

На правах рукописи

Зорикова Светлана Петровна

Рейнутрия японская (*Reynoutria japonica* Houtt.) в Приморском крае
(биология развития, флавоноидный состав, биологическая активность)

03.02.14 – биологические ресурсы

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток
2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Горнотаежной станции им.
В.Л. Комарова Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель: доктор сельскохозяйственных наук, профессор
Гуков Геннадий Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Денисов Николай Иванович

кандидат биологических наук
Волкова Светлана Андреевна

Ведущая организация: Институт комплексного анализа региональных
проблем ДВО

Защита диссертации состоится "11" мая 2011 г. в 10 часов на заседании диссертационного
совета Д 005.005.02 в Учреждении Российской академии наук Тихоокеанском институте
биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690022, г.
Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН.

Тел.: 8(4232)31-14-09
Факс: 8(4232)31-40-50
E-mail: komand@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО
РАН Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток, пр-т.
100 лет Владивостоку, 159). Текст автореферата размещен на сайте совета
<http://www.piboc.dvo.ru>

Автореферат разослан

_____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук, доцент



Н.А. Командрова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Изучение биологии развития представляет большой теоретический и практический интерес в исследовании растений-интродуцентов. Особое место занимает изучение вторичных метаболитов и связанной с ними биологической активности. Биохимический подход к изучению внутривидового полиморфизма - важный критерий для отбора хозяйственно ценной популяции. В наборе видов для культуры лекарственных растений определяющим признаком является высокое содержание действующих веществ, аккумуляция которых в органах растений происходит во взаимосвязи с участием этих соединений в ключевых для жизнедеятельности растений процессах. Большой интерес вызывает участие фенольных соединений в стресс-реакциях и обеспечении устойчивости растений к экстремальным условиям среды. Они проявляют защитные функции в растениях, подвергнутых воздействию неблагоприятных факторов, являются эндогенными регуляторами физиологических процессов негормональной природы [Судачкова и др., 1997; Жиров и др., 2007]. Изменение уровня накопления полифенолов может быть использовано для сравнительной характеристики жизнестойкости растений в природной среде обитания и в условиях интродукции. Все эти вопросы приобретают определенную ценность в исследованиях в области ботанического ресурсоведения.

Одним из потенциальных сырьевых растений, обладающего лекарственным, ремедиационным и декоративным свойствами, является рейнутрия японская *Reynoutria japonica* Houtt (*Polygonum cuspidatum* Siebold et Zucc.) семейства Гречиховые (*Polygonaceae*). В России встречается также *R. × bohemica* Chrték et Chrtéková - Р. богемская. Это растение у нас до сих пор малоизвестно, обычно его не отличают с *R. japonica* [Майоров, 2002], но оно характерно для многих регионов мира [Zika, Jacobson, 2003]. В руководстве по биологическому контролю за инвазионными растениями востока США под названием *R. japonica* помещена фотография *R. × bohemica* [Shaw, Seiger, 2002]. Естественный ареал *R. japonica* нуждается в дополнительном изучении. Корейские и японские растения описаны под названием *R. forbesii* (Hance) Yamazaki (*fallopia forbesii* (Hance) Yonekura et H. Ohashi). Исследованиями корейских ботаников подтверждено морфологическое своеобразие корейских популяций: листья *R. forbesii* относительно более широкие, почти овальные [Kim, Park, 2000]. Однако, во «Flora of China» *R. forbesii* включена в состав рода *Fallopia*, и ареал ее ограничен Кореей и Китаем [Anjen, Park, 2003a]. Не вполне ясно, произрастает ли *R. japonica* s. str. в диком состоянии на российском Дальнем Востоке, в Корее и каково распространение вида в Китае. Отсутствие сведений по биологии *R. japonica* в зоне естественного ареала, а также практически

полное отсутствие исследований этого вида в Приморье и на Дальнем Востоке, определили цель нашей работы.

Цель и задачи. Цель работы – выявление взаимосвязи условий произрастания, динамики развития, накопления биологически-активных веществ в сырье *R. japonica* на основе комплексного анализа культурной популяции в условиях различной антропогенной нагрузки.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

- 1) исследовать динамику развития *R. japonica* в условиях урбанистической нагрузки;
- 2) изучить морфологические механизмы адаптации *R. japonica* в условиях урбанистической нагрузки;
- 3) изучить биохимические механизмы адаптации *R. japonica* в условиях урбанистической нагрузки;
- 4) исследовать особенности биологии размножения *R. japonica* в условиях минимального антропогенного воздействия;
- 5) исследовать биологическую активность суммы вторичных метаболитов *R. japonica*.

Научная новизна.

- впервые проведено изучение популяции *R. japonica* в условиях различного уровня антропогенного воздействия.
- изучены механизмы адаптации *R. japonica* в условиях техногенного стресса.
- установлено количественное содержание флавоноидов в надземной части («траве») растения.
- даны обоснования к применению препаратов из *R. japonica* в качестве протектора семян и проростков против биотических и абиотических стрессовых факторов.
- показана эффективность применения препаратов из *R. japonica* в качестве анксиолитического и антиоксидантного средства.

Практическая ценность. Выявлен источник сырья для препаратов с фитопротекторным, анксиолитическим, антиоксидантным действием. На основании проведенных исследований определены ресурсно-фитохимические параметры интродуцируемого растения и разработаны практические рекомендации по экологически ориентированному и устойчивому использованию изучаемого вида. Результаты исследования используются в учебном процессе и научных исследованиях кафедры

экологии и природопользования Владивостокского государственного университета экономики и сервиса.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на Всероссийской научной конференции «Состояние лесов Дальнего Востока и актуальные проблемы лесопользования» [Хабаровск, 2009]; 10-я международной очно-заочной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых исследователей «Интеллектуальный потенциал вузов - на развитие Дальневосточного региона и стран АТР» [Владивосток, 2008], 2-я международной конференции «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» [Казахстан, 2007]; Конференции молодых ученых [Улан-Удэ, 2007], 11-ой всероссийской конференции «Экосистемы, организмы, инновации» [Москва, 2009]; Актуальні проблеми ботаніки та екології. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (11-15 серпня 2009 р., м. Кременець). – Тернопіль: Підручники і посібники, 2009.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 8 научных работы, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка используемой литературы и приложения. Общий объем 135 страниц. Иллюстративный материал представлен 11 таблицами и 18 рисунками. Список используемой литературы включает 264 источников, в том числе 146 иностранных, 1 интернет-ресурс. В приложении представлены хроматограммы.

