

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ
ФИТОЭКДИСТЕРОИД СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ШПИНАТА**

В.А. Шипелин, Н.А. Петров, С.Н. Зорин, С.Х. Сото, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время подверженность человека психоэмоциональному стрессу, синдрому хронической усталости, физическим и умственным нагрузкам делает актуальным использование в питании специализированных пищевых продуктов с доказанным адаптогенным действием, имеющих в своем составе функциональные пищевые ингредиенты (ФПИ), способствующие формированию неспецифической резистентности организма при отсутствии недостатков, имеющих у фармакологических препаратов [0]. Уже не одно десятилетие шпинат, традиционно известный как пищевой продукт богатый витаминами и минералами [0], изучается с позиции его нейропротекторных [0], анксиолитических [0], антиоксидантных, антипролиферативных и противовоспалительных свойств [0]. Такой широкий спектр биологической активности в значительной степени связывают с наличием в составе шпината флавоноидов и фитоэкдистероидов. Так, химический состав шпината представлен каротиноидами, фенольными соединениями – кверцетином и кемпферолом, производными патулетина, спинацетина, спинатозида, жасеидина и флавона, а также различными фенольными кислотами, в первую очередь феруловой и п-кумаровой [0]. Применение технологий концентрирования и ультрафильтрации низкомолекулярных фракций позволяет достигать высоких концентраций биологически активных веществ в составе ФПИ. Целью настоящего исследования являлась оценка неспецифической резистентности организма в свете проявления фармакологических эффектов, вызванных сочетанным воздействием фитоэкдистероидов и других минорных БАВ, входящих в состав разработанного ФПИ из шпината в условиях иммобилизационного психоэмоционального стресса у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплекс фитоэкдистероидов и полифенолов экстрагировали из сухого порошка листьев замороженного шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.) при температуре 25 °С водным раствором 40 % этилового спирта при соотношении порошок: экстрагент 1:39. После центрифугирования отбирали супернатант, подвергали микро- и ультрафильтрации; выделяли низкомолекулярную фракцию и концентрировали на установке обратного осмоса, с последующим удалением щавелевой кислоты хроматографией низкого давления. Полученный продукт лиофильно высушивали. Общее содержание полифенолов в полученном ФПИ составило 403±4,0 мг/г, 20Е-гидроксизона – 12,1±1,2 мг/г.

В 25-дневном эксперименте оценивали влияние разработанного ФПИ на адаптогенный потенциал крыс, подверженных иммобилизационному стрессу. Использовали 36 крыс-самцов линии Вистар с исходной массой тела 80±5 г, рандомизированно (по массе тела и результатам теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) согласно [0]) распределенных на 3 группы: К1 (n=12), К2 (n=12) и Г3 (n=12). В течение эксперимента крысы групп К1 и К2 получали стандартный полусинтетический рацион, а в рацион животных группы Г3 вносили ФПИ в количестве 0,05 г./100 г. корма. Для формирования психоэмоционального стресса животных из групп К2 и Г3 подвергали ежедневной принудительной иммобилизации в прозрачных домиках-фиксаторах длительностью 40 мин. Поведение и краткосрочную память животных оценивали, используя тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) на оборудовании и по методам, описанным ранее [0]. Обучение проводили на 14 сутки эксперимента, проверку обучения (закрепление памятного следа) на 15 сутки эксперимента. Динамику уровня тревожности крыс на 23 сутки по сравнению с началом эксперимента оценивали, используя тест ПКЛ. На 24 сутки эксперимента животные групп К2 и Г3 подвергались истощающей иммобилизации в течение 3 часов. Сразу по окончании истощающей иммобилизации крыс вместе с животными группы К1 помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 часа животных, депривированных голодом на протяжении ночи, выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом, отбирали кровь на антикоагулянт и выделяли плазму.

На протяжении эксперимента крысы получали воду и рационы в режиме неограниченного доступа. Учет поедаемости корма проводили через день. Массу тела животных регистрировали на 5, 7, 12, 18 и 25 день. Животных содержали по 2 крысы в клетке в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20–26 °С, относительная влажность 30–60 %, 12 часовой цикл освещения).

