

УДК 615.241.3 + 615.275.4 + 615.322 + 612.084

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ФИТОЭКДИСТЕРОИД СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЗЕРЕН КИНОА**В.А. Шипелин, Н.А. Петров, С.Н. Зорин, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова**

ФИЦ питания и биотехнологии, Москва, Россия

Введение. Профессиональная деятельность человека, связанная с повышенными психоэмоциональными и физическими нагрузками, вредными условиями труда или неблагоприятными климатическими условиями требует особых персонализированных программ питания, включающих, в том числе, использование специализированных пищевых продуктов (СПП), содержащих в своём составе функциональные пищевые ингредиенты (ФПИ) с доказанным адаптогенным действием. Использование в питании различных минорных растительных биологически активных веществ (БАВ) – адаптогенов способствует повышению устойчивости организма человека к неблагоприятным воздействиям и стрессу [1]. Одним из перспективных источников БАВ адаптогенного действия, содержащих широкий спектр фитоэкдистероидов и полифенольных веществ, являются зерна киноа [2, 3]. Использование современных технологических подходов, включающих целенаправленное выделение и концентрирование комплексов с различным заданным соотношением фитоэкдистероидов и полифенольных соединений, применение технологий ультрафильтрации низкомолекулярных фракций позволяет достигать высоких концентраций БАВ в составе ФПИ. Ввиду практически полного отсутствия в Российской Федерации отечественных ФПИ адаптогенного действия не вызывает сомнения социальная значимость и целесообразность их разработки, оценки безопасности и эффективности путем проведения доклинических исследований *in vivo* и, в перспективе, клинической апробации. Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности нутритивной поддержки фитоэкдистероидами и другими минорными БАВ, входящими в состав разработанного ФПИ из зерен киноа, в условиях истощающей физической нагрузки на беговой дорожке на основании комплексной оценки маркеров неспецифической резистентности организма крыс.

Материалы и методы. В качестве источника адаптогенов в эксперименте использовали комплекс фитоэкдистероидов и полифенолов из зерен киноа (*Chenopodium quinoa*) с общим содержанием фитоэкдистероидов (20E) $50,4 \pm 0,6$ мг/г и полифенолов $21,2 \pm 2,0$ вес. %.

Эксперимент проведен с использованием 36 крыс-самцов линии Вистар с исходной массой тела 80 ± 5 г, полученных из питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Исследования на животных выполняли в соответствии с требованиями Национального стандарта РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Перед экспериментом крыс разделяли по их массе тела, поведенческому фенотипу и двигательной активности в тестах «Беговая дорожка» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) на три группы (Г1, Г2 и Г3) равной численности ($n=12$). До начала эксперимента проводили отбор обучаемых животных. Крысы необучаемые бегу не были взяты в исследование. Животные контрольной группы Г1 и группы Г2 в течение 36 суток эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион, соответствующий [4]. Крысы третьей опытной группы Г3 получали модифицированный полусинтетический рацион с добавлением ФПИ ($0,057 \pm 0,001$ %). На протяжении эксперимента крысы получали воду и рационы в режиме неограниченного доступа. Тестирование в ПКЛ проводили до начала кормления животных экспериментальными рационами и на 32-й день эксперимента для оценки динамики изменений. Исследование особенностей поведения и памяти животных проводили, используя тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) на оборудовании и по методам, описанным ранее [5]. Обучение проводили на 14-е сутки эксперимента, проверку обучения (памятного следа) на 15-е сутки, долгосрочную память оценивали на 29-е сутки кормления (спустя 2 недели). Тренировочные тесты на беговой дорожке для животных опытных групп Г2 и Г3 проводили 1 раз в неделю. Продолжительность нагрузки на стадии тренировок составляла 10 мин, скорость ленты с течением времени повышали с 16–19 см/с до 19–22 см/с, наклон полотна составлял 0° . Измеряемые параметры: общая протяженность пройденного расстояния, полное время шока для каждого животного, количество контактов с электрической решеткой. На 36-е сутки эксперимента животные групп Г2 и Г3 подвергались

истощающей физической нагрузке на беговой дорожке. Продолжительность нагрузки составляла 50 мин., скорость ленты плавно повышали с 19 см/с до 43 см/с, наклон полотна составлял 10°. Сразу после бега животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 часа (37 сут.) крыс, депривированных голодом ночью, выводили из эксперимента, собирали кровь, отделяли сыворотку и исследовали содержание кортикостерона методом количественного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора реактивов по инструкции производителя (IDS Limited, UK); содержание каталазы определяли с помощью коммерческого набора реагентов (Cayman, USA). Содержание простагландина E2 в моче определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реактивов по инструкции производителя (R&D systems, USA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ SPSS Statistics 20 (IBM, США), используя непараметрический ранговый критерий Манна–Уитни и критерий Стьюдента. Вычисляли среднее значение (M), стандартное отклонение (SD) и стандартную ошибку среднего (m). Данные представлены как M±m. Достоверность различий принимали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При ежедневном осмотре общее состояние всех животных по внешнему виду, состоянию шерстяного покрова, потреблению корма, воды и поведению было удовлетворительным на протяжении всего эксперимента. Среднее потребление корма животными контрольной группы K1 и животными групп Г2 и Г3 на протяжении всего эксперимента и среднее кумулятивное за весь эксперимент представлено на рисунке 1.

