

УДК 615.43

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2024.38.83.009>

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО *OROSTACHYS SPINOSA* НА ВЫРАБОТКУ УСЛОВНЫХ РЕФЛЕКСОВ С ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ ПОДКРЕПЛЕНИЕМ У БЕЛЫХ КРЫС

Я.Г. Разуваева, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, г. Улан-Удэ, tatur75@mail.ru

Е.А. Баяндуева, аспирант, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, г. Улан-Удэ, baunduev@mail.ru

А.А. Торопова, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, г. Улан-Удэ, anyuta-tor@mail.ru

И.Г. Николаева, доктор фарм. наук, доцент, старший научный сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, г. Улан-Удэ, i-nik@mail.ru

В экспериментах на белых крысах Wistar исследовали влияние экстракта сухого *Orostachys spinosa* на выработку условных рефлексов с отрицательным подкреплением. Установлено, что условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) сформировался у 100% интактных животных, получавших экстракт *O. spinosa* в дозе 100 мг/кг. На 3-и сутки УРПИ сохранился у 81 и 69% животных, которым вводили экстракт *O. spinosa* в дозах 100 и 200 мг/кг. Экстракт *O. spinosa* в дозах 100 и 200 мг/кг способствует выработке условного рефлекса активного избегания (УРАИ), снижая количество проб, затраченных на обучение, на 26 и 17% соответственно по сравнению с таковым у контрольных животных. Исследуемый экстракт в дозе 100 мг/кг на фоне острой гипоксии способствует выработке и сохранности УРПИ через 24 и 72 часа у 100 и 86% животных.

Ключевые слова: *Orostachys spinosa* (L.) Sweet., экстракт сухой, условный рефлекс пассивного избегания, условный рефлекс активного избегания, гипоксия, белые крысы

Горноколосник колючий (*Orostachys spinosa* (L.) Sweet.) – многолетнее травянистое растение из семейства Crassulaceae, имеющее достаточно большой ареал произрастания как в России, так и в других странах Евразии [1,2]. В надземной части растения установлено наличие аминокислот, дубильных веществ, флавоноидов, кумаринов, полисахаридов [3], а также идентифицированы жирные кислоты, фитостерины и алканы [4]. Траву *O. spinosa* применяют в тибетской медицине при заболеваниях почек, гастроэнтеритах, коликах, рожистых воспалениях и в качестве ранозаживляющего средства [5]. В монгольской медицине сок растения используется для лечения кожных заболеваний – экземы и лишая [6]. В народной медицине настой травы *O. spinosa* применяют при эпилепсии и как успокаивающее при нервных расстройствах [2,7]. По данным экспериментальных исследований, жидкий экстракт из *O. spinosa* снижает у животных уровень тревожности, улучшает исследовательскую активность [8,9],

обладает антигипоксическими и стресс-протективными свойствами [10,11].

На основании вышесказанного из надземной части *O. spinosa* было разработано новое средство в виде экстракта сухого, отличающееся постоянством состава, способ получения которого запатентован [12].

Цель исследования: оценить влияние экстракта сухого *O. spinosa* на выработку условных рефлексов с отрицательным подкреплением у белых крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на белых крысах Wistar обоего пола массой 200–240 г. Содержание животных и проведение экспериментов соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и приказу МЗ РФ №199Н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Животные распределялись по группам случайно. Эксперименты проведены в соответствии с действующими требованиями, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [12].

Объектом исследования явился экстракт сухой, полученный из надземной части *O. spinosa* путем последовательной трехкратной экстракции измельченного сырья 10% этиловым спиртом при температуре 60°C, при соотношении растительного материала и экстрагента 1:12 в течение 30 минут каждый контакт фаз, с последующей фильтрацией, упариванием и вакуумной сушкой. Стандартизация экстракта осуществляется по содержанию суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту, которых должно быть не менее 3,0%. Экстракт сухой в дозах 50, 100 и 200 мг/кг в форме водного раствора вводили внутрижелудочно животным опытных групп в течение 14 дней до начала экспериментов. В качестве препарата сравнения использовали экстракт *Ginkgo biloba*

в дозе 100 мг/кг, который вводили по аналогичной схеме с исследуемым экстрактом.

