

УДК 616-008 939 15-39 616.12-008.61  
©Коллектив авторов

## ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ЧЕРНОПЛОДНОЙ РЯБИНЫ (*ARONIA MELANOCARPA*) НА ГОЛОВНОЙ МОЗГ

И.Н.Суворова<sup>1</sup>, В.В.Давыдов<sup>2</sup>, В.Н.Прозоровский<sup>3</sup>, В.Н.Швец<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины, г. Харьков

<sup>3</sup>ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, г. Москва

<sup>4</sup>Запорожский государственный медицинский университет

Исследовали антиоксидантные свойства экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*).

Внутрибрюшинное введение препарата в дозе 0,2 г/кг массы, предупреждает возникновение явлений оксидативного стресса в полушариях головного мозга, вызванного 30-минутной иммобилизацией. В экспериментах *in vitro* продемонстрирован ингибирующий эффект экстракта листьев черноплодной рябины на аскорбат-зависимое и  $H_2O_2$  - стимулируемое свободнорадикальное окисление белков и липидов гомогената полушарий головного мозга. Установлено, что наиболее выраженный эффект препарата на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов проявляется в постмитохондриальной фракции мозга.

**Ключевые слова.** иммобилизационный стресс, мозг, оксидативный стресс, антиоксидантное действие, экстракт листьев черноплодной рябины.

**ВВЕДЕНИЕ.** Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что стресс выступает в качестве одного из самых распространенных этиологических факторов возникновения различных заболеваний и, в том числе, заболеваний центральной нервной системы [1,2]. Реализация повреждающего действия стресса связана со стимуляцией свободнорадикальных процессов, в клетках [3,4]. В связи с этим перспективным направлением в разработке эффективных подходов к лечению и профилактике патологии центральной нервной системы представляется поиск соединений, обладающих выраженной антиоксидантной активностью. В сравнение с экстрактами листьев других растений экстракт листьев черноплодной рябины в значительной степени обогащен полифенолами. В его составе обнаружены: олигомерные проантоцианидины (56%), главным образом димеры-тетрамеры; их мономерные предшественники (22%) катехины (флаван-3-олы) и лейкоантоцианидины (флаван-3-4-диолы), а также флавоноловые гликозиды кверцетинового ряда (12%). Учитывая это, целью работы явилось изучение особенностей проявления антиоксидантного действия экстракта листьев черноплодной рябины [5] на головной мозг.

**МЕТОДИКА.** Работа выполнена на взрослых (10 - 12 мес.) крысах самцах линии Wistar массой 350 - 400 г. Животных делили на 3 подгруппы: 1-интактные; 2-крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в

течение 30 минут и 3 - животные, которым за 60 минут до иммобилизации внутривенно вводили антиоксидантный препарат - экстракт листьев черноплодной рябины [5] в изотоническом растворе хлористого натрия в дозе 0,2 г/кг массы. Эффективность воспроизведения стресса контролировали по уровню 11-оксикортикостероидов и катехоламинов в крови

После декапитации животных мозг быстро извлекали и замораживали в жидком азоте. В замороженной ткани определяли содержание диеновых конъюгатов [6], флуоресцирующих соединений типа шиффовых оснований [7] и карбонилированных белков [8]. В специальных экспериментах проводили определение активности глутатионпероксидазы [9] и супероксиддисмутазы [10] в митохондриальной и постмитохондриальной фракциях полушарий головного мозга.

В экспериментах *in vitro* изучали влияния экстракта листьев черноплодной рябины на состояние индуцированного свободнорадикального окисления липидов и белков в гомогенатах мозга. Для этого полушария головного мозга гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма в изотоническом растворе хлористого натрия в соотношении 1:10 (масса ткани / объем раствора). Приготовленные таким образом гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли и использовали в работе.

