

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТА
АНТОЦИАНОВОЙ КУКУРУЗЫ**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 421 группы

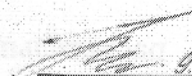
Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Барбарян Азнив Мхитаровны

Научный руководитель

Доцент кафедры генетики, к.б.н.

 9.06.17 Ю.А. Беляченко

Научный консультант

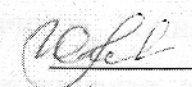
Профессор кафедры общей биологии,

фармакогнозии и ботаники СГМУ

им. В.И. Разумовского, д.б.н., профессор

 Н.В. Полуконова

Зав. кафедрой генетики, д.б.н., доцент

 9.06.17 О.И. Юдакова

Саратов 2017

Введение. Растительный мир представляет собой огромное царство автотрофных организмов, продуцирующих и поставляющих в среду природные органические соединения. Растения являются источником разнообразных биологически активных веществ, среди которых выделяют особую группу растительных метаболитов – флавоноиды.

Как и другие фенольные вещества, флавоноиды связывают свободные радикалы. Эти соединения обладают широким спектром физиологического и биохимического действия на живые организмы. Известны их антиоксидантные, противоопухолевые, антимуtagenные и противовирусные свойства, а также Р-витаминная активность.

Флавоноиды являются постоянными компонентами продуктов питания человека. В связи с этим исследование их влияния на организм представляет огромный интерес. В частности, изучение терапевтических эффектов флавоноидов актуально для профилактической медицины.

Цель настоящей работы – изучение влияния экстрактов различных форм антоциановой и зеленой кукурузы на закономерности изменения массы тела и массы органов белых лабораторных крыс на фоне кахексии, вызываемой развитием перевиваемой опухоли печени РС-1.

Задачи:

- 1) заготовка растительного сырья кукурузы диплоидной линии Пурпурная Саратовская (ПС), тетраплоидной пурпурной и зеленой формы;
- 2) получение сухих экстрактов по методу двойной спиртовой экстракции с последующим осаждением неполярных веществ хлороформом;
- 3) исследование наличия антикахексической активности для экстрактов различных форм кукурузы в эксперименте на белых лабораторных крысах с перевиваемой опухолью печени РС-1;

- 4) сравнение относительных показателей индекса массы различных внутренних органов в контроле и эксперименте при введении различных типов экстрактов.

Структура и объем работы. Работа изложена на 40 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 33 наименования.

Основное содержание работы. Объектами исследования являлись:

1. Антоциановая линия кукурузы Пурпурная Саратовская (ПС), характеризующаяся сочетанием доминантных генов маркера «коричневый Саратовский», определяющих интенсивную темно-фиолетовую окраску растений. Установлено, что экстракт из кроющих листьев початков содержит флавоноиды и обладает выраженным антимикробным действием и антимутагенными свойствами, не токсичен для организма.
2. Тетраплоидная антоциановая форма, ведущая свое происхождение от гибрида тетраплоидной Краснодарской линии КрП1 и партеногенетической линии АТ1. Данная форма отличается от диплоидной более крупными размерами вегетативных и генеративных органов, более высоким ростом.
3. Зеленая тетраплоидная кукуруза, сходная по своему происхождению с антоциановым тетраплоидом. Родство двух разных тетраплоидных форм при отсутствии фенотипического сходства по окраске связано с тем, что в потомстве гибрида между КрП1 и АТ1 появлялись как пурпурные, так и зеленые растения, воспроизводство которых впоследствии осуществлялось на основе инбридинга.

Сырьем для получения экстрактов служили кроющие листья оберток початков. Их заготовка проводилась в сентябре (на стадии сбора урожая). Отбирался наиболее интенсивно окрашенный материал (для пурпурных форм) без видимых повреждений вредителями и плесенью. Кроющие листья

нанизывали на нитку и вывешивали в виде гирлянды или раскладывали на стеллажах тонким слоем.

Для извлечения биологически активных веществ применялась методика, основанная на спиртовой экстракции с последующим осаждением неполярных веществ хлороформом.