1. Обзор литературы. В главе приводятся данные по систематическому положению и экологической характеристике рейнутрии японской (*Reynoutria japonica* Houtt), естественному ареалу, морфологическим признакам, размножению и жизненному циклу, генетическим изменениям и вариабельности вида, природно-климатическим характеристиками районов исследования, интродукции и географическому распространению *R. japonica*, химическому составу и биологической активности флавоноидов.

2. Материалы и методы. В главе приводится объект исследования и описываются материалы и методы применяемые для его изучения.

Результаты и обсуждения

3. Механизм адаптации *R. japonica* в условиях урбанистической нагрузки

3.1 Прохождение фенологических фаз *R. japonica*, произрастающих в условиях различной урбанистической нагрузки

В настоящем исследовании наблюдали развитие *R. japonica* на двух интродукционных площадках: в условиях урбанистического загрязнения - г. Владивосток,

дендропарк Владивостокского государственного университета экономики и сервиса (ВГУЭС) и в условно чистом районе – Лесная опытная станция ДВО РАН (ЛОС ДВО РАН). Была апробирована посадка *R. japonica* отрезками корневищ. Закладка опытных участков была проведена осенью 2005 года. В первый год вегетации были проведены только визуальные наблюдения, в результате которых отмечено, что жизнеспособные всходы получены на обеих площадках. В 2005-2009 годы проведены фенологические наблюдения, отмечались даты наступления фенофаз при различных условиях обитания.

Отрастание *R. japonica* начинается в третьей декаде апреля, после прогревания почвы на глубину залегания почек возобновления. Вначале появляются молодые побеги в виде розовых или розово-белых проростков, через 3-7 дней обозначается стебель и появляется развернутая розетка листьев, и к третьей декаде мая происходит формирование травостоя. Необходимо отметить, что в условиях воздействия урбанистических факторов первые две фазы наблюдаются в более поздние сроки (сдвиг на 8-9 дней) но к фазе формирования куртины сроки практически выравнивались. Начальные фазы вегетации подвержены максимальной изменчивости: размах отклонения составляет 5-7 дней в обоих вариантах наблюдения. Это отражает неустойчивость температурных условий среды и высокую чувствительность растений к указанному фактору.

Начиная с фазы «бутонизация» наблюдается расхождение сроков наступления фаз в среднем на 7 дней для фаз, входящих в цикл цветения, и на 10 дней для фаз плодоношения. Помимо более поздних сроков прихода фенологических явлений, для *R. japonica*, произрастающей в агрессивной городской среде, характерны более широкие отклонения от средних показателей фенодат (3-8). Учитывая, что фазы «бутонизация», «цветение» и «плодоношение» проходят при устойчиво положительных температурах и, в основном, регулируются физиологическими механизмами, следует ожидать сокращения разброса фенодат, как наблюдается в варианте посадок на ЛОС ДВО РАН. Можно предположить что, наблюдаемая изменчивость показателя в варианте посадок в парке ВГУЭС, объясняется нарушениями физиологических механизмов растений, подверженных комплексу урбанистических загрязнений. Фаза «осеннего усыхания» не отмечалась ни в одном варианте в течение всего периода наблюдения. Вегетационный цикл заканчивался с наступлением заморозков.

3.2 Морфологические механизмы адаптации *R. japonica* в условиях урбанистической нагрузки

Проводились наблюдения за динамикой развития *R. japonica* в зависимости от условий произрастания. В первый год вегетации интенсивность роста растений в обоих

вариантах наблюдения сравнительно низкая. К концу вегетационного периода высота растений высаженных на ЛОС ДВО РАН, 47 см, а в дендропарке ВГУЭС - 28 см.

В течение второго года вегетации проводили морфометрические измерения, отслеживая динамику развития растений в условиях действия комплекса урбанистических факторов различной интенсивности. Учитывались следующие параметры: высота растения; диаметр стебля; количество листьев; ширина, длина и площадь листа; количество и длина междоузлий; количество боковых побегов.

Растения второго и третьего года вегетации отличаются высокой интенсивностью роста до середины июля. Такая закономерность наблюдается при обоих вариантах урбанистической нагрузки. Максимальная высота растений достигается к началу фазы цветения. Обращает внимание не совпадение динамики роста растений второго года вегетации в различных условиях. Так если в условиях ЛОС к 15.06 растения набирают 89,7% высоты, то в условиях повышенной загрязненности только 68,5%, приближаясь к максимальным показателям на месяц позже. При этом максимальная высота побегов второго года развития в условиях повышенной антропогенной нагрузки на 9,5% ниже, чем в условиях минимальной нагрузки. На третьем году жизни *R. japonica* сроки достижения максимальных показателей выравниваются, но в условиях делового центра города высота растений на 26,7 % ниже, чем в условиях опытной станции. Диаметр стебля *R. japonica* достигает максимального размера к концу июня во всех вариантах наблюдения, исключая растения второго года вегетации в условиях антропогенного стресса, где наблюдалось отставание в сроках достижения максимума на 15 дней, как и в случае с предыдущим показателем.

Облиственность растений достигает на втором году вегетации максимальных показателей к середине июля, на третьем году к концу июня в обоих вариантах наблюдения. В условиях минимальной антропогенной нагрузки (опытная станция), наблюдаемый показатель на втором году вегетации на 13,7 % , на третьем году - на 34,7% выше, чем в условиях урбанистического стресса.