Для изучения интенсивности аскорбат-зависимого ПОЛ, аликвоты гомогенатов, содержащие 0,2-0,4 мг белка, вносили в реакционную смесь, содержащую 0,1 М трис-НCl буфер (pH 7,4), 0,8 мМ аскорбиновую кислоты и 1,2 мкМ соль Мора. Пробы интенсивно встряхивали и инкубировали при 37° С. Через 5, 15, 30 и 45 минут производили отбор проб реакционной смеси, в которых измеряли концентрацию веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные вещества) [11]. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции малонового диальдегида

Для изучения интенсивности H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-стимулируемого ПОЛ, аликвоты гомогенатов вносили в реакционную смесь, содержащую 0,1 М трис- НCl буфер (pH 7,4) и 10 мМ пероксид водорода. Пробы интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°С. Через 10, 20 и 30 минут производили отбор проб реакционной смеси, в которых измеряли концентрацию веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой.

При изучении аскорбат-зависимого и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-стимулируемого ПОЛ в пробах, параллельно с определением уровня ТБК-реактивных веществ, проводили измерение концентрации карбонилированных белков.

Определение состояния аскорбат-зависимого и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-стимулируемого ПОЛ проводили также в митохондриальной и постмитохондриальной фракциях гомогенатов мозга. Для получения субклеточных фракций, ткань полушарий головного мозга гомогенизировали при помощи стеклянного гомогенизатора Поттера-Эльвегейма в 0,32 М сахарозе (pH 7,4). Приготовленные 10% гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут. Для получения постмитохондриальной фракции супернатанты повторно центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Осадки однократно отмывали при аналогичном режиме центрифугирования, суспендировали в 2 мл среды выделения и использовали в качестве грубой митохондриальной фракции. Все процедуры проводили при 4 -5°С.

Концентрацию белка в гомогенатах и субклеточных фракциях мозга определяли по Лоури.

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Wilcoxon - Mann - Whitney.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Как видно из таблицы 1, 30-минутная иммобилизация животных сопровождалась возникновением у них явлений оксидативного стресса в клетках полушарий головного мозга [12]. Об этом свидетельствуют увеличение содержания диеновых конъюгатов, шиффовых оснований и карбонилированных белков на 17%, 116% и 28% по сравнению с

Таблица 1 Влияние экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) на состояние свободнорадикальных процессов в мозге крыс при иммобилизационном стрессе

Показатель	Группа животных		
	интактные	стресс	Препарат + стресс
диеновые конъюгаты	0,029 ± 0,006	0,034 ± 0,002	0,018 ± 0,003
шиффовы основания	1,9 ± 0,2	4,1 ± 0,9	2,5 ± 0,2
карбонилированные белки			
E <sub>536</sub>	3,6 ± 0,3	4,6 ± 0,3	3,7 ± 0,1
E <sub>370</sub>	3,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	3,9 ± 0,2

Примечание: В каждой группе было по 4-5 крыс; \*  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным. Содержание: диеновых конъюгатов - в мкмоль/г ткани; шиффовых оснований - в единицах флуоресценции при 430 нм /г ткани; карбонилированных белков - в единицах оптической плотности (356 или 370 нм)/г ткани.

исходными величинами, соответственно. Предварительное введение экстракта листьев черноплодной рябины за час до иммобилизации полностью предотвращало возникновение подобных сдвигов.

Полученные результаты указывают на то, что экстракт листьев черноплодной рябины проявляет выраженные антиоксидантные свойства в отношении нервной ткани. Его введение в дозе 0,2 г/кг массы приводит к предупреждению стрессорного повышения интенсивности перекисного окисления липидов и свободнорадикального окисления белков в мозге иммобилизованных животных.

Анализируя причины проявления антиоксидантного эффекта исследуемого препарата в условиях *in vivo*, можно думать о том, что его возникновение обусловлено компонентами экстракта, оказывающими ингибирующее воздействие на состояние свободнорадикальных процессов в клетках. Для проверки этого предположения в экспериментах *in vitro* было изучено влияние экстракта на состояние индуцированного ПОЛ и свободнорадикального окисления белков в гомогенатах мозга.