Исследование проводилось на 25 белых лабораторных крысах-самцах, массой 145 ± 60 г. Животные были разделены на 5 групп методом случайной выборки (по 5 крыс):

- 1) контрольная группа;
- 2) группа животных с внутримышечным введением экстракта диплоидной пурпурной кукурузы;
- 3) группа животных с внутримышечным введением экстракта тетраплоидной пурпурной кукурузы;
- 4) группа животных с внутримышечным введением экстракта тетраплоидной зеленой кукурузы;
- 5) группа животных с пероральным введением экстракта тетраплоидной пурпурной кукурузы.

Для оценки динамики изменения массы тела животных перед введением их в эксперимент проводилось их взвешивание и мечение.

Животным указанных групп проводилась подкожная имплантация (в области лопатки) 0,5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени – РС-1, полученного из банка опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Экстракт вводили ежедневно внутримышечно и перорально через 72 ч после перевивки опухоли; также ежедневно оценивали объем опухоли и массу животных.

Внутримышечное введение осуществлялось стерильными инсулиновыми шприцами поочередно в мышцы правых и левых задних лап животных.

Перед введением экстракта проводили его разведение стерильной дистиллированной водой (в соотношении 1 г экстракта на 1 мл воды). Дозу водного раствора экстракта рассчитывали ежедневно для каждого животного, исходя из определения его массы. Таким образом, достигали постоянства концентрации действующего агента на грамм массы животного (из расчета 350 мг экстракта на 1 кг массы тела крысы).

По окончании опыта крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего исследования проводили забор органов и опухолей.

На основе расчетов определялись следующие параметры:

1. Объем опухоли $V = x \cdot y \cdot z$, где x, y, z – линейные размеры опухоли;
2. Плотность опухоли $\rho = m' / V'$, где m' и V' – масса и объем опухоли по результатам вскрытия;
3. Теоретическая масса опухоли $m_c = V \cdot \rho$, где V – объем опухоли, ρ – плотность опухоли;
4. Истинная масса тела животного $m_r = m_a - m_c$, где m_a – масса животного, m_c – масса опухоли;
5. Дельта истинной массы тела животного $\Delta m_r = m_r - m_b$, где m_r – истинная масса животного в определенный момент времени, m_b – масса тела животного на начало эксперимента.
6. Индекс массы органа $K = m_o / m_a \times 100\%$, где m_o – масса соответствующего органа (или органов, в случае их парности), m_a – масса тела животного.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных выполнялась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни и дисперсионного анализа в программе Statistica 6.0.

Динамика изменения средней фактической массы тела животных (по группам) в ходе эксперимента показана на рисунке 1. Анализ приведенных на рисунке усредненных графиков показывает, что во всех группах наблюдается тенденция к увеличению средней массы тела животных. Наибольшие колебания средней массы тела животных заметны при

внутримышечном введении диплоидного экстракта пурпурной кукурузы и в контрольной группе. Наименьшие колебания средней массы тела животных наблюдались при внутримышечном введении тетраплоидного экстракта зеленой кукурузы.

Следует отметить, что, поскольку фактическая масса тела складывается из так называемой истинной массы тела и массы опухоли, наблюдаемое нами увеличение данного показателя может быть связано не только с ростом животного, но и увеличением размера опухоли.

