

УДК 61.615.322+661.123+616-092.9

DOI: 10.15372/KhUR2022428

EDN: PJCWUK

Влияние композиции экстрактов *Rhaponticum carthamoides* и шрота *Vaccinium oxycoccos* на работоспособность в тесте “принудительное плавание” у мышей

Д. А. ХАЛИКОВА, С. В. АНЬКОВ, Ю. В. МЕШКОВА, Т. Г. ТОЛСТИКОВА

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск (Россия)

E-mail: dasha.halikova@mail.ru

Аннотация

Исследовано влияние композиции экстрактов левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) и шрота клюквы (*Vaccinium oxycoccos*) в дозе (70 + 500) мг/кг, а также индивидуальных действующих веществ (экдистен и урсоловая кислота) в эквивалентных дозах на биохимические показатели физической выносливости (лактат, глюкоза) в тесте “принудительное плавание” на мышцах самцах CD-1. Установлено, что разработанная композиция проявляет аналогичные индивидуальным действующим веществам фармакологические эффекты, способствуя снижению концентраций глюкозы (в крови) и лактата (в крови и мышцах).

Ключевые слова: экстракт, левзея, шрот клюквы, экдистен, урсоловая кислота, принудительное плавание

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время препараты на растительной основе в рамках государственного реестра составляют более 40 % всех действующих лекарственных средств [1]. Также на фармацевтическом рынке наблюдается увеличение спроса и расширение ассортимента препаратов, пищевых добавок, биологически активных веществ на основе растительного сырья [2, 3].

Развитие медицинской химии и связанной с ней фармакологии в качестве академического научного направления началось после подписания в 1996 г. председателем Сибирского отделения РАН академиком В. А. Коптюгом приказа об организации в Новосибирском институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (НАОХ СО РАН) отдела химии природных и биологически активных соединений (в настоящее время – отдел медицинской химии). Отдел принял решение при разработке новых лекарственных препаратов использовать преимуще-

ственно исходные вещества, легко выделяемые из широко представленных во флоре лесных древесных и ландшафтных растений Сибири, Алтая, а также применять возобновляемые растительные ресурсы с целью получения максимального выхода полезных продуктов, что и является одним из важных наследий Валентина Афанасьевича.

Один из подходов ученых Сибирского отделения РАН, занимающихся разработкой лекарственных средств, заключается в рациональном использовании природных источников биологически активных веществ, содержащихся в побочных продуктах пищевой промышленности, в частности в выделении фармакологически активных веществ и потенциально ценных природных соединений из экстрактов, жмыха и шрота семян и ягод.

В этом плане научный интерес и практическую значимость представляет шрот клюквы (*Vaccinium oxycoccos*), которая произрастает в пределах России в северной половине европей-

ской части, в Сибири и на Дальнем Востоке [4]. Согласно имеющимся литературным данным, клюква содержит в своем составе большое количество органических кислот (урсоловая, яблочная, бензойная, хлорогеновая, олеаноловая, щавелевая, янтарная), полифенолы (катехины, биофлавоноиды, антоцианы и др.), витамин С (до 80 мг на 100 г свежей клюквы), витамины РР, группы В, А, К, минералы (кальций, железо, магний, фосфор, калий, цинк, йод и др.), пектины, дубильные вещества, каротин [5].

На сегодняшний день на базе лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН ведется изучение свойств урсоловой кислоты – пентациклического тритерпенового соединения, которая стимулирует рост мышц на фоне физической нагрузки и уменьшает количество белой жировой ткани, а также влияет на метаболические процессы и обладает антиоксидантной, антигиперлипидемической активностью [6–8]. Данный факт позволяет рассматривать шрот клюквы как перспективное сырье для применения в спортивной медицине в виде пищевых и биологически активных добавок (БАД). Стоит отметить, что существующие на данный момент БАД на основе клюквы предназначены для терапии и профилактики заболеваний мочевыводящих путей. Однако урсоловую кислоту широко используют в качестве БАД (в синтезированном виде) для сжигания жира, роста “сухой” мышечной массы, поддержания здоровья сердечно-сосудистой системы.