Интенсивное нарастание размеров и, соответственно, площади листовой пластинки происходит до середины июля. В формировании размеров листовой пластинки антропогенный пресс оказывает выраженное действие. На втором году вегетации максимальное расхождение площади листовой пластинки составляло 38,3% (на 30.06), на третьем – 39,3% (2.08), меньшие значения наблюдали в условиях центра города (парк ВГУЭС).

Формирование боковых побегов, как на втором, так и на третьем году вегетации в условиях опытной станции начинается на 15 – 10 дней раньше, чем в деловом центре, и

количество боковых побегов в условиях ЛОС значительно превышает (50-60%) аналогичный показатель *R. japonica* в условиях парка ВГУЭС.

Анализ морфологических признаков *R. japonica*, произрастающих в условиях антропогенного воздействия и фонового контроля показал, что комплекс урбанистических факторов приводит к уменьшению фотосинтезирующей поверхности листа, количества листьев на растении, снижению высоты главных побегов и сокращению количества боковых побегов. Вероятно, это связано с подавлением ростовых процессов у побегов.

Сравнительный анализ формы листа *R. japonica*, произрастающих на участках с различным уровнем загрязнения, не выявил существенных различий. Значения отношения длина листа/ширина листа и коэффициента листовой поверхности k постоянны, не зависят от уровня загрязнения и составляют 1,4 и 0,68 соответственно.

Измерение specific leaf area (SLA) проводили на исследуемых участках в фазу вегетации: после формирования куртины и до бутонизации (15.07.09) и в фазу цветения (20.09.09), с использованием метода высечек. В фазу цветения уровень удельной листовой поверхности в обоих вариантах наблюдения несколько выше, чем в фазу вегетации: на 27,7% в условиях дендропарка ВГУЭС, и на 20,8 % в условиях ЛОС ДВО РАН

3.3 Биохимические механизмы адаптации *R. japonica* в условиях урбанистической нагрузки

В качестве биохимических параметров были выбраны: общая сумма флавоноидов, содержание мажорных флавоноидов (рутин) и минорных компонентов.

Исследование флавоноидного состава методом ВЭЖХ показало, что в экстрактах листьев *R. japonica*, выращенного в условиях разного уровня антропогенной нагрузки содержится не менее 11 соединений флавоноидной природы.

Сравнительный анализ хроматограмм экстрактов исследуемых образцов показал, что они имеют блтynbxysq полифенольный состав. Это свидетельствует о том, что качественный состав флавоноидного комплекса листьев *R. japonica* на участках с различными условиями произрастания не изменяется.

На основании данных сравнительного анализа времени удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых и стандартных образцов, в качестве мажорного флавоноида идентифицируется рутин (время удерживания 3.3-3.4). Содержание кверцетина можно отнести к минорным количествам. Результаты определения содержания флавоноидов в листьях растений *R. japonica*, произрастающих на загрязненном и фоновом участках, показали, что при сходном качественном составе флавоноидов имеются выраженные различия в их количестве. Установлено, что общее количество флавоноидов в листьях растений с повышенной антропогенной нагрузкой

несколько выше по сравнению с таковым для фонового контроля: 5,26 – 4,86% и 2,37% - 2,05 % соответственно. При этом необходимо отметить, что количественное нарастание флавоноидов происходило за счет минорных компонентов, в частности кверцетина (0,04 % - ЛОС ДВО РАН; 1,01% - дендропарк ВГУЭС), содержание мажорного рутина изменялось незначительно (1,17% - ЛОС ДВО РАН; 1,38% - дендропарк ВГУЭС).

Как следует из наших данных реакция *R. japonica* на воздействие урбанистической нагрузки выражается в повышении содержания флавоноидов (в сумме и по группам). Наиболее восприимчив к антропогенным факторам кверцетин.

При воздействии комплекса урбанистических факторов на растения *R. japonica* усиливается интенсивность метаболических процессов и изменения морфологических параметров, которые заключаются в повышении биосинтеза флавоноидов и уменьшении фотосинтезирующей поверхности, количества листьев на растении, снижении высоты главных побегов и сокращении количества боковых побегов. Анализ формы листа *R. japonica*, произрастающих на участках с различным уровнем загрязнения, не выявил существенных различий. Значения отношения длина листа/ширина листа и коэффициента листовой поверхности k постоянны и не зависят от уровня загрязнения. При этом показатель удельной листовой поверхности, отражающий связь экологических факторов и физиологического состояния растения, значительно уменьшается в условиях экологического неблагополучия. На интегративном фенологическом уровне наблюдаются изменения в сроках прохождения фенологических фаз.

4. Биология размножения *R. japonica*

Исследование цветения и плодоношения *R. japonica* проводили в условиях коллекционного участка дендрария Горностаежная станция. Наблюдения показали, что период цветения *R. japonica*, как и всех многолетних горцев очень растянут ввиду многоцветковости соцветий и постепенного распускания цветков. Продолжительность цветения около двух месяцев, за этот период в соцветии распускается свыше 1 тыс. цветков ($1251,25 \pm 14,6$ шт. на соцветие). Продолжительность цветения одного цветка 2-4 дня. Распускание цветков начинается в 6-7 часов утра, основная масса раскрывается до полудня: к 10 часам раскрывается 82%, к 15 часам - 99 -100%, и после 15 часов раскрываются единичные цветки.

Функционирование половых элементов цветка не остается постоянным в процессе цветения. Рыльце начинает выделять секрет в середине первого дня цветения и максимум прорастания пыльцы на рыльце наблюдается к концу первого и на второй день цветения. Рыльце сохраняет жизнеспособность во все дни цветения, но в конце цветения она резко падает. Пыльники раскрываются после распускания цветка, спустя 2-4 часа в зависимости

от условий погоды. Таким образом, тычиночная фаза охватывает первую половину первого дня цветения и опережает во времени пестичную. Ясно выраженная диогогамия является приспособлением к перекрестному опылению.