На 14-е сутки, через 30 минут после последнего введения исследуемых средств, у животных вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Через 1, 24 и 72 часа после обучения определяли количество животных с сохранившимся рефлексом и латентный период (время захождения в темный отсек установки) [13]. Во второй серии экспериментов с 10-х по 14-е сутки у животных вырабатывали условный рефлекс активного избегания (УРАИ) через 30 минут после введения исследуемых средств. Подсчитывали общее количество проб, затраченных на обучение. Критерием обучения служили пять правильных пробежек подряд.

В третьей серии экспериментов после выработки УРПИ животных помещали в герметическую емкость (объем 1 л) до агонального дыхания. О влиянии экстракта *O. spinosa* на процессы памяти судили по количеству животных с сохранившимся рефлексом и латентному периоду через 1, 24 и 72 часа после гипоксического воздействия.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Для анализируемых признаков предварительно оценивали соответствие закону нормального распределения по критерию Шапиро – Уилка. Достоверность различий между контрольной и опытными группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Для сравнения количества животных с сохранившимся условным рефлексом в контрольных и опытных группах применяли критерий Фишера. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что УРПИ сформировался у большин-

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *O. spinosa* НА ВЫРАБОТКУ И СОХРАННОСТЬ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ У БЕЛЫХ КРЫС

| Группы животных | Показатели | | |
|--|-------------|-------------|-------------|
| | 1 час | 24 часа | 72 часа |
| Количество животных с сохранившимся условным рефлексом / количество животных в группе | | | |
| Интактный контроль (H ₂ O) | 12/14 | 6/14 | 5/14 |
| Экстракт <i>O. spinosa</i> , 50 мг/кг | 10/14 | 7/14 | 5/14 |
| Экстракт <i>O. spinosa</i> , 100 мг/кг | 16/16 | 15/16* | 13/16* |
| Экстракт <i>O. spinosa</i> , 200 мг/кг | 14/16 | 12/16* | 11/16* |
| Экстракт <i>G. biloba</i> , 100 мг/кг | 13/14 | 12/14* | 12/14* |
| Латентный период, с | | | |
| Интактный контроль (H ₂ O) | 170,0±9,52 | 125,9±16,79 | 96,1±22,69 |
| Экстракт <i>O. spinosa</i> , 50 мг/кг | 151,1±14,31 | 135,6±17,07 | 84,0±25,57 |
| Экстракт <i>O. spinosa</i> , 100 мг/кг | 180,0±0,00 | 176,3±1,30* | 168,1±4,77* |
| Экстракт <i>O. spinosa</i> , 200 мг/кг | 160,6±12,49 | 149,4±14,51 | 144,7±17,65 |
| Экстракт <i>G. biloba</i> , 100 мг/кг | 174,3±3,68 | 161,1±11,27 | 157,9±13,18 |

* Различия статистически значимы между контрольной и опытной группами при $p \leq 0,05$.

ства животных контрольной и опытных групп; и в 100% случаях в опытной группе, животные которой получали экстракт *O. spinosa* в дозе 100 мг/кг.

Тестирование белых крыс через 24 и 72 часа показало, что на фоне введения экстракта *O. spinosa* в дозе 200 мг/кг УРПИ сохранился у 75 и 69% животных соответственно. Наиболее существенное влияние на когнитивные функции, сопоставимое с таковым у препарата сравнения, исследуемый экстракт оказывал в дозе 100 мг/кг. Так, в данные сроки тестирования УРПИ сохранялся у 94 и 81% животных опытной группы, а латентный период был выше на 28 и 64% соответственно такового в контроле.

При проверке выработки УРАИ установлено, что введение животным экстракта

O. spinosa в дозах 100 и 200 мг/кг снижает количество проб, затраченных на обучение, на 26 и 17% соответственно, экстракта *G. biloba* в дозе 100 мг/кг – на 21% по сравнению с таковым у контрольных животных (рис. 1).

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что помещение животных в герметический сосуд до появления агонального дыхания способствует снижению у них процессов консолидации и воспроизведение памятного следа. На фоне введения экстрактов *O. spinosa* и *G. biloba* в дозе 100 мг/кг УРПИ сохранился у 100% животных в II и IV опытных группах через 1 час и 24 часа, тогда как в контрольной и I опытной группе – только у 10 из 14 животных. Латентный период у животных данных опытных групп был выше контрольных показателей в среднем на 20 и 25% ($p \leq 0,05$)