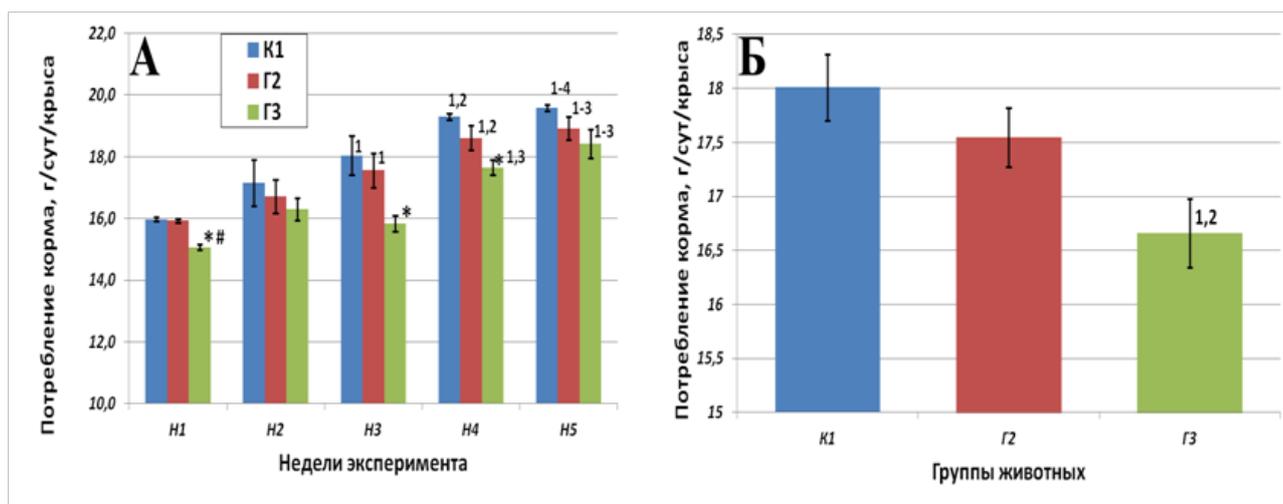


Рис. 1. Среднее потребление корма животными, г/сутки / крыса:

Примечания: N1, N2, N3, N4, N5 – неделя 1, неделя 2, неделя 3, неделя 4 и неделя 5 соответственно. a^N – достоверно относительно недели N; * – достоверно относительно группы G2; # – достоверно относительно группы G3

Среднее кумулятивное потребление корма (Рис. 1Б) животными группы Г3, получавшими ФПИ, было достоверно ниже по сравнению с контрольными интактными животными группы K1 и опытными животными группы G2. Из данных понедельного потребления корма животными (Рис. 1А) видно, что потребление корма животными группы Г3, получавшими ФПИ на 1, 3 и 4 неделях эксперимента, было достоверно меньше по сравнению с животными K1, достоверные различия с животными G2 наблюдались только на 1 неделе. Расчетное потребление 20E в составе ФПИ животными опытной группы Г3 составило – $1,83 \pm 0,02$ мг/кг/сутки; расчетное потребление полифенолов – $9,4 \pm 0,1$ мг/кг/сутки.

Прирост массы тела животных всех групп достоверно не отличался (данные не показаны), не смотря на меньшее потребление корма животными группы Г3. Можно предположить, что введение в рацион ФПИ в условиях еженедельной физической нагрузки снижало аппетит животных, не оказывая влияния на прирост массы тела.

На рисунке 2 (А, Б, В, Г) представлены результаты тестирования крыс в ПКЛ в начале эксперимента и на 32-е сутки эксперимента. При первом тестировании не выявлено достоверных различий временных интервалов, проведенных животными в открытых и закрытых рукавах лабиринта (показатели характеризующие тревожность животных, рис. 2А, Б); достоверных отличий двигательной и исследовательской активности, характеризуемых показателями перемещения между рукавами лабиринта (рис. 2В) и общей пройденной дистанцией (рис. 2Г). Во втором тестировании, животные опытной группы Г2 достоверно меньше времени проводили в открытых рукавах лабиринта (рис. 2А) по сравнению с первым тестированием. Общая пройденная дистанция у животных группы Г2 также была достоверно ниже по сравнению с первым тестированием. Еженедельная физическая нагрузка повышала тревожность лабораторных животных, тем не менее, введение в рацион ФПИ приводило к некоторой нормализации показателей тревожности и двигательной активности.