По данным таблицы 2, экстракт листьев черноплодной рябины тормозил скорость образования ТБК-реактивных веществ в процессе аскорбат-зависимого и  $H_2O_2$ -стимулируемого ПОЛ в гомогенатах мозга. При этом эффективность снижения скорости аскорбат-зависимых реакций значительно превышала таковую в отношении  $H_2O_2$ -стимулируемых. Наряду с торможением ПОЛ, препарат оказывал ингибирующий эффект на индуцированное  $Fe^{2+}$  и  $H_2O_2$  свободнорадикальное окисление белков гомогената мозга (табл.3).

Как следует из результатов, представленных в таблицах 2 и 3, экстракт проявлял максимальный антиоксидантный эффект при внесении в среду инкубации гомогенатов мозга в концентрации 0,2 мг/мл. При уменьшении

Таблица 2. Влияние экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) на состояние индуцированного ПОЛ в гомогенатах мозга крыс

Прооксидант	Время Реакции (мин)	Контроль	Концентрация экстракта в реакционной смеси (мг/мл)		
			0,2	0,04	0,01
-	0	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1
$H_2O_2$	10	12,8±1,0	9,2±0,5	8,4±0,8	7,9±0,9
	20	14,7±0,9	2,5±0,3	3,9±0,5	5,5±0,9
	30	18,0±1,2	4,7±0,5	4,8±0,6	5,6±0,7
	40	15,5±1,1	3,1±0,4	2,9±0,4	3,0±0,3
$Fe^{2+}$ – аскорбат	2	6,9±0,8	3,1±1,0	2,4±0,4	3,7±0,5
	15	13,6±1,0	0,05±0,01	2,8±0,2	7,5±1,5

Примечание. Интенсивность индуцированного ПОЛ - в нмоль ТБК-реактивных веществ/мг белка. В опытах использовалось по 4 - 6 крыс; \*  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным.

## АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ЧЕРНОПЛОДНОЙ РЯБИНЫ

Таблица 3 Влияние экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) на накопление карбонилированных белков в гомогенатах мозга крыс в условиях стимуляции свободнорадикальных процессов

Прооксидант	Контроль	Концентрация экстракта в реакционной смеси (мг/мл)		
		0,2	0,04	0,01
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,311±0,019	0,222±0,010	0,256±0,010	0,195±0,010
Fe <sup>2+</sup> - аскорбаг	0,163±0,003	0,126±0,015	0,146 ± 0,017	0,186 ± 0,018

Примечание содержание карбонилированных белков - в единицах оптической плотности при 370 нм/мг белка В опытах использовалось по 3 - 5 крыс. \* p < 0,05 по отношению к интактным животным

концентрации сила антиоксидантного действия уменьшалась Тем не менее, она сохранялась даже при концентрации препарата в среде инкубации соответствующей 0,01 мг/мл

Исследование эффекта экстракта листьев черноплодной рябины на индуцированное ПОЛ в субклеточных фракциях гомогенатов мозга показало (табл 4), что препарат не оказывал существенного влияния на интенсивность H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-стимулируемого накопления ТБК-реактивных веществ как в митохондриальной, так и постмитохондриальной фракциях мозга В тоже время в концентрации 0,2 мг/мл он вызывал уменьшение интенсивности аскорбат-зависимого ПОЛ в митохондриальной фракции гомогенатов мозга в 7,1 раза, а в постмитохондриальной фракции - в 19 раз, по сравнению с его исходным уровнем.