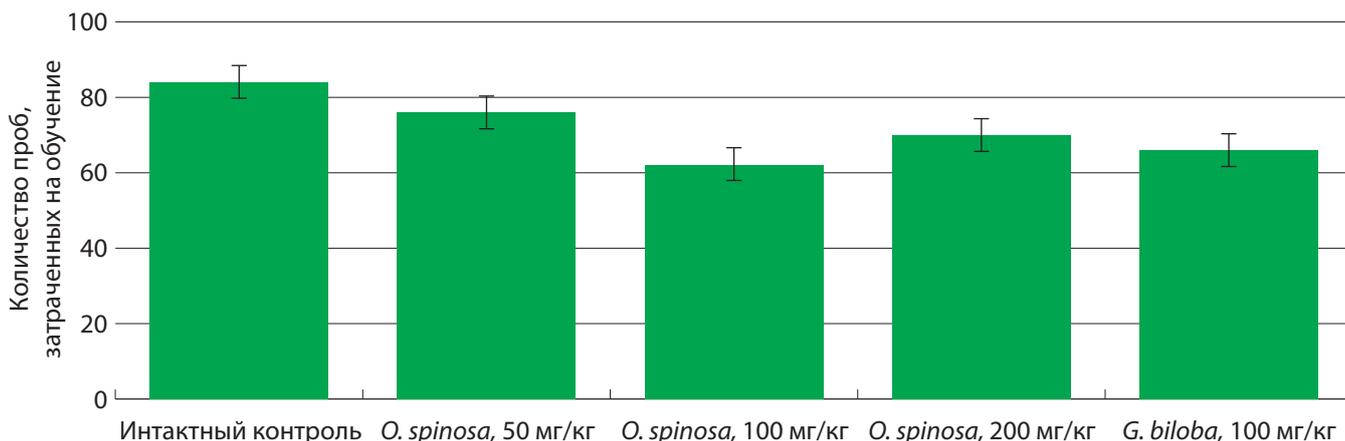


РИС. 1. Влияние экстракта *O. spinosa* на выработку условной реакции активного избегания у белых крыс

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *O. SPINOSA* НА СОХРАННОСТЬ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ У БЕЛЫХ КРЫС НА ФОНЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

| Группы животных | Показатели | | |
|--|-------------|-------------|-------------|
| | 1 час | 24 часа | 72 часа |
| Количество животных с сохранившимся условным рефлексом / количество животных в группе | | | |
| Контрольная (гипоксия + H ₂ O) | 10/14 | 10/14 | 6/14 |
| Опытная I (гипоксия + экстракт <i>O. spinosa</i> , 50 мг/кг), n=14 | 10/14 | 10/14 | 8/14 |
| Опытная II (гипоксия + экстракт <i>O. spinosa</i> , 100 мг/кг), n=14 | 14/14* | 14/14* | 12/14* |
| Опытная III (гипоксия + экстракт <i>O. spinosa</i> , 200 мг/кг), n=14 | 12/14 | 12/14 | 10/14 |
| Опытная IV (гипоксия + экстракт <i>G. biloba</i> , 100 мг/кг), n=14 | 14/14* | 14/14* | 10/14 |
| Латентный период, с | | | |
| Контрольная (гипоксия + H ₂ O), n=14 | 144,3±17,71 | 134,0±22,82 | 93,0±25,89 |
| Опытная I (гипоксия + экстракт <i>O. spinosa</i> , 50 мг/кг), n=14 | 149,4±15,16 | 143,6±18,07 | 127,3±20,80 |
| Опытная II (гипоксия + экстракт горно-колосника колючего, 100 мг/кг), n=14 | 180,0±0,0* | 180,0±0,0* | 171,4±5,10* |
| Опытная III (гипоксия + экстракт <i>O. spinosa</i> , 200 мг/кг), n=14 | 164,1±9,44 | 159,1±12,41 | 142,1±18,78 |
| Опытная IV (гипоксия + экстракт <i>G. biloba</i> , 100 мг/кг), n=14 | 180,0±0,0* | 180,0±0,0* | 141,3±19,13 |

* Различия статистически значимы между контрольной и опытной группами при p ≤ 0,05