Семенная продуктивность *R. japonica* в культуре. Для вегетационного сезона 2009 г в условиях дендрария ГТС ДВО РАН зафиксированы следующие показатели: среднее число генеративных побегов на 1 растение $6,73 \pm 0,03$. Потенциальная семенная продуктивность интродуцированной *R. japonica* на 1 генеративный побег составляет $3128,75 \pm 14,6$ шт., реальная – $2094,43 \pm 11,9$. Наличие полноценных семян – один из основных показателей соответствия условий произрастания биологическим потребностям вида. Это положение подтверждается высоким коэффициентом семенной продуктивности *R. japonica*, который равен 67%, что свидетельствует о хорошей адаптации вида к условиям интродукции.

Исследование семян *R. japonica* показали: длина семян составляет $4,1 \pm 0,03$ мм; масса 1000 шт. семян $0,97 \pm 0,05$ г. Всхожесть семян, собранных в 2009 г, проверяли сразу после сбора (октябрь 2009) и после выдержки под снегом в естественных условиях (март 2010). При температуре 25°C прорастание семян начинается на 3-и сутки после закладки. Энергия прорастания семян на 5-й день в группе без периода покоя составила 27%, у семян после выдержки – 76 %, лабораторная всхожесть на 10-е сутки равнялась, соответственно 35% и 81%.

Наблюдения, проведенные в течение трех лет, показали, что для получения высокого урожая семян с хорошими посевными качествами необходимо проведение периодического сбора соцветий, когда большая часть семян находится в фазе восковой спелости. Переход к фазе спелости определяется интенсивным побурением соцветий. Убранные соцветия дозревают во время хранения. При раздельном способе уборки семена характеризуются высокими посевными качествами. Всхожесть семян, полученных при раздельном способе уборки, составляет в среднем за 3 года 78,6 %, а при однократной осенней уборке 39,4 %, что, видимо, объясняется большим количеством недозревших семян

Качество семян *R. japonica* зависит от длительности хранения. После одного года хранения всхожесть понижается на 10,7 %, а после двух лет хранения семена практически не пригодны для посева, их всхожесть снижается до 23,7 % при раздельном способе уборки и до 16,5 % при однократной осенней уборке.

R. japonica при достижении репродуктивной фазы развития в течение вегетационного сезона успевает пройти полный цикл развития, цветет и плодоносит ежегодно. Цветение наступает в конце июля - начале августа и семена созревают в конце

сентября - октябре. В условиях юга Приморского края *R. japonica* характеризуется растянутым периодом цветения, неравномерной созреваемостью семян и быстрой их осыпаемостью по мере наступления фазы спелости. В коллекционном питомнике ГТС ДВО РАН ежегодно вызревают семена *R. japonica* с достаточно высокой всхожестью.

5. Биологическая активность экстракта *Reynoutria japonica* Houtt.

5.1 Действие экстракта *R. japonica* на растительные объекты

В качестве экспериментального объекта выбраны семена *Tagetes erecta* (сорт «Гавайи») Выбор мотивирован тем, что эти цветочные культуры известны как наиболее устойчивые и неприхотливые в городском ландшафтном дизайне на антропогенно-депрессивных территориях [Кудрявцев, 2001; Прогнозирование..., 2004, Линькова, Гусаков, 2009]. Агенты выбранные для обработки семян *T. erecta* представлены в табл.1.

Таблица 1

Варианты опыта	
1	Дистиллированная вода - H ₂ O (контроль)
2	Гумистар – ГС
3	Водный экстракт рейнутрии японской – ВЭРЯ
4	Снеговые воды – СВ
5	Гумистар + снеговые воды - ГС+СВ
6	Водный экстракт рейнутрии японской + снеговые воды - ВЭРЯ+СВ

Анализ результатов опыта показывает что, обработка семян растворами БАВ способствует усилению энергии прорастания на 36,1% (ГС) и 31,1 % (ВЭРЯ) по сравнению с водным контролем(рис.1). Применение загрязнителей снизило энергию прорастания семян на 31% (вариант 4). Сочетанное применение загрязнителей и биологическиактивных веществ, показало возможность нивелировать негативное воздействие загрязнителей и способствует повышению энергии прорастания по сравнению с контролем (вариант 1) на 19,7% для ГС и 24,6% для ВЭРЯ. По сравнению с энергией прорастания семян на загрязненной среде (вариант 4), БАВ увеличивают этот показатель на 73,8% ГС и 80,9% ВЭРЯ.

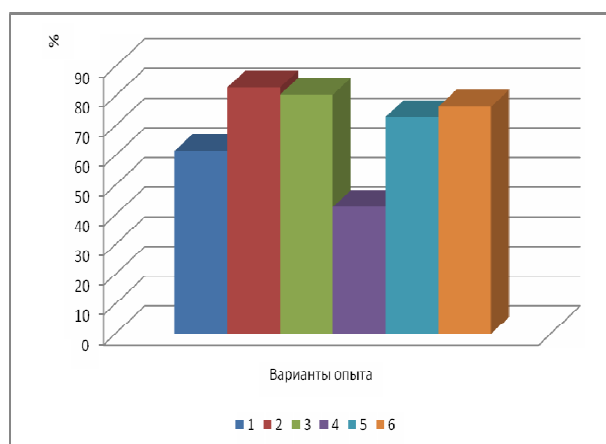


Рис.1 Действие БАВ, комплекса загрязнителей и их сочетаний на энергию прорастания (%) *T. erecta*.

1-H₂O; 2-Гумистар; 3-водный экстракт *R. japonica*; 4-снеговые воды; 5-снеговые воды + гумистар; 6-снеговые воды+ водный экстракт *R. japonica*.

Для лабораторной всхожести наблюдали аналогичные изменения. В первых трех вариантах параметр не показал достоверных различий с контролем и составил 93,5%, 96,5%, 97,0% для воды, ГС и ВЭРЯ соответственно. В случае воздействия СВ (вариант 4) лабораторная всхожесть снизилась по сравнению с контролем на 30,8%. При сочетанном действии загрязнителя и БАВ показатели приближались к контрольным значениям и превосходили вариант 4 на 39,1% для ГС+СВ и на 41,4% для ВЭРЯ+СВ.

