

Получено:  
7 апреля 2016 г.  
Пересмотрено:  
27 апреля 2016 г.  
Принятый:  
13 мая 2016 г.

Гелион 2 (2016) e00115



CrossMark

Экстракт чеснока имбиря повышает физическую работоспособность и мышечную выносливость за счет улучшения воспаления и энергетического обмена.

Казуя Тода, Сё кэцу Хигоэ, Сё го Такэда, Хироши Симода \*

Ор дел иссле дований и разработок , Oryza Oil and Fat Chemical Co., Ltd., Нумат а, 1, Кигагата-тё , Индия  
Айт и 493-8001. Япония

\* Соответствующий автор.

Адрес электронной почты [kaihatsu@mri.biglobe.ne.jp](mailto:kaihatsu@mri.biglobe.ne.jp) (Х. Симода).

## Абстрактный

**Ключевые слова:** Биологические науки, Биология растений, Биохимия.

## 1. Введение

Черный имбирь, к орневище *Kaempferia parviflora* (Zingiberaceae), уже более 1000 лет традиционно используется в пищу и в народной медицине Таиланда. Высушенное к орневище обычно имеет измельченную и используется в качестве вяжущего пакетика, а свежее используется для заваривания вина. Винный препарат все чаще используется в Таиланде в качестве ветоцидного средства и афродизиака. В качестве ветоцидного добавка из него делают различные препараты, такие как лечебный ликер или ликер с медом, пилиоти (порошок из орневища с медом), капсулы саблевидные и т.д. Тайский радиационная медичина утверждает, что черный имбирь лечит аллергию, импотенцию, подагру, диарею, геморрой, язвенную болезнь и диабет. Большинство клинических исследований было показано, что KPE улучшает показатели физической подготовки подголовника [6, 7]. Антисидантная активность KPE связана с его полезными эффектами. Ранее сообщали, что PMFs в KPE увеличиваются в результате энергии с активации AMPK, вызывая улучшение метаболизма в мышцах [8]. Для благотворного воздействия черного имбиря на здоровье мышц работали порошкообразный экстракт черного имбиря в качестве вещества ингредиента здоровой пищи и выпустить его на рынок, известный как экстракт черного имбиря, который содержит антиоксидантные соединения не менее 2,5% 5,7-диметоксифлавона и 10% общего количества ПМФ. Здоровая функция черного имбиря показана исследуется.

Физическая активность снижает физическую работоспособность и мышечную выносливость. Ранее считалось, что усталость связана со снижением внутренних показателей pH (ацидоз) за счет нарушения молочной кислоты (МК) [9]. Однако недавние данные свидетельствуют о том, что нарушение МА не является прямой причиной утомления, а скорее факт о восстановления утомления [10, 11, 12, 13]. Кроме того, предполагалось, что различные факторы включая метаболизм АТФ, ацидоз и окислительный стресс, играют роль в сложных процессах утомления [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21].

Известно, что AMP-активированная протеинкиназа (AMPK) играет решающую роль в регуляции энергии и гомеостаза [22, 23, 24], было показано, что ее активация усиливает метаболизм глюкозы и липидов [25, 26]. Таким образом, AMPK была привлечена к роли юдля открытия антидиабетических средств или метаболических лекарственных средств. AMPK связана с физической работоспособностью и мышечной выносливостью. Ранее сообщалось, что 5-аминоimidазол-4-карбоксиамид рибонуклеотид (AICAR), агонист AMPK, повышает беговую выносливость до 44% и уменьшает жировые отложения у мышей при пероральном введении в течение 4 недель [27]. Следует отметить, что было высказано предположение, что активация AMPK улучшает физическую работоспособность, мышечную выносливость и жировой обмен. Поэтому мы предположили, что KPE может улучшить физическую

работ способность нет олько за счет антиоксидантной активности, но изза счет других механизмов, включая активацию AMPK.

Благодаря влияние чеснока имбиря на усталость или мышечную выносливость еще не исследовано. Основываясь на результатах, описанных выше, мы рассмотрим влияние КРЕ на физическую работоспособность и мышечную выносливость у мышей. Чтобы объяснить основные механизмы действия, к амбаловидной мышце и кровь были собраны мыши, которых были введены КРЕ, и были оценены различные параметры связанные с физической работоспособностью мышечной выносливости при воспалении, метаболизмом в митохондриях и на окислении гликогена.

Кроме того, в попытке идентифицировать активные соединения в КРЕ, РМФ были идентифицированы в мышцах мыши (C2C12).

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Животные и оформление

Эксперименты на животных проводились в соответствии с Руководством по надлежащему проведению экспериментов на животных (Специальный совет Японии, 1 июня 2006 г.).