Другой источник фармакологически активных веществ – левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*), широко используемая среди спортсменов в качестве природного анаболика [9]. Основными действующими веществами являются фитоэкдистероиды (в частности, экдистен), которые повышают физическую работоспособность, выносливость и ускоряют процессы восстановления организма после физических нагрузок [10–13].

На основе двух растительных источников была разработана композиция, состоящая из экстрактов левзеи сафлоровидной и шрота клюквы, для которой ранее авторами был обнаружен анаболический эффект, а также исследовано влияние на уровень тестостерона [14, 15]. В настоящее время в регистре лекарственных средств России существуют БАДы и пищевые добавки на основе левзеи или шрота клюквы, но композиции из двух растительных компонентов (экстрактов левзеи и шрота клюквы) на фармацев-

тическом рынке отсутствуют, что делает разработку и исследование актуальным [16].

Важно отметить, что полученные растительные экстракты кроме действующих веществ содержат и другие, разнообразные по химическому составу биологически активные компоненты, которые могут оказывать влияние на свойства и активность композиции в целом. Для исключения влияния сопутствующих компонентов в экстрактах на основные фармакологические эффекты провели сравнительные исследования индивидуальных действующих веществ и экстрактов в эквивалентных дозах.

Цель исследования – сравнить биохимические показатели физической выносливости (лактат, глюкоза) в тесте “принудительное плавание” на фоне введения индивидуальных действующих веществ (экдистен и урсоловая кислота), а также композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Эксперименты проведены на 44 мышах линии CD-1, самцах с исходной массой 20–25 г, полученных из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и стандартному гранулированному корму, с контролем влажности и температуры, с 12-часовым циклом света и темноты. Все манипуляции с животными проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, Приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.2016 г. и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

Исследуемые вещества: урсоловая кислота (рис. 1, а) [17]; экдистен (см. рис. 1, б) [18]; экстракт шрота клюквы, содержащий 40 мас. % урсоловой кислоты (опытное химическое производство НИОХ СО РАН, Новосибирск); экстракт левзеи сафлоровидной, содержащий 0.31 мас. % экдистена (ООО “Экстракты Алтай”, Барнаул).

Согласно процентному содержанию экдистена и урсоловой кислоты в экстрактах левзеи и шрота клюквы соответственно, были высчитаны необходимые дозировки индивидуальных действующих веществ. Таким образом, в 70 мг/кг экстракта левзеи сафлоровидной содержится 210 мкг/кг экдистена, что соответствует 0.31 мас. %;

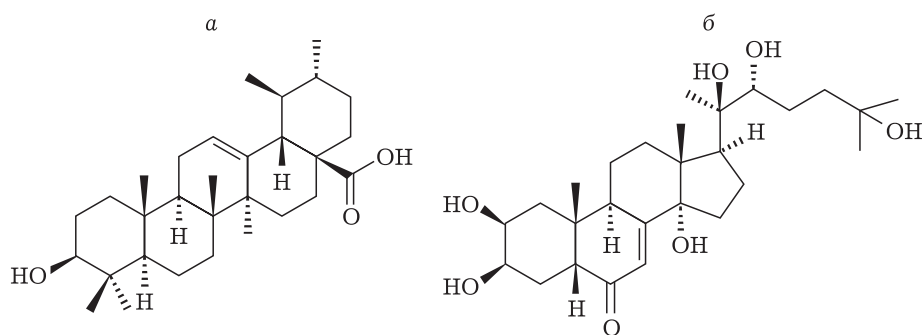


Рис. 1. Структурные формулы урсоловой кислоты (а), эхидистена (б).

в 500 мг/кг экстракта шрота клюквы – 200 мг/кг урсоловой кислоты, что соответствует 40 мас. %.

По составу вводимых веществ животные были разделены на следующие экспериментальные группы:

- 1 группа – водно-твиновый раствор;
- 2 группа – эхидистен в дозе 210 мкг/кг;
- 3 группа – урсоловая кислота в дозе 200 мг/кг;
- 4 группа – экстракт левзеи в дозе 70 мг/кг (210 мкг/кг эхидистена) + экстракт шрота клюквы в дозе 500 мг/кг (200 мг/кг урсоловой кислоты).