Полученные данные указывают на то, что парентеральное введение экстракта в условиях воздействия прооксидантных факторов на организм, предупреждает возникновение явлений оксидативного стресса в полушариях головного мозга

Таблица 4 Влияние экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) на накопление ТБК-реактивных веществ в процессе индуцированного ПОЛ в субклеточных фракциях гомогената мозга крыс

Субклеточная Фракция	Прооксидант	Контроль	Концентрация экстракта в реакционной смеси (мг/мл)		
			0,2	0,04	0,01
митохондрии	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,18±0,12	1,02±0,04	1,00±0,06	0,97±0,23
	Fe <sup>2+</sup> - аскорбат	0,93 ± 0,13	0,21 ± 0,03	0,33 ± 0,05	
Постмитохондриальная фракция	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,52±0,26	1,35±0,08	0,95±0,18	
	Fe <sup>2+</sup> - аскорбат	2,10±0,20	0,11±0,05	0,24±0,03	0,59±0,09

Примечание Содержание ТБК-реактивных веществ в нмоль МДА/мг белка В опытах использовали по 3 -5 крыс, \* p < 0,05 по отношению к интактным животным

Антиоксидантное действие препарата в условиях *in vitro* проявляется в его тормозящем влиянии на скорость свободнорадикального окисления липидов и белков гомогенатов мозга в модельных системах с различными инициаторами свободнорадикальных процессов Данный эффект, по всей вероятности, связан со способностью компонентов экстракта обрывать цепные свободнорадикальные реакции Причем, сведения о проявлении антиоксидантного действия экстракта аронии в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - индуцируемой системе косвенно указывают на способность его компонентов, выступать в роли "ловушек" гидроксильных радикалов

Особого внимания заслуживают особенности проявления антиоксидантного действия препарата в различных субклеточных фракциях Проведенные исследования позволили выявить максимальный эффект в постмитохондриальной фракции Данный феномен, по всей вероятности, обусловлен большей доступностью препарата для процессов протекающих в цитозоле

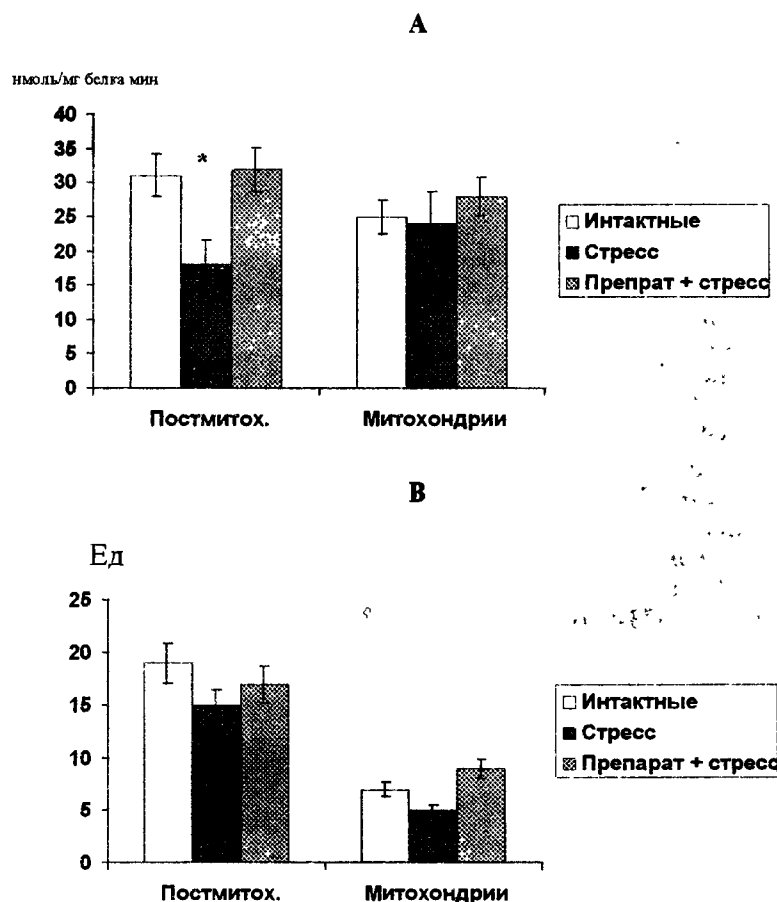


Рисунок 1.