ВЫВОДЫ

соответственно срокам наблюдения. На третьи сутки эксперимента условный рефлекс отмечался у 71% животных в III и IV опытных группах; латентный период у них был выше в 1,5 раза такового у контрольных животных. Наиболее значимое влияние на сохранность УРПИ в отдаленные сроки проявлял экстракт *O. spinosa* в дозе 100 мг/кг. Так, через 72 часа УРПИ сохранился у 86% ($p \leq 0,05$) животных в II опытной группе; латентный период у них был в 1,8 раза выше такового в контроле.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экстракт *O. spinosa* способствует ускорению выработки условных рефлексов как у интактных животных, так и на фоне гипоксического состояния, а также сохранности следовой памяти в отдаленные после обучения сроки, что согласуется с результатами других исследователей, показавших, что жидкий экстракт этого растения проявляет мнемоторный эффект [9]. Выявленный фармакологический эффект экстракта *O. spinosa* обусловлен содержанием в его составе биологически активных веществ, влияние которых на функциональное состояние центральной нервной системы подтверждено многочисленными исследованиями. Так, показано, что флавоноид мирицетин, идентифицированный в *O. spinosa*, улучшает обучение и нарушения памяти у животных, вызванные стрептозотоцином [14], D-галактозой [15] и скополамином [16,17]. Введение мирицетина способствует улучшению пространственной памяти в водном лабиринте Морриса на фоне хронического стресса за счет снижения уровня АКТГ в плазме крови и увеличения экспрессии BDNF в гиппокампе [18]. Аналогичное действие на нервную систему проявляет идентифицированный в *O. spinosa* флавоноид лютеолин-7-глюкозид [19–21]. Значимое влияние на когнитивные функции оказывают аминокислоты [22–24], содержащиеся в значительном количестве в *O. spinosa* [3].

1. Экстракт сухой *O. spinosa* в дозах 100 и 200 мг/кг способствует ускорению выработки условных рефлексов с отрицательным подкреплением у интактных животных, а также сохранности УРПИ в отдаленные сроки.

2. Экстракт сухой *O. spinosa* способствует нормализации когнитивных функций у лабораторных животных на фоне острой гипоксии.

Исследования проведены в рамках выполнения темы госзадания по проекту FWSM-2021-0005 (№ госрегистрации 121030100227-7).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бялт В.В. Монография рода Горноколосник (*Orostachys Fisch., Crassulaceae*): дисс. ... канд. биол. наук. – СПб., 1999. – 290 с.
2. Буданцев А.Л., Лесиовская Е.Е. Дикорастущие полезные растения России. – СПб: СПФХА, 2001. – 663 с.
3. Николаева И.Г., Цыбиктарова Л.П., Николаева Г.Г., Манжигеев П.Г. Фитохимическое исследование надземной части горноколосника колючего // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2018. – №4(22). – С. 52–56.
4. Nikolaeva I.G., Tsybiktarova L.P., Taraskin V.V., Radnaeva L.D., Tykheev Zh.A., Nikolaeva G.G., Manzhigeev P.G. Lipids from *Orostachys spinosa* // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2018. – Vol. 54(5). – P. 961–963. DOI: 10.1007/s10600-018-2522-9
5. Шретер А.И. Лекарственная флора Советского Дальнего Востока. – М.: Медицина, 1975. – 328 с.
6. Хайдав Ц., Алтанчимэг Б., Варламива Т.С. Лекарственные растения в монгольской медицине. – Улан-Батор, 1985. – 390 с.
7. Телятьев В.В. Полезные растения Центральной Сибири. – Иркутск: Восточно-