Исследуемые соединения суспензировали в дистиллированной воде (предварительно перемешивали механически и растирали в ступке с несколькими каплями Твин 80 (Tween 80)) и вводили ежедневно, однократно, внутривентально по 0.2 мл на 10 г массы мыши в течение 28 сут. Животные контрольной группы получали эквивалентные объемы растворителя (водно-твиновый раствор).

Методы исследования

По окончании срока эксперимента измеряли концентрацию глюкозы и лактата на фоне физической нагрузки в тесте “принудительное плавание”, который является распространенным методом исследования физической выносливости и работоспособности на этапе доклинических испытаний. Всем группам вводили соответствующие исследуемые соединения, через 1 ч животных помещали в индивидуальные стеклянные цилиндры (высота 30 см, диаметр 8 см), наполненные водой (24–26 °С) с добавлением поверхностно-активных веществ. Предварительно не проводили тренировочные заплывы. Поскольку целью данного теста была оценка изменения концентрации глюкозы и лактата после физической нагрузки, то моментом окончания эксперимента считали истечение установленного временного промежутка (10 мин), а не полное

погружение животного под “водное зеркало” на 5 с. После этого животных сразу извлекали из воды и обсушивали [19–21]. Время нагрузки было выбрано на основании полученных ранее собственных экспериментальных данных.

Для оценки биохимических показателей у животных забирали кровь путем цервикальной дислокации, центрифугировали (3000 об/мин, 15 мин), отделяли сыворотку, в которой определяли концентрацию глюкозы и лактата как маркеров повышения выносливости. Использовали стандартные диагностические наборы (“Вектор-Бест”, п. Кольцово, Новосибирская обл.) и биохимический анализатор Stat Fax 3300 (Awareness Technology, Inc., США).

Определение концентрации глюкозы и лактата в мышцах проводили следующим образом: участок мышцы бедра животного (точная навеска) помещали в 500 мкл физиологического раствора. Мышцу гомогенизировали до однородности и отсутствия видимых включений мышечной ткани. Полученный гомогенат центрифугировали (14 800 об/мин, 3 мин), отделяли 6 мкл надосадочной жидкости, в которой определяли концентрацию глюкозы и лактата. Полученные значения корректировали согласно данным точной навески, в которой участок образца мышцы с наибольшей или наименьшей массой принимали за 100 %, а остальные значения ранжировали согласно пропорции. Использовали стандартные диагностические наборы (“Вектор-Бест”, п. Кольцово, Новосибирская обл.), ультразвуковой гомогенизатор (QSONICA Q55 Sonicator, США), фотометр Photometer-5010 (ROBERT RIELE GmbH & Co KG, Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, США) с применением *t*-критерия для оценки достоверности различий. Данные представлены в формате: среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SE).

Сравнения между группами проводили при помощи непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни, статистически значимыми считали значения $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим результаты биохимических исследований глюкозы в крови и мышцах мышей линии CD-1 после физической нагрузки. Потребление кислорода всем телом в течение физической активности может увеличиваться в 20 раз, а в работающей мышце – даже больше. Необходимую в этих условиях энергию скелетная мышца расходует со значительно большей скоростью, чем в состоянии покоя, при этом интенсивно используется собственная глюкоза [22].

После проведения теста “принудительное плавание” концентрация глюкозы в крови достоверно увеличилась во всех исследуемых группах по сравнению с исходными значениями, взятыми натощак (0 точка): в контрольной группе 1 (водно-твиновый раствор) – в 2.5 раза; в группе 2 (экдистен 210 мкг/кг) – в 1.4 раза; в группе 3 (урсоловая кислота 200 мг/кг) – в 1.5 раза; в группе 4, получающей композицию экстрактов левзеи и шрота клюквы (70 + 500) мг/кг, – в 1.5 раза (рис. 2).