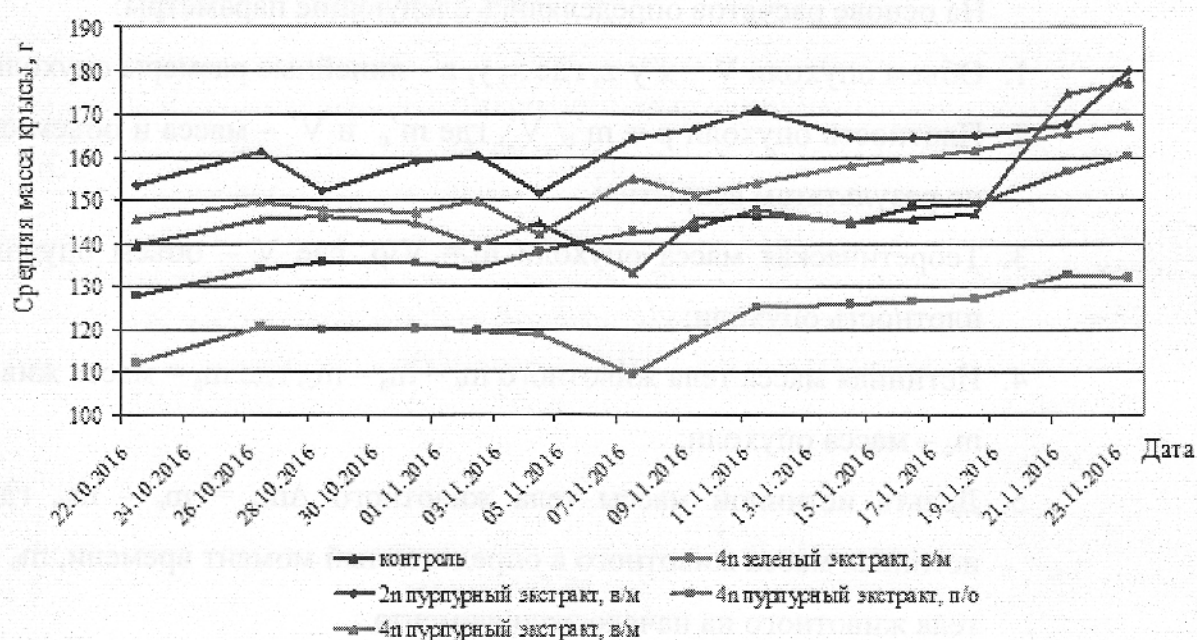


Рисунок 1 – Динамика изменения средней массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении различных типов экстрактов кукурузы

Более наглядным способом выражения изменений массы животных в ходе эксперимента является использование показателя дельты средней массы тела крыс (рисунок 2). Этот показатель в динамике подтверждает указанную тенденцию к увеличению массы тела крыс в ходе эксперимента во всех группах сравнения.

При этом следует отметить, что при использовании критерия Манна-Уитни на момент завершения эксперимента выявлены достоверные различия

по дельте фактической массы тела только между с контролем и группой животных, получавших экстракт диплоидной пурпурной кукурузы внутримышечно ($U = 1,00$, $Z = 2,02$, $p = 0,04$).

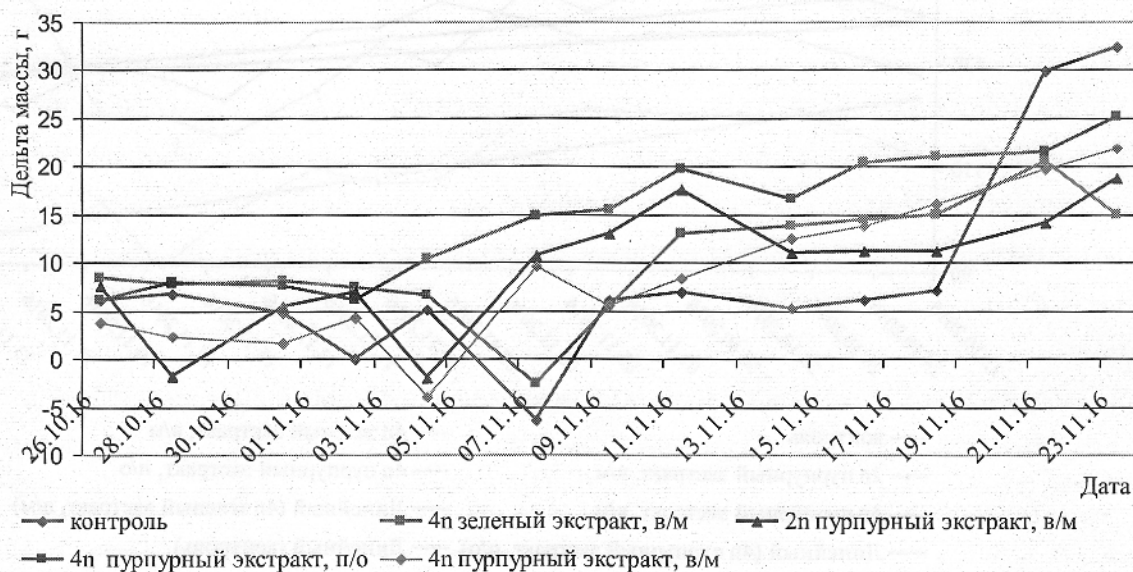


Рисунок 2 – Динамика изменения дельты средней массы крыс с переносимой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении различных типов экстрактов кукурузы