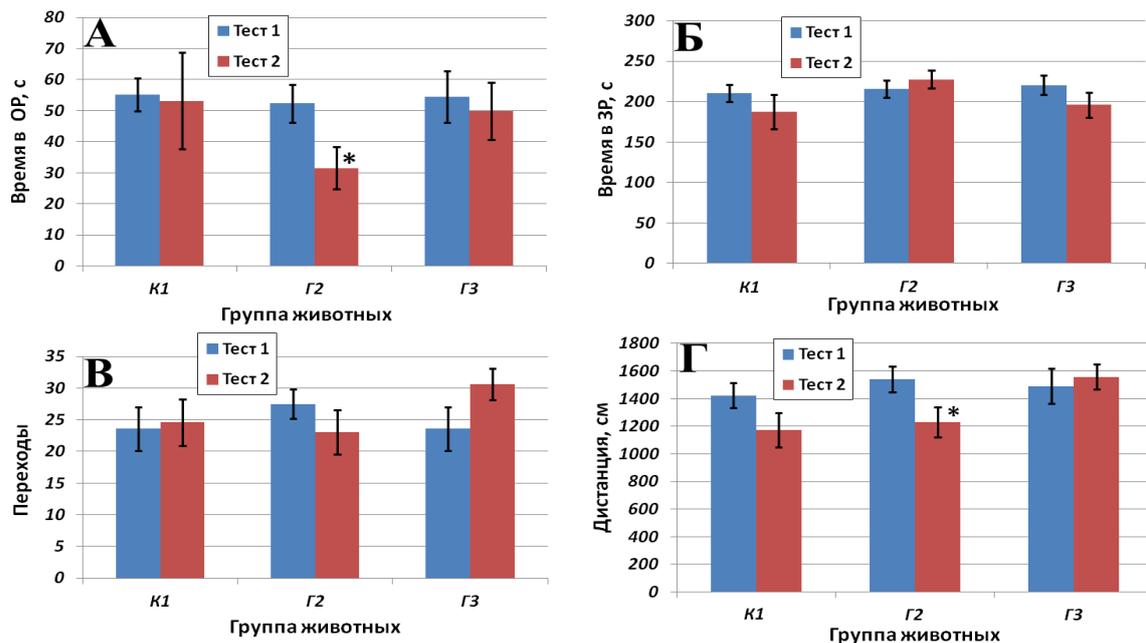


Рис. 2. Результаты тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте

Примечания: ОР – открытые рукава; ЗР – закрытые рукава; Тест 1 до начала кормления экспериментальными рационами; Тест 2 на 32 сутки эксперимента; * – различия достоверны по сравнению с 1-м тестом

В течение эксперимента не было выявлено различий в поведении животных в тесте «Беговая дорожка» по всем регистрируемым показателям (данные не показаны). На 36 сутки эксперимента отсутствовали различия между группами в показателях выносливости при истощающей физической нагрузке в тесте «Беговая дорожка» (время бега для группы Г2 составило 42 ± 2 мин. и для группы Г3 – 45 ± 2 мин.).

Во время первого тестирования – выработки УРПИ (таблица 1), во всех группах были выявлены животные, не входившие в темный отсек камеры (от 1 до 2) и исключенные из дальнейшего тестирования. На 2-е сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий между группами выявлено не было. На 14-е сутки тестирования долгосрочной памяти латентное время входа в темный отсек камеры у животных опытных групп Г2 и Г3, подвергаемых еженедельной умеренной физической нагрузке, было достоверно ниже по сравнению контрольной группой К1, что, косвенно, может указывать о влиянии регулярных физических нагрузок на долгосрочную память крыс.

Поступление в составе ФПИ фитостероидов и полифенолов в организм животного, по-видимому, может влиять на баланс изучаемых активаторов стресса. Нами было установлено, что потребление животными ФПИ препятствовало увеличению содержания в крови кортикостерона и снижало экскрецию простагландина Е2 в моче (Рис. 3А, Б).

Кортикостерон относят к основным активаторам стресс-системы, поэтому любая напряженная работа, особенно физическая нагрузка, способствует увеличению пула кортикостерона в крови [6]. Простагландин E2, наоборот, относится к ингибиторам стрессорной реакции. Полученный результат может говорить о «сглаживании» реакции организма в ответ на стресс, т. е. об адаптогенном эффекте разработанного ФПИ.