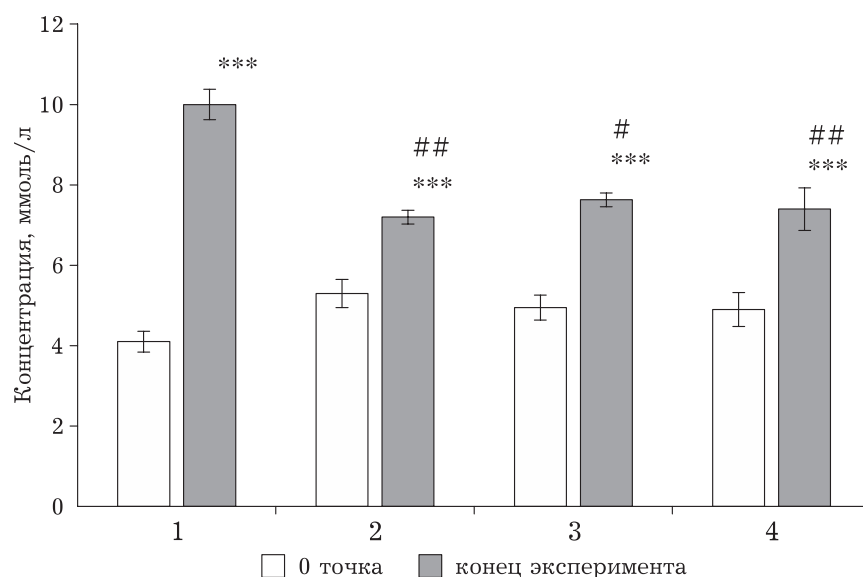


Рис. 2. Концентрация глюкозы в крови мышей самцов CD-1 натощак (0 точка) и после физической нагрузки (конец эксперимента) в разных группах. *** – Уровень значимости по сравнению с группой 1 (0 точка) при $p < 0.0005$; #, ## – уровни значимости по сравнению с группой 1 (конец эксперимента) при $p < 0.05$ и $p < 0.005$ соответственно. Здесь и на рис. 3–5 группы экспериментальных животных, получающие: 1 – водно-твиновый раствор; 2 – экдистен 210 мкг/кг; 3 – урсоловую кислоту 200 мг/кг; 4 – композицию из экстрактов левзеи и шрота клюквы (70 + 500) мг/кг.

Концентрация глюкозы в мышцах после теста была достоверно ниже по сравнению с контрольной группой только для групп 2 и 3 (рис. 3).

Динамика уровня лактата в крови также указывает на интенсивность тренировочной нагрузки и степень восстановления после нее [23]. При превышении определенного уровня интенсивности организм переходит на полностью анаэробное энергообеспечение, вследствие чего увеличивается продукция лактата и повышается его содержание в крови и мышцах, что становится причиной нарастающей мышечной усталости.

После выполнения физической нагрузки у мышей уровень лактата в крови и мышцах в группе 4 (композиция экстрактов левзеи и шрота клюквы) был в обоих случаях ниже значений контрольной группы 1 (рис. 4 и 5). Это может быть показателем повышения физической выносливости и ускоренного восстановления организма на фоне применения композиции.

Напротив, для группы 2 концентрация лактата в мышцах выше, чем у контрольной группы 1 (см. рис. 5). Это может указывать на более значительное накопление лактата в организме как продукта гликолиза в результате большого физического напряжения.

Таким образом, по полученным результатам теста “принудительное плавание” установлено:

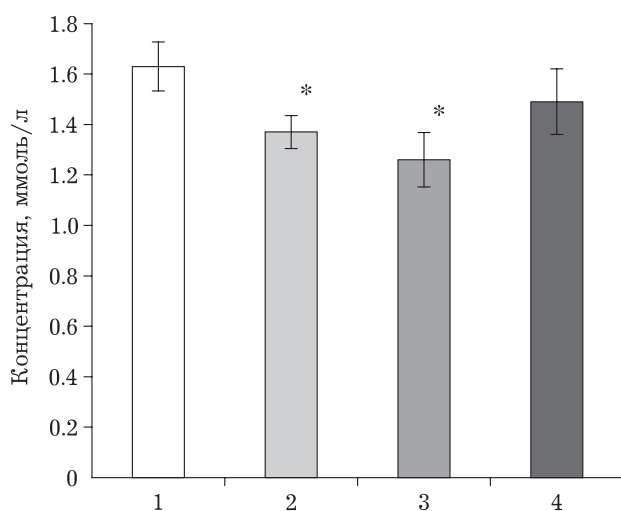


Рис. 3. Концентрация глюкозы в мышцах мышей линии CD-1 после выполнения теста “принудительное плавание” в разных группах. * – Уровень значимости по сравнению с группой 1 при $p < 0.05$. Обозн. см. рис. 2.