По окончании эксперимента в моче животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание норадреналина, адреналина и дофамина. В плазме крови крыс на автоматическом биохимическом анализаторе изучали содержание показателей белкового обмена (общий белок, альбумин, глобулины), липидного обмена (общий холестерин, холестерин ЛПВП, холестерин ЛПНП, триглицериды), минерального обмена (фосфор) и функционального состояния печени (общий билирубин, АЛТ, АСТ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На адаптацию лабораторных грызунов к стрессу влияют индивидуальные различия особей. Воздействие одного и того же стрессорного фактора может приводить к возникновению различных ответных реакций у животных одной популяции, поэтому для рандомизированного разделения по группам после семидневного карантина была проведена оценка состояния тревожности и двигательной активности каждой особи в условиях переменной стрессогенности в тесте ПКЛ. На протяжении эксперимента общее состояние всех животных по внешнему виду, качеству шерстного покрова, потреблению воды и поведению при ежедневном осмотре было удовлетворительным. Среднее потребление корма животными группы К2, подверженных ежедневной иммобилизации, было достоверно ниже по сравнению с контрольной группой. Добавка ФПИ в группе Г3 стабилизировала потребление корма на уровне тенденции, тем не менее достоверные различия с группами К1 и К2 отсутствовали (Рис. 1).

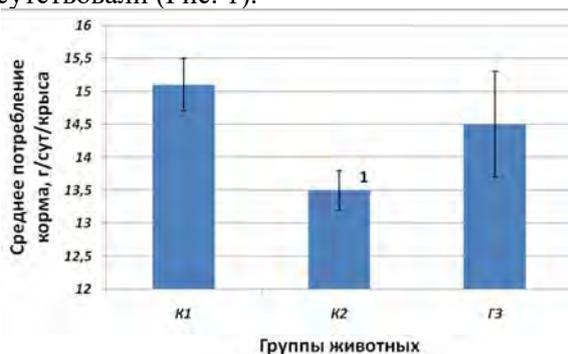


Рис. 1. Среднее потребление корма животными, г/сутки/крыса
Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1, $p < 0,05$

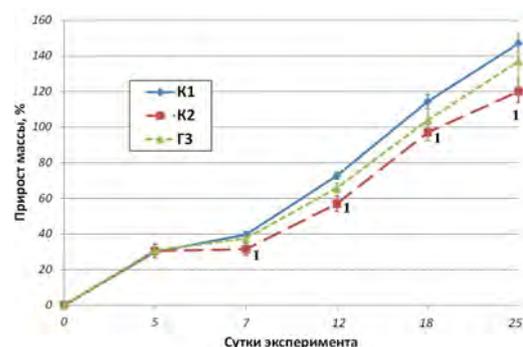


Рис. 2. Прирост массы тела крыс, %
Примечания: * – различия достоверны относительно группы К1; # – отличия достоверны относительно группы Г3

Уже на 7 сутки эксперимента выявлено достоверное снижение прироста массы тела животных группы К2 относительно животных контрольной группы К1 (Рис. 2). Отставание в приросте массы тела животных группы К2 отмечалось на протяжении всего эксперимента, и, по-видимому, связано как с меньшим потреблением корма, так и с ежедневным стрессорным воздействием иммобилизацией. Достоверных различий прироста массы тела животных группы Г3 относительно обеих контрольных групп выявлено не было. Потребление ФПИ в определенной степени снижало негативные последствия иммобилизационного стресса.

По результатам тестирования крыс в тесте ПКЛ (Рис. 3) в начале эксперимента (тест 1) было установлено, что при первом тестировании отсутствовали достоверные различия двигательной активности и временных интервалов, проведенных животными в открытых и закрытых рукавах лабиринта между всеми сравниваемыми группами. На 23 сутки (тест 2) кормления поведение животных в ПКЛ изменилось: показатель пройденной дистанции отличался достоверно для всех групп по сравнению с первым тестированием (Рис. 3В). Животные контрольной группы К2 и животные, получавшие ФПИ (Г3), подверженные ежедневной иммобилизации, имели повышенную двигательную активность во время второго тестирования, что выражалось достоверно большей пройденной дистанцией по сравнению с животными контрольной группы К1 (Рис. 3В).

Животные, получавшие ФПИ, отличались также наибольшей среди всех групп поисковой активностью, что проявлялось в достоверном увеличении количества переходов по сравнению с контрольной группой К1 (Рис. 3Г). Животные опытной группы ГЗ, получавшие ФПИ, проводили достоверно меньше времени в закрытых рукавах лабиринта по сравнению с первым тестированием (Рис. 3Б). Более того, при втором тесте эти крысы проводили достоверно меньше времени в закрытых рукавах и, соответственно, больше времени в открытых рукавах (Рис. 3А) по сравнению с животными контрольной группы К2, тем самым демонстрируя анксиолитический эффект.