Для более адекватной оценки тенденций в изменении веса животных нами применялся еще один параметр. Показатель истинной массы тела представляет величину, отражающую скорректированную массу тела животного, за вычетом массы опухоли, для которой может быть характерна своя собственная динамика изменения размера веса, не совпадающая с таковой для массы тела крыс.

Изменения указанного параметра в ходе эксперимента представлены на рисунке 3, где представлены не только графики изменения средней истинной массы крыс по группам, но и соответствующие линии тренда, позволяющие получить более четкое и обобщенное представление о тенденциях изменения истинной массы тела животных. Линии тренда были построены автоматически в программе MS Excel 2003.



Рисунок 3 – Динамика изменения средней истинной массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении различных типов экстрактов кукурузы

Сопоставление угловых коэффициентов линий тренда, показывает, что крысы в контрольной группе, а также в случае внутримышечного введения экстракта зеленой тетраплоидной кукурузы значительно теряют в весе, при наблюдасом увеличении массы опухоли. Однако, судя по соответствующим линиям графиков, в конце эксперимента в контроле присутствует некоторая тенденция к набору веса. У животных экспериментальных групп, получавших препараты пурпурных экстрактов, кахексия проявляется в меньшей степени.

Наименьшие колебания средней массы тела животных наблюдаются при внутримышечном введении экстракта тетраплоидной пурпурной кукурузы. Линия тренда в этом случае характеризует тенденцию к набору веса животными данной экспериментальной группы, что позволяет говорить

о выраженном антикахексическом действии экстракта антоциановой тетраплоидной формы кукурузы при внутримышечном способе его введения. При этом, как показывают наши исследования, пероральный способ введения идентичного типа экстракта не является достаточно эффективным.

С применением критерия Манна-Уитни на момент завершения эксперимента у животных, получавших экстракт зеленой тетраплоидной кукурузы внутримышечно, выявлены достоверно более низкие значения истинной массы тела по сравнению с контрольной группой ($U = 1,00$, $Z = 2,02$, $p = 0,04$).

На рисунке 4 представлена динамика изменения дельты (фактически – прироста относительно исходного значения) средней истинной массы крыс в испытываемых группах во время проведения эксперимента.

В начале эксперимента во всех группах животных наблюдалось резкое увеличение дельты истинной массы тела, которое постепенно, через ряд колебаний значений этой величины, сменялось обратной тенденцией. Наиболее четко эта тенденция прослеживается в контрольной группе и варианте внутримышечного введения экстракта зеленой тетраплоидной кукурузы. Введение животным экстрактов пурпурной кукурузы в той или иной степени (в зависимости от варианта) препятствует прогрессированию кахексического эффекта. Наименьшие колебания средней массы тела животных наблюдаются при внутримышечном введении экстракта тетраплоидной пурпурной кукурузы.

Другим элементом нашего исследования являлось сопоставление массы органов в контроле с экспериментальными значениями. Масса органов была выражена в виде относительного показателя индекса массы органа (К), рассчитываемого как отношение массы органа (или органов, в случае их парности) к массе тела животного, выраженного в процентах.