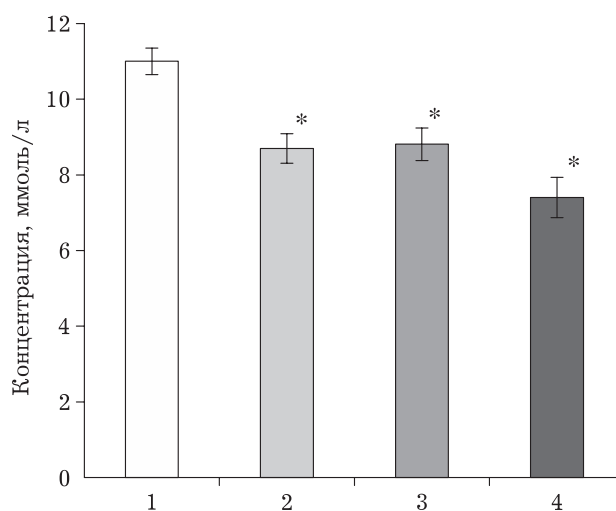


Рис. 4. Концентрация лактата в крови мышей линии CD-1 после выполнения теста “принудительное плавание” в разных группах. * – Уровень значимости по сравнению с группой 1 при $p < 0.05$. Обозн. см. рис. 2.

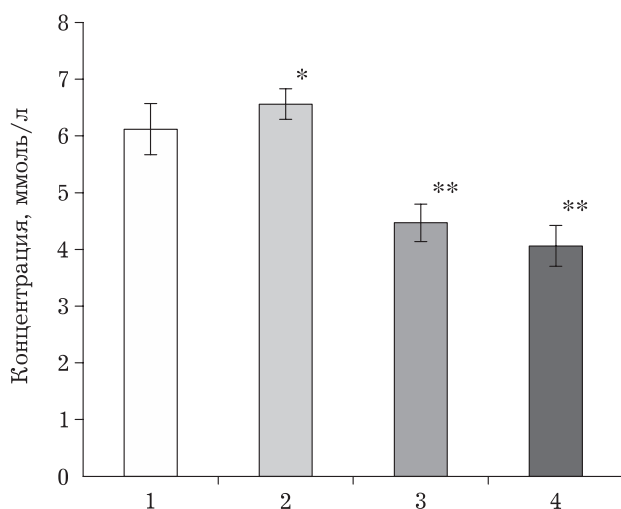


Рис. 5. Концентрация лактата в мышцах мышей линии CD-1 после выполнения теста “принудительное плавание” в разных группах. *, ** – Уровни значимости по сравнению с группой 1 при $p < 0.05$ и $p < 0.005$ соответственно. Обозн. см. рис. 2.

1. Концентрация глюкозы в мышцах на фоне применения композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы сохранялась на уровне контрольной группы, а в крови наблюдалось ее достоверное снижение.

2. Концентрация лактата в крови и мышцах на фоне приема композиции экстрактов левзеи и шрота снизилась, что, вероятно, свидетельствует о повышении физической работоспособности.

3. Концентрация глюкозы в мышцах на фоне введения индивидуальных действующих веществ достоверно снизилась по сравнению с контролем.

4. Концентрация лактата в мышцах на фоне введения экдистена достоверно повысилась по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований установлено, что разработанная композиция экстрактов левзеи и шрота клюквы проявляет аналогичные с индивидуальными действующими веществами (экдистен и урсоловая кислота) фармакологические эффекты, снижая концентрацию глюкозы в крови и концентрацию лактата в крови и мышцах. Составленная композиция перспективна для применения в спортивной медицине в качестве пищевой и биологически активной добавки.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания НИОХ СО РАН № 1021051402785-4-1.4.1.