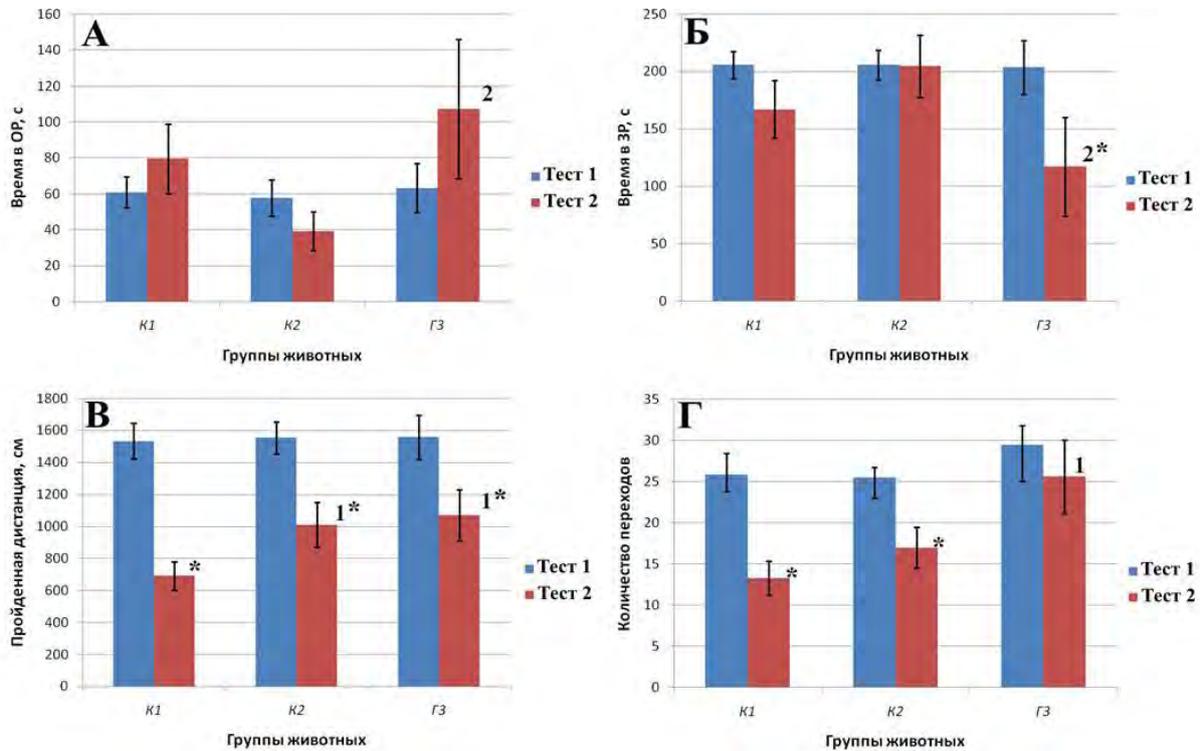


Рис. 3. Результаты тестирования крыс в приподнятом крестообразном лабиринте
 Примечания: Тест 1 – до начала кормления экспериментальными рационами; Тест 2 – на 23 сутки эксперимента; * – различия достоверны по сравнению с 1 тестом; 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой К2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой ГЗ (везде $p < 0,05$)

Таблица 1. Биохимические показатели плазмы крови крыс по окончании эксперимента

Показатель, ммоль/л	К1	К2	ГЗ
ЛПВП	0,58±0,03	0,66±0,08	0,60±0,05
ЛПНП	0,17±0,01	0,15±0,01	0,15±0,02
Триглицериды	0,68±0,05	0,84±0,09	0,46±0,05 ^{1,2}
Холестерин	1,24±0,02	1,31±0,07	1,24±0,09
АЛТ	45,5±1,6	42,5±2,5	48,7±3,4
АСТ	119,6±4,7	116,5±9,0	132±0,6
Билирубин общий	2,96±0,14	3,57±0,30 ¹	2,65±0,13 ^{2,3}
Глобулин	19,3±0,4	17,9±0,4 ¹	19,3±0,8
Альбумин	24,4±0,2	24,8±0,3	24,1±0,7
Белок общий	43,6±0,5	42,5±0,6	43,4±1,5
Фосфор	1,95±0,04	1,92±0,06	1,89±0,07