Таблица 1. Результаты тестирования УРПИ

Группы	Время пребывания, с					
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа)		Третье тестирование (2 недели)	
	Время входа, с	Не вошедшие животные (исключены из теста)	Краткосрочная память		Долгосрочная память	
			Время входа, с	Число вошедших животных	Время входа, с	Число вошедших животных
К1	67±20	2(12)	164±16	1(10 %)	152±17	3(30 %)
Г2	40±14	1(12)	110±24	5(45 %)	84±25*	7(64 %)
Г3	37±12	1(12)	137±22	3(27 %)	86±24*	7(64 %)

* – различия достоверны по сравнению с группой К1

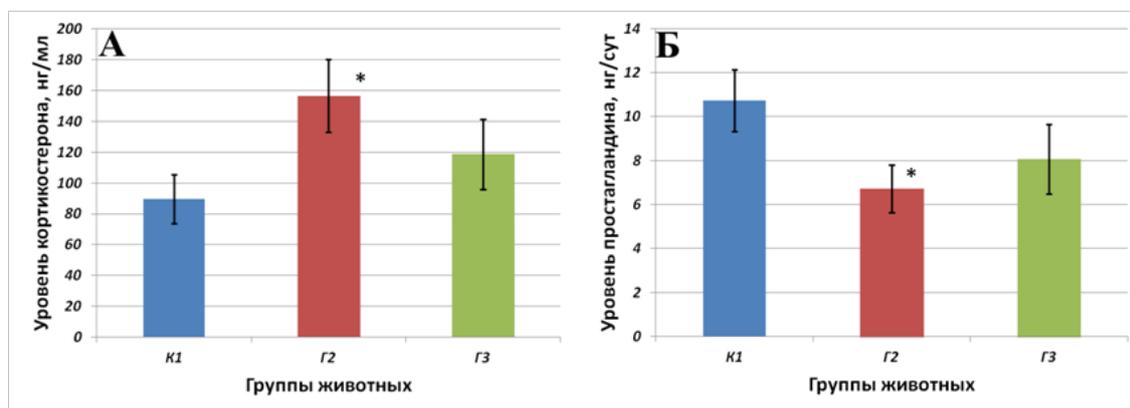


Рис. 3. Уровни кортикостерона в сыворотке крови и простагландина E2 в моче крыс

* – различия достоверны по сравнению с группой К1

Каталаза является широко распространенным антиоксидантным ферментом, присутствует в большинстве аэробных клеток, участвует в детоксикации перекисей водорода и активных форм кислорода. В нашем исследовании было показано, что истощающая нагрузка бегом у животных группы Г2 приводила к достоверному снижению уровня каталазы в крови (118±4 нмоль/мин/мл) по сравнению с группой К1 (130±3 нмоль/мин/мл) и группой Г3 (125±3 нмоль/мин/мл). Полученный результат показывает, что стрессорная беговая нагрузка приводила к повышенному расходу фермента каталазы, тогда как введение в рацион ФПИ снижало уровень окислительного стресса до уровня нормальных животных.

Заключение. Таким образом, 36-дневная нутритивная поддержка фитостероидами и другими минорными БАВ в составе разработанного ФПИ из зерен киноа на фоне еженедельной, истощающей физической нагрузки способствует нормализации показателей тревожности и двигательной активности, положительно влияет на маркеры неспецифической резистентности организма крыс. Можно сделать вывод о наличии адаптогенных свойств у разработанного ФПИ из зерен киноа, что делает его перспективным компонентом специализированных пищевых продуктов для определенных категорий лиц, подверженных повышенным физическим нагрузкам и психоэмоциональному стрессу.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-16-00107 «Новые функциональные пищевые ингредиенты адаптогенного действия, предназначенные для увеличения работоспособности организма человека и повышения его когнитивного потенциала».

Литература

Panossian A.G., Efferth T., Shikov A.N., et al. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress – and aging-related diseases // *Med Res Rev.* 2021. Vol. 41, № 1. P. 630–703.

Sidorova Y.S., Petrov N.A., Shipelin V.A., Mazo V.K. Spinach and quinoa – prospective food sources of biologically active substances // *Vopr Pitan.* 2020. Vol. 89, № 2. P. 100–106.

Graf B.L., Poulev A., Kuhn P., Grace M.H., Lila M.A., Raskin I. Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties // *Food Chem.* 2014. Vol. 163. P.178–185.

Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet // *J Nutr.* 1993. Vol. 123, № 11. P. 1939–51.

Mzhelskaya K.V., Shipelin V.A., Shumakova A.A., et al. Effects of quercetin on the neuromotor function and behavioral responses of Wistar and Zucker rats fed a high-fat and high-carbohydrate diet // *Behav Brain Res.* 2020. Vol. 378. P. 112270.

Gong S., Miao Y.L., Jiao G.Z., Sun M.J., Li H., Lin J., Luo M.J., Tan J.H. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 2. P.e0117503.