Авторы выражают благодарность А. Е. Гражданникову за качественный и количественный анализ образцов экстрактов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Володина Т. А. Обоснование оптимального состава композиций из растительных экстрактов с использованием биологического теста на парамециях // Омский научный вестник. 2012. Т. 114, № 2. С. 30–32.
- Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2014. 635 с.
- Астафьева О. В. Исследование возможности применения биологически активных компонентов растительных экс-

- трактов в производстве препаратов для нужд косметологии и фармакологии // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 1–5.
- 4 Ефремов А. П. Лекарственные растения и грибы средней полосы России. М.: Фитон XXI, 2021. 504 с.
 - 5 Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. Т. 3. 519 с.
 - 6 Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid // *Ethnopharmacol.* 1995. Vol. 49, No. 2. P. 57–68.
 - 7 Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives // *Ethnopharmacol.* 2005. Vol. 100, No. 2. P. 92–94.
 - 8 Woźniak Ł., Skapska S., Marszałek K. Ursolic acid – A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities // *Molecules.* 2015. Vol. 20, No. 11. P. 20614–20641.
 - 9 Биологически активные соединения в тренировочном процессе: Методические рекомендации / под ред. В. М. Ерикова, А. К. Пуныкина. Рязань: РГУ, 2008. 32 с.
 - 10 Ивановский А. А., Тимкина Е. Ю., Перминова З. К., Тимофеев Н. П. Экдистероиды и их роль в живой природе (обзор) // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока.* 2009. № 4. С. 57–61.
 - 11 Сейфулла Р., Потупчик Т., Полубояринов П., Петрова Е., Поликарпочкин А., Елистратов Д., Струков В. Возможности применения комбинированного адаптогена Леветон П // *Врач.* 2018. № 10. С. 37–44.
 - 12 Kokoska L., Janovska D. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: A review // *Phytochemistry.* 2009. Vol. 70, No. 7. P. 842–855.
 - 13 Syrov V. N. Comparative experimental investigation of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranebols // *Pharm. Chem. J.* 2000. Vol. 34. P. 193–197.
 - 14 Халикова Д. А., Аньков С. В., Мешкова Ю. В., Толстикова Т. Г. Анаболическая активность растительной композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы // *Сибирский науч. мед. журн.* 2021. Т. 41, № 6. С. 45–50.
 - 15 Халикова Д. А., Аньков С. В., Мешкова Ю. В., Толстикова Т. Г. Влияние композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы на уровень тестостерона у мышей // *Мед. акад. журн.* 2021. Т. 21, № 4. С. 67–72.
 - 16 Биологически активные добавки к пище (БАДы) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/pharm-groups/biologiceski-aktivnye-dobavki-k-pishhebody-2> (дата обращения: 01.06.2022).
 - 17 Морозкина С. Н., Антимопова О. И., Ещенко Н. Д., Вилкова В. А., Шавва А. Г. Некоторые биологические свойства урсоловой и бетулиновой кислот // *Вестн. Санкт-Петербургского ун-та. Физика и химия.* 2009. № 4. С. 110–114.
 - 18 Głazowska J., Kamiński M. M., Kamiński M. Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*) // *J. Sep. Sci.* 2018. Vol. 41, No. 23. P. 4304–4314.
 - 19 Ковалева М. А., Макарова М. Н., Макаров В. Г., Горячева М. А. Применение теста “принудительное плавание” при проведении доклинических исследований // *Международ. вестн. ветеринарии.* 2015. № 4. С. 90–95.
 - 20 Каркищенко В. Н., Фокин Ю. В., Казакова Л. Х., Алимкина О. В., Касинская Н. В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // *Биомедицина.* 2012. № 4. С. 15–21.
 - 21 Гаврев А. И., Марышева В. В., Шабанов П. Д. Актопротекторное действие антигипоксантов тиазолоиндольного ряда // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2010. Т. 73, № 2. С. 25–30.
 - 22 Белая Ж. Е., Смирнова О. М., Дедов И. И. Роль физических нагрузок в норме и при сахарном диабете // *Проблемы эндокринологии.* 2005. Т. 51, № 2. С. 28–37.
 - 23 Анаев Э. Х. Лактат и легкие: от теории к практике // *Пульмонология.* 2014. № 6. С. 108–114.