

Министерство образования и науки Российской Федерации

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕРМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**



.2017

В.Н. Коротаев

**ОТЧЕТ  
о выполнении НИР «Изучение антиоксидантного, антигипоксического и  
мембраностабилизирующего действия концентрата безалкогольного  
напитка «Персин» из листьев персика»**

№ 2017/386

Подразделение: НОЦ ХимБИ

Директор, к.х.н. Ольга Красных О.П.

Пермь, 2017г.

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы Солодников С.Ю. (заключение)  
К.м.н., доцент (подпись, дата)

Исполнители темы Триандафилова Г.А. (эксперимент)  
(подпись, дата)

Маслова В.В. (эксперимент)  
(подпись, дата)

## **1 Материалы и методы**

### **1.1 Характеристика животных и условия содержания**

В экспериментах использованы белые мыши CD-1 обоего пола, четырехмесячного возраста.

Источник животных: питомник лабораторных животных «Пущино», вторая генерация.

Карантин/адаптация: животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации (14 дней). Во время этого периода у животных контролировалось проявление отклонений в состоянии здоровья согласно СОП «Прием животных, карантин, адаптация».

Распределение по группам производилось случайным образом, в качестве критерия выбора животных использовалась гомогенность групп по массе тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 15% от средней массы животных одного пола.

### **Идентификация**

Каждому животному присваивался индивидуальный идентификационный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка красителем (Табл. 1).

Таблица 1

#### **Схема нумерации животных:**

Индивидуальный номер животного	Локализация метки
1	Правое ухо
2	Левое ухо
3	Правая передняя лапа
4	Левая передняя лапа
5	Правая задняя лапа
6	Левая задняя лапа

На этикетке клетки определенного цвета указывалась группа, номера животных, метка, код исследования, фамилия и инициалы руководителя исследовательской группы.

## Информация об уходе и содержании

Все процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии с СОП («Ежедневный осмотр состояния животных», «Рутинные манипуляции по уходу за грызунами», «Размещение и маркировка лабораторных животных»).

В комнате содержания животных поддерживались следующие условия: температура окружающего воздуха 18-24°C; относительная влажность 50-70%; естественная смена световых периодов; 100% вентилирование без рециркуляции со сменой воздуха 8 объемов комнаты в час.

Мышь содержались в стандартных поликарбонатных клетках (Bioskape) по 10 животных одного пола на клетку. Подстил: REHOFIX, производства J. RETTENMAIER & SÖHNE (Германия). Корм: «ПроКорм», полнорационный, для конвенциональных мелких лабораторных грызунов, апатогенный, производства АО «БиоПро» (Россия). Для питья использовалась профильтрованная водопроводная вода, которую давали животным в стандартных питьевых бутылочках (Bioskape) объемом 750 мл. Корм и питье без ограничения (*ad libitum*). Содержание животных исключало возможность контаминации подстилки, корма и воды, способной повлиять на результаты исследования.

Объектом исследования служил концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика, производства ООО НПК «Инфинити», дата изготовления 07.10.2017 г.

## 1.2 Методы исследования

### 1.2.1 Методика определения антиоксидантной активности.

Метод основан на способности нитропруссида натрия в водном растворе при физиологическом значении pH спонтанно генерировать оксид азота, который взаимодействует с кислородом с образованием нитрит-ионов. Концентрацию нитрит-ионов в среде можно оценить с помощью добавления реактива Грисса. Связывание оксида азота ведет к снижению образования нитрит-ионов.

Для изучения антиоксидантной активности препарата методика была адаптирована для использования на микропланшетном ридере Tecan M1000 PRO. Нитропруссид натрия (чда, ЗАО «Вектон», Россия) 10 mM готовился путем растворения навески в PBS pH 7,4. Реактив Грисса (чда, ЗАО «Вектон», Россия) 10% раствор готовился путем растворения навески в 12% уксусной кислоте. Растворы готовились в день эксперимента. В качестве референтного препарата использовали аскорбиновую кислоту, раствор для внутривенного и внутримышечного введения (ФКП «Армавирская биофабрика»).

В лунку 96-луночной плашки вносили 100 мкл раствора нитропруссида натрия и 10 мкл пробы исследуемого концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика. Смесь инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем в лунку вносили 100 мкл раствора реактива Грисса. Оптическую плотность измеряли при длине волны 545 нм. В качестве эталонного препарата использовали аскорбиновую кислоту (раствор для инъекций).

Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ связывания NO} = 100 * (\text{OD}_k - \text{OD}_o) / \text{OD}_k,$$

Где  $\text{OD}_k$  – оптическая плотность контрольной пробы,

$\text{OD}_o$  – оптическая плотность опытной пробы.

### Результаты:

Было установлено, что концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика обладает антиоксидантной активностью в концентрации 4 мкл/мл и 8 мкл/мл. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

#### Исследование антиоксидантной активности концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика

Препарат, концентрация	Процент связывания NO (M±SEM)
Персин, 8 мкл/мл	49,4±1,3
Персин, 4 мкл/мл	38,6±2,2
Аскорбиновая кислота, 1,2 мг/мл	60,5±0,8

#### 1.2.2 Методика оценки действия концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика на мембранные эритроциты.

Получение эритроцитов.

Кровь из хвостовой вены двух белых крыс SD собирали в пластиковые пробирки, содержащие этилендиаминететрауксусную кислоту в качестве антикоагулянта. Образец охлаждали, затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин. Осевшие эритроциты трижды промывали забуференным фосфатами (pH 7,4) раствором хлорида натрия (далее PBS). Промытую эритроцитарную массу ресуспенсировали в PBS, чтобы получить 5%-ную (об/об) суспензию, которую использовали в течение 6 часов.

### *Гемолиз эритроцитов.*

Гемолиз проводили в пробирках Эппендорфа объемом 2 мл. Контрольная проба содержала 1,0 мл изотоничекого PBS и 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии. Максимальный гемолиз достигался путем добавления 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии к 1,0 мл дистиллированной воды. Для проведения частичного гемолиза эритроцитов готовили раствор PBS с разведением в 2,5 раза, к 1,0 мл которого добавляли 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии. После внесения эритроцитарной суспензии пробы инкубировали при комнатной температуре 5 минут и проводили центрифугирование (4000 об/мин, 5 мин). Уровень гемолиза оценивали по поглощению трех образцов каждой надосадочной жидкости при длине волны 535 нм на мультипланшетном ридере Tecan M1000 PRO.

### *Оценка влияния концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика на степень гемолиза эритроцитов.*

К содержимому проб (0,2 мл 5%-ной эритроцитарной суспензии в 1 мл изотонического PBS или PBS, разбавленного в 2,5 раза, или дистиллированной воды) добавляли «Персин» для создания концентрации 4 мкл/мл и 8 мкл/мл. Инкубирование, центрифугирование и определение степени гемолиза проводили аналогично контрольным пробам.

Мембраностабилизирующую активность (MA) в гипотоническом растворе PBS рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ MA} = 100 * (\text{OD}_k - \text{OD}_o) / \text{OD}_k,$$

Где  $\text{OD}_k$  – оптическая плотность контрольной пробы,

$\text{OD}_o$  – оптическая плотность опытной пробы.

### **Результаты:**

Было установлено, что концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика в концентрациях 4 и 8 мкл/мл обладает мембраностабилизирующим действием при осмотическом гемолизе эритроцитов. Результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 1.

Таблица 3

Мембраностабилизирующая активность концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика, %

Препарат, концентрация	Процент МА ( $M \pm SEM$ )
Персин, 8 мкл/мл	21,4±0,2
Персин, 4 мкл/мл	5,4±0,4