- Сибирское книжное издательство, 1985. – 384 с.
8. Левента А.И., Одинец А.Д., Охремчук Л.В., Усов Л.А. Влияние извлечений из горноколосника и рододендрона Адамса на поведенческие реакции лабораторных животных // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2010. – Т. 95, №4. – С. 103–105.
 9. Усов Л.А., Левента А.И., Одинец А.Д. Анксиолитические и мнемотропные эффекты извлечений из горноколосника и рододендрона Адамса в эксперименте на лабораторных животных // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2010. – Т. 96, №5. – С. 125–128.
 10. Одинец А.Д., Левента А.И., Щукин Д.А., Шабатурова О.В. К антигипоксическому действию препаратов из растительного сырья Байкальской Сибири // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – Т. 104, №5. – С. 112–115.
 11. Одинец А.Д., Усов Л.А., Изатулин А.В., Левента А.И., Шабатурова О.В. Влияние препаратов из горноколосника колючего и рододендрона Адамса на течение стресс-реакции экспериментальных животных // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – 76(6), часть 1. – С. 175–181.
 12. Способ получения средства, обладающего нейтропротективной, иммуномодулирующей активностью: пат. 2784435 / Николаева И.Г., Хобракова В.Б., Разуваева Я.Г., Николаева Г.Г., Николаев С.М., Цыбиктарова Л.П., Торопова А.А., Баяндуева Е.А.; заявитель и патентообладатель ФГБУН ИОЭБ СО РАН. – №022113385; заявл. 18.05.2022; опубл. 25.11.2022. Бюлл. №33.
 13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
 14. Li J., Xiang H., Huang C., Lu J. Pharmacological actions of myricetin in the nervous system: A comprehensive review of preclinical studies in animals and cell models // *Front. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – 797298. DOI: 10.3389/fphar.2021.797298
 15. Lei Y., Chen J., Zhang W., Fu W., Wu G., Wei H., Wang Q., Ruan J. In vivo investigation on the potential of galangin, kaempferol and myricetin for protection of d-galactose-induced cognitive impairment // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 135(4), 702–2707. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.043
 16. Ramezani M., Darbandi N., Khodaghali F., Hashemi A. Myricetin protects hippocampal CA3 pyramidal neurons and improves learning and memory impairments in rats with Alzheimer's disease // *Neural. Regen. Res.* – 2016. – Vol. 11(12). – P. 1976–1980. DOI: 10.4103/1673-5374.197141
 17. Wang B., Zhong Y., Gao C., Li J. Myricetin ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice via inhibiting acetylcholinesterase and down-regulating brain iron // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 490(2). – P. 336–342. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.045
 18. Wang Q.M., Wang G.L., Ma Z.G. Protective effects of myricetin on chronic stress-induced cognitive deficits // *Neuroreport.* – 2016. – Vol. 27(9). – P. 652–658. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000591
 19. Ashaari Z., Hadjzadeh M.A., Hassanzadeh G., Alizamir T., Yousefi B., Keshavarzi Z., Mokhtari T. The flavone luteolin improves central nervous system disorders by different mechanisms: A review // *J.Mol. Neurosci.* – 2018. – Vol. 65(4). – P. 491–506. DOI: 10.1007/s12031-018-1094-2
 20. Kou J.J., Shi J.Z., He Y.Y., Hao J.J., Zhang H.Y., Luo D.M., Song J.K., Yan Y., Xie X.M., Du G.H., Pang X.B. Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2022 – Vol. 43(4). – P. 840–849. DOI: 10.1038/s41401-021-00702-8
 21. Kwon Y. Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's

- disease // *Exp. Gerontol.* – 2017. – Vol. 95. – P. 39–43. DOI: 10.1016/j.exger.2017.05.014
22. Glenn J.M., Madero E.N., Bott N.T. Dietary protein and amino acid intake: links to the maintenance of cognitive health // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1315. DOI: 10.3390/nu11061315
23. Tran P.V., Nguyen L.T.N., Yang H., Do P.H., Torii K., Putnam G.L., Chowdhury V.S., Furuse M. Intra-cerebroventricular injection of L-arginine and D-arginine induces different effects under an acute stressful condition // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2020. – Vol. 533(4). – P. 965–970. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.111
24. Zhu Y., Wang R., Fan Z., Luo D., Cai G., Li X., Han J., Zhuo L., Zhang L., Zhang H., Li Y., Wu S. Taurine alleviates chronic social defeat stress-induced depression by protecting cortical neurons from dendritic spine loss // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2023. – Vol. 43(2). – P. 827–840. DOI: 10.1007/s10571-022-01218-3

EFFECT *OROSTACHYS SPINOSA* DRY EXTRACT ON CONDITIONAL REFLEXES PRODUCTION WITH NEGATIVE REINFORCEMENT IN WHITE RATS

Ya.G. Razuvaeva, E.A. Bayandueva, A.A. Toropova, I.G. Nikolaeva

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

*The effect of *Orostachys spinosa* dry extract on conditioned reflexes production with negative reinforcement was studied in experiments on Wistar rats. It was found that the conditioned passive avoidance reflex (CPAR) was formed in 100% of intact animals treated with *O. spinosa* extract at a dose of 100 mg/kg. On day 3, CPAR remained in 81 and 69% of the animals that were injected with *O. spinosa* extract at doses of 100 and 200 mg/kg. *O. spinosa* extract at doses of 100 and 200 mg/kg promotes the development of a conditioned active avoidance reflex, reducing the trials spent number on training by 26 and 17%, respectively, compared with that in control animals. The studied extract at a dose of 100 mg/kg contributes to the development and preservation of CPAR after 24 and 72 hours in 100 and 86% of animals against the background of acute hypoxia.*

Keywords: *Orostachys spinosa* (L.) Sweet., dry extract, Passive Avoidance Learning Test, active Avoidance Learning Test, hypoxia, white rats