Самцы мышей ddY в возрасте 10 недель (Japan SLC, Co., Ltd., Хамамацу, Япония) содержали при температуре  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  и влажность  $60 \pm 5\%$  при 12-часовом цикле свет/темнота. Мыши свободно кормили стандартным питанием с вердиктом кормом (CE-2, Oriental Yeast Co., Ltd., Токио, Япония). Их разделили на две группы по 15 мышей в каждой. Группе КРЕ перорально вводили КРЕ (45 мг/кг/день) в водной суспензии в течение 4 недель. Контрольной группе перорально вводили носитель КРЕ.

### 2.2. Реагенты

Набор NucleoSpin® Tissue, используемый для выделения ДНК из амбаловидной мышцы был приобретен у Takara Bio Inc. (Кусацу, Япония). Липополисахарид (LPS) из Escherichia coli 0127: B8 был приобретен у Sigma-Aldrich Co. LLC (Сент-Луис, Миссури, США). LA был приобретен у Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Оsака, Япония). Набор 2 для колориметрического анализа лактата был приобретен у BioVision (Милпитас, Калифорния, США). Другие реагенты используемые в тесте *in vitro* различны оценены мышами, были приготовлены в соответствии с нашим предыдущим исследованием [8].

### 2.3. Подготовка КПЭ и ПМП

КПЭ получали из высушенных корневищ чеснока имбиря экстрагированием водно-спиртовым раствором (выход 15,9%). КПЭ смешивали с модифицированным крахмалом в соотношении 3:7 (КПЭ: модифицированный крахмал) и затем распыляли в порошок с помощью юраспыльгеля ной сушки. Суспензию КРЕ для использования в экспериментах *in vivo* готовили путем суспендирования 600 мг порошка КРЕ в 40 мл воды. Что касается носителя, 420 мг модифицированного крахмала растворяли в 40 мл воды. Этот раствор ворывали или мышам. Стандарты РМФ, включая

5-гидрокси-3,7-диметоксифлавон (1), 5-гидрокси-7-метоксифлавон (2), 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлавон (3), 5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметоксифлавон (4), 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавон (5), 5,7,4'-триметоксифлавон (6), 3,5,7,4'-тетраметоксифлавон (7) и 5,7-диметоксифлавон (8) были идентифицированы в нашем предыдущем исследовании [8]. Содержание всех ПМФ в порошке образовано КПЭ определяли методом ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием системы ВЭЖХ Prominence (Shimadzu, Кито, Япония), оснащенной матричным фотодиодным детектором (модель SPD-M20A) и колонкой Develosil RPAQUEOUS-AR-5 (4,6) × 150 мм, размер частиц 5 мкм, Nomura Chemical Co., Ltd., Япония). Подвижная фаза состояла из бинарного градиента, состоящего из смеси ацетонитрила и водного уксусной кислоты (35:62,5:2,5, по объему).

Расторгните А и смесь ацетонитрила и уксусной кислоты (97,5:2,5, об/об) в качестве растворителя B. Скорость потока ацетонитрила установлена на уровне 1,0 мл/мин, а температура колонки установлена на уровне 35°C. Условия градиента были следующими: 0–20 мин (расторгните А: 99–1%). УФ-спектроподавление обнаружено при 263 нм. Содержание определяемого ПМФ составляло 1 (0,66%), 2 (0,52%), 3 (0,81%), 4 (0,30%), 5 (2,94%), 6 (3,14%), 7 (1,75%) и 8 (2,5%) соответственно (рис. 1).

#### 2.4. График испытаний на мышах

Тест *in vivo* проводили по схеме, описанной на [фиг. 2A](#). В период скрининга на -5 и -4 день проводили последовательный нейтритический принудительный ноготряс (CST). На -3 и -2 день были проведены тесты на выживаемость физической подготовленности (ПП).