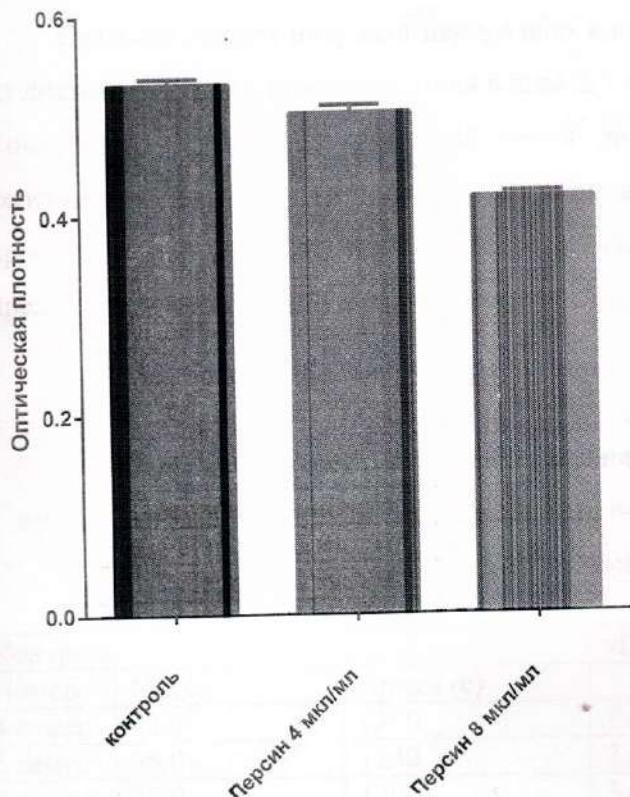


Рис. 1. Оптическая плотность надосадочной жидкости в пробах в растворе PBS, разбавленном в 2,5 раза.

### 1.2.3 Методика оценки действия концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика в модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией

#### 1.2.3.1 Исследование антигипоксической активности концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика при однократном введении

Опыты были поставлены на белых мышах (самцах и самках) линии CD-1 массой 36,0 - 46,2 грамм. Животные были разделены на две группы по 6 животных в опыте и контроле. Животные использовались в опыте натощак. Накануне опыта животные не получали корм в течение 12 часов.

## Методика опыта

Животные интактной группы получали перорально воду очищенную питьевую, в количестве 0,1 мл на 10 граммов массы тела однократно с помощью зонда. Через 40 минут после введения воды животные интактной группы помещались в сосуды с притертой пробкой емкостью 250 мл. Дополнительная герметизация проводилась с использованием вазелина и ленты «Parafilm». Фиксировалось время гибели животных. Критерием гибели являлась прекращение дыхательной и двигательной активности.

Опытная группа получала перорально концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика с помощью зонда в дозе 2,5 мл/кг (0,1 мл препарата на 10 гр. веса мыши). Концентрат разводили кипяченой водой до объема 0,5 мл. Через 40 минут после перорального введения концентрата «Персин» животные помещались в сосуды с притертой пробкой емкостью 250 мл. Фиксировалось время гибели животных. Результаты представлены в таблице 4 и на рисунке 2.

Таблица 4

Влияние концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика на продолжительность жизни мышей в модели гипоксической гипоксии с гиперкардией при однократном введении

Контроль			«Персин» 2,5 мл/кг		
Номер	Масса	Время (с)		Масса	Время (с)
4 самец	42,0	1200	1 самец	41,8	1080
5 самец	36,0	1140	2 самец	43,9	960
4 самка	37,0	1200	3 самец	38,0	960
5 самка	41,7	1260	1 самка	40,4	1500
6 самец	38,1	1255	2 самка	38,9	1500
6 самка	38,0	1037	3 самка	38,7	1740
Среднее	38,8	1182		40,3	1290

Статистически достоверных различий в сроках гибели животных опытной и контрольной групп не установлено ( $p=0.46$ )

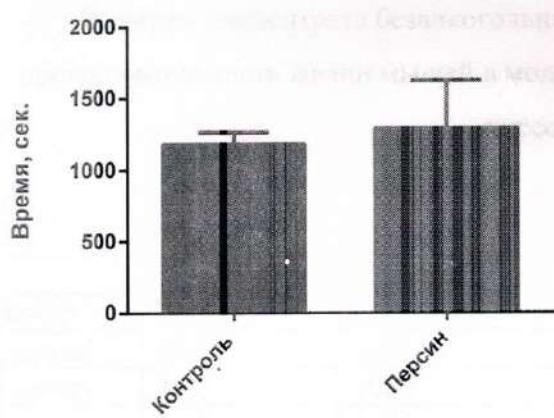


Рис.2. Влияние концентрата "Персин" на продолжительность жизни мышей в модели гипоксической гипоксии с гиперкарнией.

#### *1.2.3.2 Исследование антигипоксической активности концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика при курсовом введении.*

Опыты были поставлены на белых мышах (самцах и самках) линии CD-1 массой от 33,0 до 46,0 грамм. Животные были разделены на две группы по 9 животных в опыте и контроле. Животные использовались в опыте натощак.