Примечание: надстрочные числовые индексы – номера групп, различие с которыми достоверно, $p < 0,05$; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза

Процессы сохранения краткосрочной памяти, а также когнитивные функции оценивали в тесте УРПИ. Обучение проводили на 14 сутки эксперимента – 1 день тестирования, проверку обучения (памятного следа) на 15 сутки эксперимента – 2 день. На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий между группами не выявлено (данные не показаны). Полученный результат свидетельствует об отсутствии как отрицательного, так и положительного влияния выбранных стрессорных воздействий на обучаемость и память животных в тесте УРПИ.

Анализ биохимических показателей крови (Таблица 1) у животных группы ГЗ, получавших ФПИ, показал достоверное снижение уровня триглицеридов крови по сравнению с группами К1 и К2, что свидетельствует о гиполипидемическом эффекте разработанного ФПИ на фоне стресса иммобилизацией.

У животных, стрессированных иммобилизацией (К2), выявлено достоверное увеличение общего билирубина, а потребление разработанного ФПИ полностью и достоверно нормализовало данный показатель у животных опытной группы Г3 даже ниже контрольных значений. По мимо этого, на фоне иммобилизации у животных не получавших ФПИ, достоверно снизились уровни глобулинов как по сравнению с интактными животными К2, так и с получавшими добавку.

Изучение содержания дофамина, норадреналина и адреналина в суточной моче показало, что ежедневная иммобилизация приводит к достоверному снижению содержания биогенных аминов по сравнению с показателями у интактных животных контрольной группы К1 (Таблица 2), причем потребление животными диеты, обогащенной фитостероидами в составе ФПИ, оказывало положительное влияние на баланс изученных активаторов стресса, нормализуя их экскрецию с мочой.

Таблица 2. Концентрация катехоламинов в суточной моче животных на 25 сутки эксперимента

Показатель, мкг/сутки	К1	К2	Г3
Норадреналин	2,4±0,3	1,2±0,2 ¹	1,8±0,3
Адреналин	2,6±0,4	1,3±0,3 ¹	1,7±0,4
Дофамин	5,9±0,7	2,6±0,6 ¹	4,1±0,5

Примечание: надстрочные числовые индексы – номера групп, различие с которыми достоверно, $p < 0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных, можно заключить, что 23-дневное потребление комплекса полифенолов и фитостероидов в составе ФПИ из листьев шпината в условиях иммобилизационного психоэмоционального стресса у крыс, способствует увеличению исследовательской активности животных на фоне анксиолитического действия, положительно влияет на липогенез и клиренс билирубина, а также нормализует экскрецию биогенных аминов с мочой. Таким образом, адаптогенные свойства разработанного из листьев шпината ФПИ, делают его перспективным компонентом специализированных пищевых продуктов для определенных категорий лиц, подверженных 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

- Ray A., Gulati K., Anand R. Stress, adaptogens and their evaluation: an overview // J. Pharm. Rep. 2016. Vol. 1, № 2. Article ID 1000110.
- Roberts J.L., Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives // Food Funct. 2016. Vol. 7, № 8. P. 3337–53.
- Cartford M.C., Gemma C., Bickford P.C. Eighteen-month-old Fischer 344 rats fed a spinach-enriched diet show improved delay classical eyeblink conditioning and reduced expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNFbeta in the cerebellum // J Neurosci. 2002. Vol. 22, № 14. P. 5813–6.
- Son H., Jung S., Shin J.H., et al. Anti-stress and anti-depressive effects of spinach extracts on a chronic stress-induced depression mouse model through lowering blood corticosterone and increasing brain glutamate and glutamine levels // J. Clin. Med. 2018. Vol. 7, № 11. P. E406.
- Lomnitski L., Bergman M., Nyska A., Ben-Shaul V., Grossman S. Composition, efficacy, and safety of spinach extracts // Nutr Cancer. 2003. Vol. 46, № 2. P.222–31.
- Fiorito S., Prezioso F., Epifano F., et al. Novel biologically active principles from spinach, goji and quinoa // Food Chem. 2019. Vol. 276. P.262–5.
- 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.