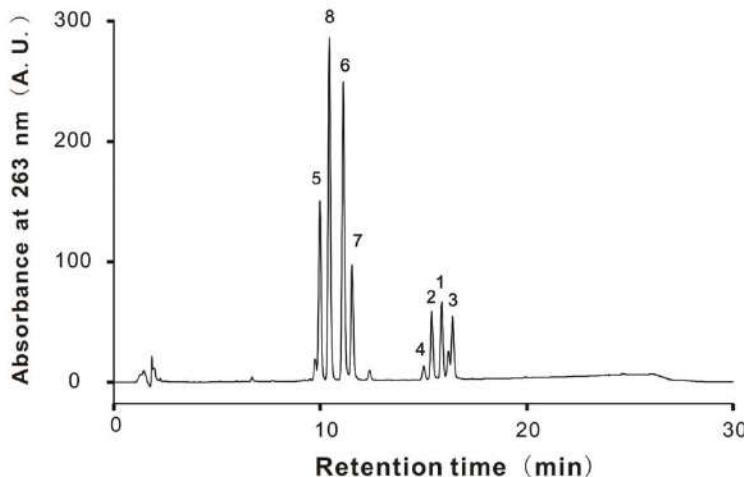


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограмма КПЭ для определения ПМФ. ПМФ в КРЕ разделяли на колонке Develosil RPAQUEOUS-AR-5. Хроматографическая подвижная фаза состояла из смеси ацетонитрила и воды (ацетонитрил:вода:уксусная кислота = 35:62,5:2,5, об/об) и B (ацетонитрил:уксусная кислота = 97,5:2,5, об/об). Программа градиента была установлена на 0–20 мин (расторгните А: 99–1%). Использование 263 нм в качестве волны в выборочной длины волн позволило идентифицировать 8 известных ПМФ. Пик 1, 5-гидрокси-3,7-диметоксифлавон; 2, 5-гидрокси-7-метоксифлавон; 3, 5-гидрокси-3,7,4'-триметоксифлавон; 4, 5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметоксифлавон; 5, 3,5,7,3',4'-пентаметоксифлавон; 6, 5,7,4'-триметоксифлавон; 7, 3,5,7,4'-тетраметоксифлавон; 8, 5,7-диметоксифлавон.

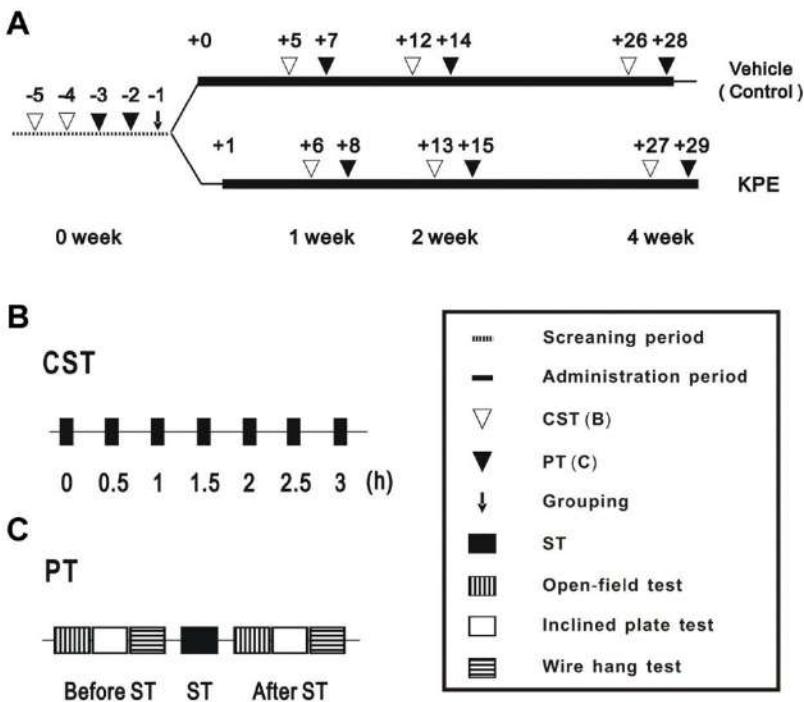


Рис. 2. Протокол теста *in vivo*. Временной график теста *in vivo* (A). Каждое число показывает день до и после первого перорального введения КРЕ или носителя. Разрешение ( ) открытым квадратом ( ) из закрытого квадратом ( ) означает группировку, последовательность нынешний тест принудительного плавания (CST) и есть измерения физических оценок и (PT) соотвественно. Жирные линии указывают период введения носителя (верхняя линия) для контроля и КРЕ (нижняя линия). Временные графики CST и PT показаны на B. Каждый этап разделен на прямой угольник ( ) означает тест принудительного плавания (ST). Прямой угол с вертикальной линией ( ), незакрашенный прямой угол ( ) и прямой угол с горизонтальной линией ( ) означают испытание в открытом поле, испытание с наклонной пластины и испытание на подвесивание проволоки соответственно.

Мышь были разделены на 2 группы соответственно с данными, полученными из CST и PT, чтобы гарантировать, что общие показатели физической подготовки обеих групп будут почти одинаковыми. После группировки (0-й день) мышь перорально вводили КРЕ или носитель, и также парные тесты (CST и PT), которые проводились на 0-й неделе, проводились в 1-, 2- и 4-недельные периоды. После теста в 4-недельный период из правой задней ноги брали амбаловидную мышцу для исследования экспрессии различных мРНК, числа которых определялись гликогеном.