В следующем эксперименте исследовали действие вышеуказанных БАВ на декоративные качества *T. erecta*. Результаты наблюдений отражены в табл. 2.

Анализ полученных данных показал, что из декоративных признаков *T. erecta* при действии комплекса загрязнителей и БАВ изменяется диаметр соцветия, тогда как изменение количества соцветий на 1 растении не достоверно, что характеризует данный признак как устойчивый и практически не подверженный действию экологических факторов. Диаметр соцветия, при обработке растений БАВ без воздействия загрязнителя, достоверно увеличивался в среднем на 30 %, как при воздействии «Гумистар», так и экстракта *R. японской*. На фоне действия комплекса урбанистических загрязнителей БАВ нивелировали токсический эффект. Диаметр соцветия в обоих случаях увеличивался на 98,0 % в случае «Гумистар», и на 99,3% в случае экстракта *R. japonica*.

Таблица 2

Действие БАВ, комплекса загрязнителей и их сочетаний на декоративные качества *T. erecta* ($M \pm m$).

№	вариант	диаметр соцветия, см	по отношению к контролю, %	количество соцветий, шт	по отношению к контролю, %
1	Вода дистиллированная	6,85±0,11		5,23±0,07	
2	Гумистар (ГС)	8,73±0,19	+ 27,4	5,17±0,08	- 1,1
3	Водный экстракт <i>R. japonica</i> (ВЭРЯ)	8,94±0,08	+ 30,5	5,20±0,07	- 0,6
4	Снеговые воды (СВ)	4,01±0,12	- 41,5	5,21±0,08	- 0,4
5	ГС + СВ	7,94±0,09	+ 15,9	5,24±0,07	+0,2
6	ВЭРЯ + СВ	7,99±0,08	+ 16,6	5,18±0,07	-1,0

Возможно предположить, что влияние препарата на продуктивность растений основано на способности усиливать реализацию потенциальных возможностей растения, активизации физиологических и биохимических процессов как в прорастающем семени, так и в развившейся из него особи. Простота и низкая себестоимость экологически чистого способа предпосевной обработки семян позволяет повысить объемы производства и качество растениеводческой продукции.

Таким образом, применение водного экстракта *R. japonica* сопровождается увеличением энергии прорастания, повышением декоративности растений и преодолением токсического эффекта комплекса урбанистических загрязнителей. Действие водного экстракта *R. japonica* по проявляемой биологической активности не уступает промышленному препарату («Гумистар»).

5.2 Действие экстракта *R. japonica* на лабораторных животных

5.2.1 Влияние экстракта *R. japonica* на поведенческие реакции животных в условиях различной стрессогенности

В эксперименте анализировали действие экстракта *R. japonica* на двигательную активность экспериментальных животных в условиях различной стрессогенности.

С помощью метода открытое поле (ОП) исследовали влияние *R. japonica* на интегративные этологические реакции мышей. На данном этапе эксперимента проводилось исследование действия водного экстракта *R. japonica* на поведение животных в трех различающихся по уровню сенсорной нагрузки модификациях: «минимально стрессогенной», «максимально стрессогенной», «переменной нагрузки».

В минимально стрессогенных условиях (тишина, приглушенный свет) какого-либо действия препарата на поведение мышей не зарегистрировано, достоверные изменения поведения животных экспериментальных групп в сравнении с контролем отсутствовали. Соотношение между суммарными пассивно-оборонительными и поисковыми поведенческими реакциями составляло 39,7% и 60,3% в контрольной группе и 35,5% и 64,5% на фоне ВЭРЯ. Таким образом в условиях минимального стрессорного воздействия препарат проявляет тенденцию к повышению поисково- исследовательской активности с одновременным снижением уровня эмоционального напряжения, демонстрируемого через пассивно-оборонительные реакции, что можно рассматривать как понижение уровня неспецифической возбудимости.

В максимально стрессогенных условиях (яркий свет, звонок) при суммировании двигательных актов, различий между контрольной и экспериментальной группами не выявлено. При этом анализ распределения регистрируемых актов позволил выявить расхождение в паттерне поведения контрольной и экспериментальной группы (рис.2).

На фоне введения препарата отмечалось сокращение «барьерного бега» на 24,8% и «грумминга/фризинга» на 42,2%. Таким образом, в поведении опытных животных уменьшалась доля максимальной (реакция панического бега) и минимальной (реакции затаивания) двигательной активности при помещении в стрессогенные условия. Оба эти

поведенческих паттерна являются яркими проявлениями пассивно-оборонительной мотивации. Снижение их встречаемости свидетельствует об уменьшении влияния

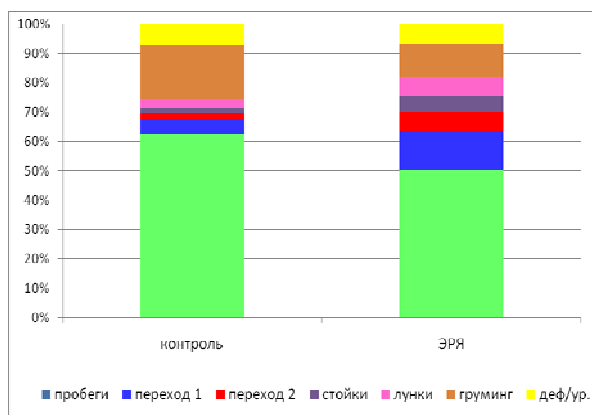


Рис.2 Действие препарата *R. japonica* на паттерн поведения лабораторных животных в максимально стрессогенных условиях

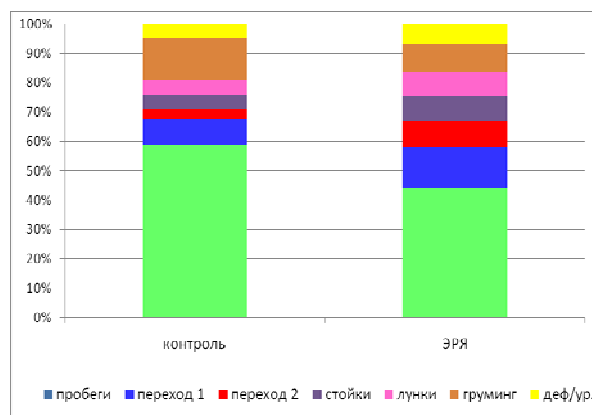


Рис. 3. Действие препарата *R. japonica* на паттерн поведения лабораторных животных в условиях переменной стрессогенности..