#### Методика опыта

Интактная группа получала воду питьевую очищенную в дозе 0,1 мл на 10 граммов массы тела. Опытная группа получала концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика, перорально, с помощью зонда в течение 8 дней в дозе 2,5 мл/кг (0,1 мл препарата на 10 гр. веса мыши). Концентрат разводили кипяченой водой до объема 0,5 мл. На 8-й день, через 40 минут после перорального введения «Персин» животные помещались в сосуды с притертой пробкой емкостью 250 мл. Изучение антигипоксического действия проводилось аналогично опыту при однократном введении концентрата. Результаты представлены в таблице 5 и на рисунке 3.

Таблица 5

Влияние концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика на продолжительность жизни мышей в модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией при курсовом введении

Контроль			Персин 2,5 мл/кг		
Номер	Масса	Время (с)		Масса	Время (с)
1 самец	40,0	1020	1 самец	40,0	1440
2 самец	44,0	1080	2 самец	43,0	1380
3 самец	44,2	1200	3 самец	46,0	1020
4 самец	46,0	960	4 самец	46,0	1200
5 самец	46,0	960	5 самец	44,0	1260
6 самка	33,0	1260	6 самка	34,0	1620
7 самка	33,0	1380	7 самка	34,0	1500
8 самка	35,0	1440	8 самка	33,0	1620
Среднее	40,2	1162,5	Среднее	40,0	1380*

\* - Установлено статистически достоверное различие времени гибели животных контрольной и опытной групп ( $p<0,05$ ).

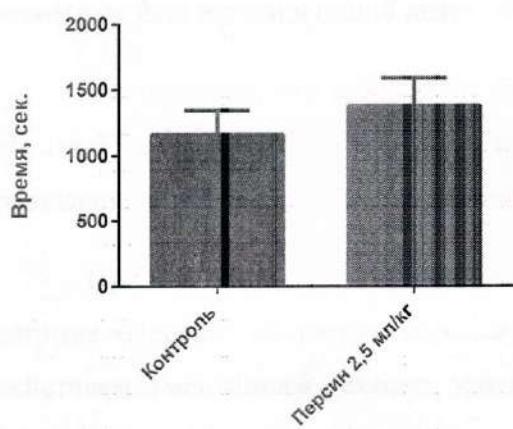


Рис.3. Влияние концентрата "Персин" на продолжительность жизни мышей в модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией при курсовом введении.

Концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика при курсовом введении проявил защитные свойства в модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией, увеличил продолжительность жизни животных на 19 %.

## Заключение

Объектом тестирования служил концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика, производства ООО «НПК Инфинити», дата изготовления 07.10.2017г. Изучение антиоксидантного действия было проведено по методике, изложенной в статье Marcocci, I., Marguire, J.J., Droy-lefaiz, M.T., Packer, L., 1994. The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 748–755. Методика адаптирована для изучения антиоксидантной активности продуктов, полученных из растительного сырья с использованием микропланшетного ридера.

Изучение антигипоксического действия было проведено в модели гипоксической гипоксии с гиперкардией согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Миронов А. Н. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Изучение мембраностабилизирующего действия было проведено на эритроцитах крови белых крыс в модели гипотонического гемолиза.

Концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика в опытах на животных был изучен в одной дозе.

Установлено, что концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика обладает антиоксидантным действием, вызывает уменьшение образования свободных радикалов до  $49,4 \pm 1,3\%$  в концентрации 8 мкл/мл и до  $38,6 \pm 2,2\%$  в концентрации 4 мкл/мл.

При изучении мембраностабилизирующего действия концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика на эритроцитах крови крыс установлено, что под его действием уменьшился гемолиз эритроцитов на  $21,4 \pm 0,2$  в концентрации 8 мкл/мл и на  $5,4 \pm 0,4\%$  в концентрации 4 мкл/мл.

При изучении антигипоксического действия концентрата безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика в модели гипоксической гипоксии с гиперкардией при курсовом применении установлено, что продолжительность жизни мышей увеличилась на 19%. При однократном применении антигипоксического действия не установлено.

Концентрат безалкогольного напитка «Персин» из листьев персика в использованных моделях показал наличие антиоксидантного, антигипоксического и мембраностабилизирующего действия.