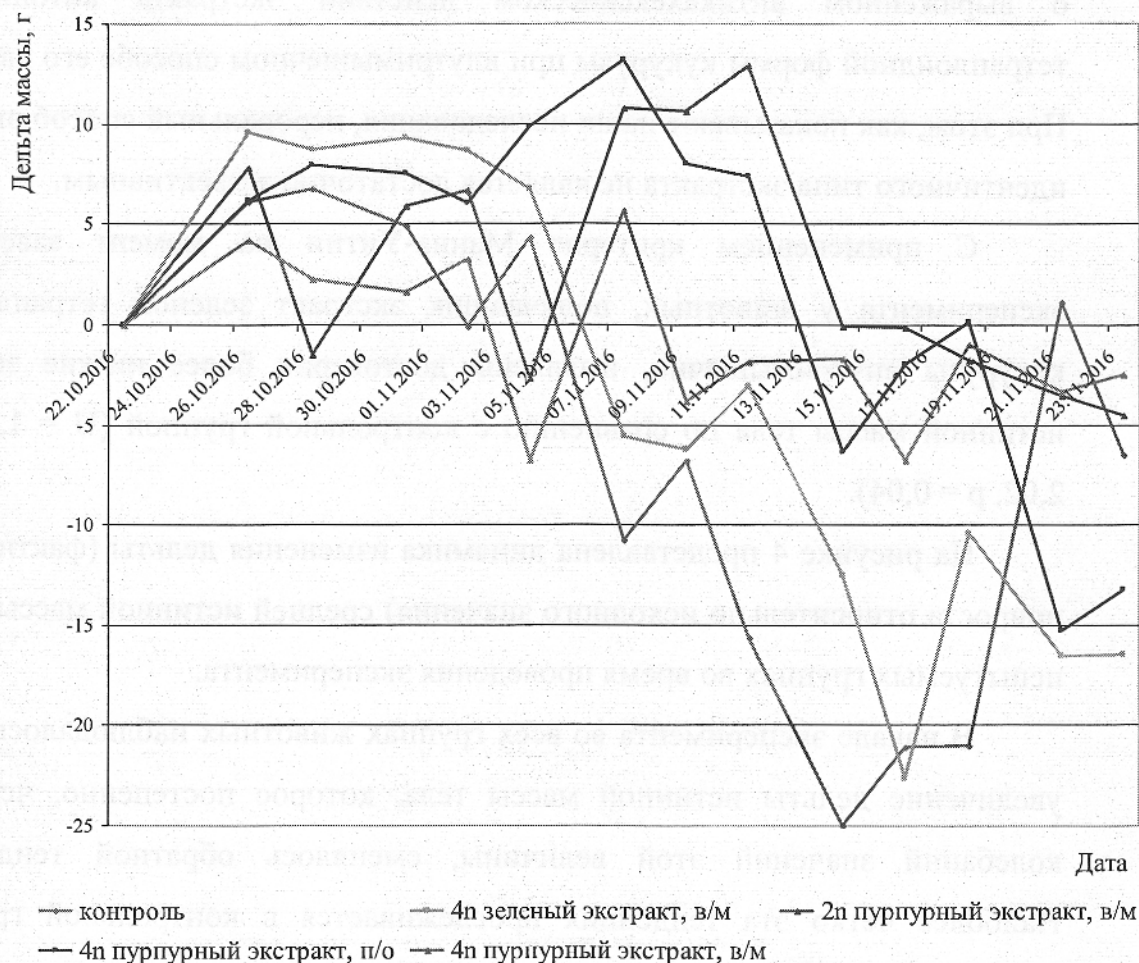


Рисунок 4 – Динамика изменения дельты средней истинной массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении различных типов экстрактов кукурузы

Было сделано заключение о том, что введение разных видов антоциановых экстрактов, полученных из растений разной ploидности и генетической конституции, внутримышечным и пероральным способом может сопровождаться изменением относительной массы различных органов (почек, печени, легких). При этом наибольшее число достоверных различий с контролем характеризует вариант внутримышечного введения экстракта антоциановой диплоидной кукурузы линии ПС.

Выводы:

1. Экстракт тетраплоидной антоциановой кукурузы при внутримышечном введении проявляет в эксперименте на белых лабораторных крысах с перевиваемой опухолью печени РС-1 антиапоптозное действие.
2. Экстракты тетраплоидной зеленой формы кукурузы и пурпурной диплоидной линии ПС при внутримышечном введении, а также экстракт антоциановой тетраплоидной кукурузы при пероральном введении не оказывают антиапоптозного действия.
3. Внутримышечное и пероральное введение экстрактов антоциановых форм кукурузы крысам с перевиваемой опухолью печени РС-1 может сопровождаться изменениями относительных показателей (индекса) массы различных внутренних органов, в частности, почек, печени и легких.