последней на поведение животных. Известно, что эта группа этологических показателей, в которой смыкаются поведенческий и эндокринный компоненты стресса. В частности, автогруминг — форма поведения, возникающая при стрессе и индуцируемая гипофизарными и гипоталамическим стрессорными гормонами [Жуков, 2007]. Таким образом, снижение уровня указанных показателей, свидетельствует о снижении уровня стрессорных гормонов, уменьшении тревожности и определенном антистрессорном (адаптогенном) действии ВЭРЯ.

Регистрировалось увеличение переходов 1-го и 2-го типов в 2,5 и 3,5 раза соответственно; возрастала вертикальная активность: количество «вертикальных стоек» в 2,7 и «заглядывание в лунки» в 1,95 раз. Подобный «всплеск» поискового типа двигательной активности, свидетельствует о смещении соотношения между оборонительной и исследовательской мотивациями в поведении животных в сторону последней.

Аналогичные изменения в поведении животных наблюдались в условиях переменной стрессогенности (рис.3) Так, если в контроле суммарная доля пассивно-оборонительных реакций составляла 73,2% от общего числа двигательных актов, то на фоне действия препарата наблюдали возрастание поисковых форм активности на 18,3% и, соответственно, снижение доли пассивно-оборонительных актов до 54,9%.

Поисковые реакции в общей двигательной активности животных на фоне действия ВЭРЯ увеличивались за счет следующих актов: «переход 1-го типа» на 66,6% (в 1,6), «переход 2-го типа» на 152% (в 2,5), «стойки» на 90,3% (в 1,9), «лунки» на 69,7% (в 1,7). На фоне введения препарата отмечалось сокращение «барьерного бега» на 21,6% и «груминга/фризинга» на 32,3%. Таким образом ВЭРЯ проявляет биологическую активность в условиях умеренной стрессогенности, снижая уровень тревожности (тревожно-фобических поведенческих проявлений) экспериментальных животных.

В отличие от теста открытое поле (ОП), тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) отличается тем, что у животного есть выбор между более и менее стрессогенными участками лабиринта. Поэтому, пребывание животных в лабиринте и демонстрируемые поведенческие паттерны глубже позволяют оценить уровень тревожности животных.

Поведение в ПКЛ оценивали по следующим показателям: двигательная активность (время пребывания и число выходов в открытые рукава лабиринта); исследовательская активность (стойки, дипинг); эмоциональная активность (автогруминг, дефекационные болюсы).

При воздействии максимальной стрессорной нагрузки отмечается значимое уменьшение по сравнению с группой минимального уровня таких показателей поведенческой активности, как время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта в 11,6 раза и выходы в открытый рукав 10 раз.

Показатели вертикальной исследовательской активности число стоек — так же в группе максимального воздействия достоверно снижалось практически в 2 раза. Необходимо отметить, что показатель оценки риска - «дипинг» (заглядывание вниз из концов открытых рукавов ПКЛ) в указанной группе также более, чем в 3 раза снижался по сравнению с аналогичным показателем минимального стресс-фактора, что свидетельствует о возрастании тревожности и сужении поля когнитивного восприятия вследствие действия стрессора.

Эмоциональная активность у животных при действии максимальной нагрузки проявилась в усилении груминга (в 1,6 раза) при одновременном увеличении уровня дефекации (в 4 раза), по сравнению с минимальным стрессором. Возрастание названных показателей, свидетельствует о возрастании уровня стрессорных гормонов, повышении тревожности и нарастании стрессорной реакции при действии максимального сенсорного раздражителя.

Продолжая анализ данных видно, что при сочетанном действии максимальной стрессорной нагрузки с экстрактом рейнутрии японской (ЭРЯ) и сухим экстрактом

рейнутрии японской (СЭРЯ), такой показатель поведенческой активности, как время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта превышает соответственно в 11,8 и 11,5 раз показатели группы стресс-контроля. Аналогичные изменения наблюдаются и в показателе выходов в открытый рукав, который возрастал практически в 10 раз в обоих случаях. Также возрастает уровень исследовательской активности, что выражается в увеличении числа стоек с опорой на стенки (в 2,4 и 2,3 раза соответственно) и частоты дипинга (в 5 и 3,8 раза соответственно). Снижение эмоционального напряжения у животных при сочетанном действии максимальной нагрузки и препаратов выразилось в уменьшении количества актов груминга (в 1,7 и 1,6 раз соответственно) и дефекации (в 3,2 и 1,8 раз соответственно). Снижение уровня названных показателей, свидетельствует о снижении уровня стрессорных гормонов, уменьшении тревожности и ослаблении стрессорной реакции.

Под действием препаратов ЭРЯ и СЭРЯ показатели двигательной, исследовательской и эмоциональной активности достоверно приближались к фоновым показателям, что свидетельствует о снятии психо-эмоционального и гормонального напряжения животных.

Индексы тревожности, обнаруживают видимые изменения оказываемые действием максимального комплекса сенсорной нагрузки на уровень тревожности животных, как по времени пребывания в открытых рукавах лабиринта, так и по числу выходов в них. Для группы максимальной нагрузки индекс тревожности по времени нахождения был в 19,3; 20,3 и 19,5 раз меньше, чем в группах минимальной нагрузки и в сочетании с ЭРЯ и СЭРЯ соответственно, индекс тревожности по числу выходов был меньше в 2,5 раза по сравнению со всеми группами. В ПКЛ животные групп сочетанного действия препаратов и максимального раздражителя успешно преодолевали действие стрессора. У животных этих групп по сравнению с группой максимального воздействия наблюдается достоверное увеличение индексов тревожности, что свидетельствует о нормализации психосоматического состояния лабораторных животных, и наличии выраженной биологической активности у препаратов *R. japonica*.