Влияние экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) на активность глутатионпероксидазы (А) и супероксиддисмутазы (Б) в постмитохондриальной и митохондриальной фракциях полушарий головного мозга крыс подвергнутых иммобилизации. В экспериментах использовалось по 5 - 6 крыс. \*  $p < 0,05$  к интактным. Активность глутатионпероксидазы - в нмоль/мг белка мин; активность супероксиддисмутазы - в условных единицах.

Локальные внутриклеточные особенности проявления антиоксидантного действия экстракта, позволяют предполагать и возможность его прямого влияния на активность ферментов "первой линии антиоксидантной защиты" - супероксиддисмутазы и глутатион-S-пероксидазы [13,14]. На это прямо указывают и результаты экспериментов *in vivo*. После внутрибрюшинного введения экстракта листьев черноплодной рябины у крыс существенно возросла активность глутатионпероксидазы в постмитохондриальной фракции (рис. 1), по сравнению с ее величиной у животных контрольной группы. В тоже время изменения активности супероксиддисмутазы под влиянием исследуемого препарата не происходило.

Таким образом, экстракт листьев черноплодной рябины обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Механизм их проявления, по всей вероятности, имеет сложный характер. В его основе может лежать прямой антирадикальный эффект одних его компонентов, а модулирующее действие на активность антиоксидантных ферментов - других. Их изучение требует проведения специального анализа, что и составит предмет наших последующих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sime W.E. Buel J.C. (1980) J. Cardiovasc. Pulm. Techn., **8** (5), 27-41.
2. Судаков К.В., Ульянинский Л.С. (1980). Вестник АМН СССР, **34** (11), 37-41.
3. Меерсон Ф.З. (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. -М.: Медицина.
4. Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T., Svec P. (1996) Pharmazie., **51**(1), 51-53.
5. Ипатов О.М. Прозоровский В.Н. Патент на изобретение РФ №2171111 от 05. 05. 2000 г. " Экстракт листьев Аронии, обладающий биологической активностью и способ его получения".
6. Стальная И.Д. (1977) Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 63-64.
7. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. (1991) Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. - London.
8. Дубинин Е.Е. (2000) Вопр. мед. химии., **46** (4), 36-47.
9. Mills G.C. (1959) J. Biol. Chem., **234** (3), 502-506.
10. Костюк В.А. (1990) Вопр. мед. химии., **36** (2), 54-62.
11. Muller G., Fruhant A., Mathias B. (1986) Z. Gesamte. um. Med. und Grenzgeb., **41**(24), 673-676.
12. Betteridge D.J. (2000) Metabolism., **49** (2, Suppl. 1), 3-8.
13. Warner H.R. (1994) Free Radical Biol. Med., **17** (3), 249-258.
14. Carine M., Raes M., Toussaint O., Remacle I. (1994) Free Rad. Biol. Med., **17** (3), 235-248

Поступила 07.10.2003

PECULIARITY OF THE ANTIOXIDANT ACTION OF THE EXTRACT FROM *ARONIA MELANOCARPA* LEAVES ANTIOXIDANT ON THE BRAIN

I.N.Suvorova<sup>1</sup>, V.V.Davydov<sup>2</sup>, V.N.Prozorovskiy<sup>3</sup>, V.N. Shvets<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Children and Adolescent Health Protection, Ukrainian Academy of Medical Sciences, Kharkov, Ukraine

<sup>3</sup>V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

The antioxidant action of the extract from *Aronia melanocarpa* leaves on the brain was investigated. The intraperitoneal injection of extract in the dose of 0.2 g/kg prevented manifestations of oxidative stress in the brain induced by immobilization of rats. *In vitro* experiments revealed that the extract decreased intensity of ascorbate - and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced lipid and protein peroxidation in the brain homogenates. The most effect of the extract on ascorbate - induced lipid peroxidation was found in the postmitochondrial fraction of brain homogenate.

**Key words:** Immobilized stress, brain, oxidative stress, antioxidant effect, extract from *Aronia melanocarpa* leaves.