержащийся в нем комплекс олигомерных флоротаннинов характеризуется наличием разветвленной структуры сопряженных двойных связей высокой подвижности и большого количества свободных гидроксильных групп [6]. Данная структура может выступать в качестве универсальной донорно-акцепторной системы, способной как поглощать, так и отдавать электроны, нормализуя, таким образом, биохимические процессы, проходящие с участием переноса заряженных частиц. Благодаря этой особенности основным фактором биологической активности флоротаннинов является их прямое участие в восстановительных процессах, что способствует более быстрой нормализации каскадов метаболических реакций углеводного и липидного обмена в печени экспериментальных животных.

Тот факт, что действие экстракта *S. pallidum* имеет определенное сходство с действием известного стресс-протекторного средства — экстрактом элеуте-

рококка, свидетельствует о возможности водорослевого экстракта сохранять метаболизм организма в условиях стрессового воздействия. Исследуемый экстракт *S. pallidum* не только не уступает по своей эффективности эталонному стресс-протектору “экстракт элеутерококка”, но и превосходит его по способности снижать уровень ТАГ и ХС. Экстракт *S. pallidum* является перспективным источником для создания препаратов, способных оптимизировать метаболические процессы в организме для предупреждения стресс-индуцированных расстройств.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт бурой водоросли *S. pallidum*, обогащенный комплексом флоротаннинов, при внутривидовом введении мышам в общей дозе 100 мг общих полифенолов/кг проявлял выраженный защитный эффект в условиях экспериментального стресс-воздействия и способствовал более быстрой нормализации метаболических реакций углеводного и липидного обмена в печени экспериментальных животных.

2. Экстракт *S. pallidum* по своей эффективности не уступал действию экстракта элеутерококка в отношении показателей углеводного и липидного обмена в условиях стресса, а также превосходил его по способности снижать уровень ТАГ на 5 % ($p < 0,01$) и ХС на 9 % ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Венгеровский, И. В. Маркова, А. С. Саратиков, *Ведом. фарм. комитета*, № 2, 9 – 12 (1999).
2. Т. А. Девяткина, Е. М. Важничая, Р. В. Луценко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **67**(4), 47 – 49 (2004).
3. Ю. И. Добряков, И. И. Брехман, *Валеология: Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья*, Владивосток, Дальнаука, (1996), сс. 3, 83 – 89.
4. Л. П. Ермолаева, *Регуляция гликонеогенеза в онтогенезе*, Москва (1987).
5. А. В. Солин, В. И. Корозин, Ю. Д. Ляшев, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **155**(3), 299 – 301 (2013).
6. В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, С. Е. Фоменко и др., *Извест. Самар. науч. центра РАН*, **14**(1), 2299 – 2302 (2012).
7. В. Н. Сыров, Ж. И. Исламова, Ф. Р. Эгамова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.* **77**(7), 35 – 38 (2014).
8. С. Е. Фоменко, Н. Ф. Кушнерова, В. Г. Спрыгин и др., *Тихоокеан. мед. ж.*, № 2, 67 – 70 (2013).
9. J. S. Amenta, *J. Lipid. Res.*, **5**(2), 270 – 272 (1964).
10. G. P. Chrousos, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **5**(7), 374 – 381 (2009).
11. J. Folch, M. Less, G. H. Sloane-Stanley, *Biol. Chem.*, **226**, 497 – 509 (1957).
12. S. E. Fomenko, N. F. Kushnerova, V. G. Sprygin, *J. Stress Physiol. Biochem.*, **12**(4), 15 – 22 (2016).
13. A. I. Hulbert, N. Turner, L. H. Storlien, P. L. Else, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **80**(1), 155 – 169 (2005).
14. L. Liu, M. Heinrich, S. Myers, S. A. Dworjanyn, *J. Ethnopharmacology*, **142**(3), 591 – 619 (2012).
15. *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer (ed.-in-chief), J. Bergmeyer and M. Graßl (ed.), Weinheim; Florida; Basel: Verlag Chemie, 7 (1984).
16. S. Pengxiang, Z. Yingsheng, J. Christopher, J. Lynch, *Appl. Physiol.*, **108**, 941 – 949 (2010).

17. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos, *Methods of Enzymology*, Academic Press, San Diego (1999).

Поступила 10.06.19

APPLICATION OF EXTRACTS FROM BROWN ALGAE *SARGASSUM PALLIDUM* AND ELEUTHEROCOCCUS FOR PREVENTING STRESS-INDUCED DISORDERS OF CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM IN EXPERIMENT

S. E. Fomenko*, N. F. Kushnerova, and V. G. Sprygin

V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Baltiiskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia

* e-mail: fomenko29@mail.ru

We have studied the influence of extracts from brown algae *Sargassum pallidum* and Eleutherococcus on the liver carbohydrate and lipids metabolism indices in mice under conditions of stress impact. Experimental stress was induced by suspending animals for 24 h in the vertical position by their neck dorsal skin fold. The *S. pallidum* and Eleutherococcus extracts were administered 1 h before vertical fixation and 6 h after it. The introduction of extracts to experimental animals under stress led to noticeable correction of the stress-induced violations of liver metabolism indices. The injection of *S. pallidum* extract resulted in increasing concentrations of NAD⁺ (by 49%, $p < 0.001$), pyruvate (by 31%, ($p < 0.05$)) and decreasing content of lactate (by 25%, $p < 0.001$), triacylglycerol (by 12%, $p < 0.01$), and cholesterol (by 17%, $p < 0.001$) as compared to values in the "pure stress" group of animals not treated with protective remedies. The *S. pallidum* extract administered on the background of stress (100 mg/total polyphenols/kg, intragastrically, twice) was not only as effective as the extract of Eleutherococcus injected in the same way and dose, but also exceeded it in the ability to reduce the level of triacylglycerol and cholesterol.

Keywords: stress; liver; carbohydrates; lipids; *Sargassum pallidum* extract; Eleutherococcus extract; mice.