Проведенные эксперименты показали, что препараты *R. japonica* проявляют биологическую активность адаптогенного и анксиолитического характера, смещая соотношение пассивно-оборонительных и исследовательских компонентов поведения в сторону последних при тестировании в ОП, и преодолевая тревожно-фобические проявления в ПКЛ в условиях максимальной сенсорной нагрузки.

5.2.2 Влияние экстрактов *R. japonica* на гематологические показатели лабораторных животных

Эмоциональный стресс моделировали максимальной и минимальной сенсорной нагрузкой в течение 15 мин. воздействия. Животные экспериментальной группы получали препарат *R. japonica* (СЭРЯ) в дозе 10мг/кг за 60 минут до начала максимальной сенсорной нагрузки. Через 2 часа проводили забор крови из хвостовой вены на морфологический анализ. В настоящем исследовании использовали 3 группы животных по 9 особей в каждой, животные не были подвержены исследованиям в экспериментальных моделях поведения.

Представленные в табл. 3 экспериментальные данные свидетельствуют об определенных изменениях клеточного состава периферической крови у животных, подвергнутых стрессогенной нагрузке и при сочетании нагрузки и растительного препарата. У экспериментальных животных после воздействия сенсорной нагрузки наблюдали уменьшение, почти в два раза (на 44,4%) числа эритроцитов в периферической крови. Уменьшение числа эритроцитов сопровождалось снижением содержания гемоглобина в крови на 27,6%. Не менее важной для анализа реакции крови на действие стрессора, является оценка сдвигов со стороны белого ростка кроветворения. Известно, что, вне зависимости от характера воздействующего на организм фактора внешней среды, в периферической крови происходят однотипные изменения (нейтрофилез, лимфопения), которые трактуются как неспецифические [Горизонтов и др., 1983; Исследование..., 1998].

Таблица 3

Изменение гематологических показателей при действии максимальной сенсорной нагрузки и в сочетании с препаратом *R. japonica* (M $\pm$ m).

Показатели	Группы животных		
	Минимальная сенсорная нагрузка	Максимальная сенсорная нагрузка	Максимальная сенсорная нагрузка + СЭРЯ
	(1)	(2)	(3)
Эритроциты, $\cdot 10^6$	6,65 $\pm$ 0,80	3,70 $\pm$ 0,51*	6,69 $\pm$ 0,20**
Гемоглобин, г/л	110,20 $\pm$ 2,63	79,80 $\pm$ 3,20*	112,32 $\pm$ 3,40**
Лейкоциты, 10^3	9,20 $\pm$ 1,11	13,03 $\pm$ 1,40	8,96 $\pm$ 0,38
Нейтрофилы, %	23,60 $\pm$ 1,70 (2748)	40,10 $\pm$ 2,10* (4491)	23,80 $\pm$ 0,65** (3592)
Эозинофилы, %	2,00 $\pm$ 0,17	6,00 $\pm$ 0,80	2,20 $\pm$ 0,20
Лимфоциты, %	66,92 $\pm$ 0,30 (7693)	52,00 $\pm$ 2,20* (5324)	65,10 $\pm$ 1,80** (10326)
Моноциты, %	4,20 $\pm$ 1,10	2,80 $\pm$ 1,00	4,00 $\pm$ 0,27
СОЭ, мм/час	3,20 $\pm$ 0,33	8,00 $\pm$ 0,35	3,00 $\pm$ 0,44

Прим. *p<0,005 по сравнению 2 с 1;

**p<0,005 по сравнению 3 с 2.

Увеличение числа нейтрофилов объясняется стимуляцией секреции гормонов коры надпочечников и в случае возрастания состояния тревожности, перераспределением

клеток между маргинальным и циркулирующим пулами. В наблюдаемом эксперименте отмечен относительный и абсолютный нейтрофилез на фоне лимфопении после сенсорной нагрузки, что согласуется с общепринятой схемой развития стрессорной реакции. Препарат снимал проявления лимфопении и нейтрофилеза, приводя показатели к норме. Проявление выраженных гематологических реакций свидетельствует о реализации эффектов препарата *R. japonica* на уровне циркулирующей крови и органов кроветворения.

5.2.3 Антиоксидантная активность сухого экстракта *R. japonica* при этаноловом гепатите.

Благоприятное действие экстрактов *R. japonica* в этологическом эксперименте может быть обусловлено мембраностабилизирующим и антиоксидантным действием, а так же оптимизацией энергетических процессов в нервных клетках. Для проверки этой гипотезы был проведен эксперимент для подтверждения антиоксидантной активности СЭРЯ. Настоящее исследование проводилось с целью определения антиоксидантного действия препарата *R. japonica*.

Результаты исследований показали, что введение этанола в указанной дозе вызывает усиление процессов ПОЛ в сыворотке крови и ткани печени. Так, на 7-е сут. интоксикации у животных контрольной группы по сравнению с интактными животными в сыворотке крови и гомогенате печени отмечалось повышение содержания МДА на 51 и 57%, на 14-е сут. - 54 и 49%, на 21-е сут. - 55 и 35% соответственно. Ускорение процессов ПОЛ в печени, вероятно, связано с трансформацией этанола ферментами, локализованными на эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, с образованием высокореакционноспособных и токсичных производных. Образовавшиеся агрессивные метаболиты, инициируют процессы ПОЛ, нарушают проницаемость клеточных и субклеточных мембран, в результате чего происходит дезориентация ферментных систем, ухудшение метаболических процессов в печени [Николаев, 1992].

Интенсификация ПОЛ в клеточных мембранах сопровождается понижением эндогенной антиокислительной защиты, на что указывает снижение на 31, 65 и 50 % каталазной активности сыворотки крови на 7-е, 14-е и 21-е сут. эксперимента. При остром токсическом гепатите наблюдали глубокое истощение функции антиоксидантной системы печени.

Курсовое введение СЭРЯ в указанной дозе значительно уменьшало токсическое действие этанола, о чем свидетельствуют достоверное снижение интенсивности ПОЛ в печени. На это указывает понижение содержания МДА в гомогенате ткани печени и сыворотке крови крыс, получавших наряду с этанолом СЭРЯ, на 46% и 31%

соответственно по сравнению с аналогичными показателями у крыс контрольной группы. В 2,3 раза повышается каталазная активность сыворотки крови, что свидетельствует об увеличении потенциала антиокислительной активности сыворотки крови. Полученные результаты доказывают, что СЭРЯ обладает антиоксидантным свойством, которое предотвращает повреждение печени этанолом реализуемое гармоничным сочетанием действующих биологически активных веществ, способных подавлять ПОЛ и предупреждать деструкцию мембран. Мембранозащитный эффект СЭРЯ, на наш взгляд, обусловлен непосредственным влиянием флавоноидных соединений изучаемого лекарственного растения и может быть объяснен характером метаболических защитных реакций фенольных соединений. При взаимодействии свободных радикалов с флавоноидами образуются радикалы неспособные продолжать свободнорадикальный процесс [Барабой, 1976]. Кроме того, фенольные соединения растительного происхождения способны не только нейтрализовать свободные радикалы, но и одновременно могут взаимодействовать с другими ингибиторами и восстанавливать активность более сильного ингибитора. Вследствие этого уменьшается «расход» эндогенных антиоксидантов в организме, что способствует более рациональному использованию внутренних резервов антиоксидантной системы [Кудрин и др., 1987; Лапин, 2004]. Гепатопротекторы потенцируют действие эндогенных антиоксидантных систем (растительные полифенолы), включаясь в реакции ПОЛ как прямые ингибиторы свободных радикалов и поставляют антиоксиданты в поврежденные мембраны печени. В нашем эксперименте СЭРЯ, оказывая антирадикальное действие, предохранял от деструкции эндогенные антиоксиданты гепатоцитов. Подобный эффект отмечен для других препаратов (эссенциале, эфир) на основе растительного и природного сырья. Гепатопротектор нормализовал сниженную активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы [Саратиков и др., 2004]

Таким образом, можно полагать, что антиоксидантные свойства СЭРЯ обеспечивают стабилизацию мембранных структур гепатоцитов, тем самым предупреждают развитие синдромов цитолиза и холестаза при этанольном повреждении печени.

Выводы

1. *Reynoutria japonica*, культивируемая в условиях юга Приморского края, характеризуется растянутым периодом цветения, неравномерной созреваемостью семян. В течение вегетационного сезона проходит полный цикл развития: цветение и плодоношение ежегодное, коэффициент семенной продуктивности составляет 67%.

2. Качество семян *Reynoutria japonica* зависит от длительности хранения. После одного года хранения всхожесть снижается от 78,6% до 67,9%, а после двух лет хранения до 23,7 % при раздельном способе уборки и до 16,5 % при однократной осенней уборке.
3. Комплекс урбанистических факторов инициирует адаптационные процессы, затрагивающие биохимические, физиологические и морфологические структуры *R. japonica*, что выражается в повышении биосинтеза флавоноидов, уменьшении фотосинтезирующей поверхности листа, удельной листовой поверхности (SLA), количества листьев на растении, снижении высоты главных побегов и сокращении количества боковых побегов. Наблюдаются изменения в сроках прохождения фенологических фаз.
4. Водный экстракт *R. japonica* оказывает протективное действие на посадочный материал (семена, проростки), усиливает реализацию потенциальных возможностей растения, активизирует физиологические и биохимические процессы, как в прорастающем семени, так и в развившейся из него особи, что проявляется в увеличении энергии прорастания, повышении декоративности растений и преодолении токсического эффекта комплекса урбанистических загрязнителей.
5. В условиях сенсорной нагрузки препарат *R. japonica* препятствует развитию стресс-реакции у лабораторных животных, способствуя ее замене на более эффективные и экономичные варианты резистентной стратегии адаптации. Об этом свидетельствуют изменение формулы крови, снижение уровня малонового диальдегида, активация антиоксидантной защиты и перестройки в реализации основных форм поведения, проявляет анксиолитическую активность, на что указывает изменение индексов тревожности.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. *Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Действие водного экстракта *Reynoutria japonica* на растительные объекты // Естественные и технические науки, 2011. №2 (41). С. 159-163.
2. *Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Влияние экстрактов *Reynoutria japonica* на гематологические показатели лабораторных животных // Естественные и технические науки, 2011. №2 (41). С. 172-179.
3. Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Интродукция рейнутрии японской (*Reynoutria japonica* Houtt.) в условиях юга Приморского края // Сб. Биологические исследования на ГТС, 2011. № 12. С. 152-161.

4. *Зорикова, С.П., Маняхин, А.Ю., Зорикова, О.Г. Биологическая активность сухого экстракта горца сахалинского // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 2. С. 69-72.
5. *Зорикова, С.П., Маняхин, А.Ю., Зорикова, О.Г. Внутривидовая изменчивость состава флавоноидов *Polygonum aviculare* L. // Естественные и технические науки. 2010. № 3 (47). С.127-130.
6. *Зорикова, С.П., Короткова, И.П., Зориков, П.С. Ранозаживляющая активность растений, содержащих флавоноиды // Естественные и технические науки. 2010. № 3 (47). С.152-161.
7. *Маняхин, А.Ю., Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Цветение и плодоношение рейнутрии японской (*Reynoutria japonica* Houtt) // Естественные и технические науки, 2011. №2 (41). С. 164-171.
8. *Маняхин, А.Ю., Зорикова, С.П., Зорикова, О.Г. Биологическая активность сухого экстракта шлемника байкальского // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 2. С. 66-69.

Примечание: * - статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.