Кровь брали из брюшной аорты под анестезией для определения уровня ЛК в крови.

## 2.5. КНТ

В круглом бассейне (диаметр 25 см, глубина 30 см, заполненном подогретой водой с температурой от 37°C до 40°C) мышей привязывали за хвосты к грузу, который составлял примерно 10% от веса их тела, избегая плавать. Часто случалось попадание воздуха на поверхность волос, измерения начинали после однократного погружения тела под воду.

поверхность воды Время плавания определяли как время, до которого мышь не могла плывать в течение 5 секунд [или 7 секунд в случае принудительного плавания (ST) в PT] на поверхности воды. Более того, при ST в очищенная ST выполнялась через 30 минут после первой ST в тех же условиях. Впоследствии ST выполняли в общей сложности 7 раз через 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 ч (рис. 2В).

## 2.6. ПТ

ПТ выполнялись с использованием следующих методов: ST, тест от��ом поле, тест на клонной плоскости и тест подвешивания на проволоке (рис. 2С). ST выполняли практик и в тех же условиях, что и CST. Другие тесты проводились дважды (рис. 2С), до и после ST, как описано ниже. Тест «от��ом поле»: мышь помещали в квадратное поле (30 × 30 см), разделенное на 9 зон. Количество тестов во время, когда мышь перемещалась в другие области, измеряли в течение 3 мин. Тест с клонной пластиной: после теста в от.sendRedirectом поле мышь помещали на деревянную доску, покрытую холстом, к оторванной пастой наклоняли с постоянной скоростью 15% от веса тела. Затем их помещали на квадратную проволочную сетку (30 × 30 см, размер ячеек 1 см, диаметр проволоки 1 мм). Проволочную сетку с мышью переворачивали вверх дном и разместили на высоте 50 см. Стартовали эксперименты и время, пока мышь не упала был измерен.

## 2.7. Измерение митохондриальной ДНК

Митохондриальную ДНК определяли по методу Hengen et al. [28]. Тотальный митохондриальный ДНК экстрагировали из 25 мг камбаловой мышцы с помощью NucleoSpin® Tissue. Полученную митохондриальную ДНК использовали для определения экспрессии митохондриальной ДНК (мтДНК) и геномной ДНК (гДНК) с помощью qPCR в реальном времени. Специфичные праймерами, использованными для ядерного гена липопротеинлипазы, были 5'-GGATGGACGGTAAGAGTGATTC-3' (прямой) и 5'-ATCCAAGGGTAGCAGACAGGT-3' (обратный). Специфичные праймерами, использованными для митохондриальной ДНК гена субъединицы I НАДН-дегидрогеназы, были 5'-CCCATTCGCGTTATTCTT-3' (прямой) и 5'-AAGTTGATCGAACGGAAGC-3' (обратный). Отношение числа митохондрий рассчитывали по отношению к спрессии митохондриальной ДНК гена к ядерному с использованием метода ΔΔCt.

## 2.8. Определение содержания гликогена

Содержание гликогена определяли по методу Lo et al. [29]. К камбаловой мышце (20 мг) или C2C12 пропитывали 1 мл 30% (масса/объем) КОН и инкубировали при 100°C в течение 15 минут. После инкубации экстракт добавляли 2 мл этанола. И инкубировали при 4°C в течение 5 минут. Затем экстракт центрифugировали (500×g, 4 °C,

7 мин) иудаляли супернатант. После достояния въскания гранул содержание гликогена измеряли фенол-сернокислотным методом, а затем нормализовали по массе к амбаловидной мышцы ишлическому клеткам.

## 2.9. Определение уровня МА в крови

Через 4 недели после ПК собирали кровь и центрифугировали (200×g, 4°C, 10 минут). Полученный супернатант использовали для измерения уровня LA в крови с помощью юнабора 2 для колориметрического анализа лактата.

## 2.10. Анализ мРНК в камбаловидной мышце мыши C2C12

Тотальный ньюРНК экстрагировали из камбаловидной мышцы (25 мг) или C2C12, и тот носительные уровни экспрессии мРНК оценивали с использованием нашего ранее описанного метода [8]. Использовались следующие специфические праймеры IL-6, 5'-TCTACCACTTCA CAAGTCGGA-3' (прямой) и 5'-GAATTGCCATTGCACAACCTTT-3' (обратный), TNF- $\alpha$ , 5'-GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG-3' (прямой) и 5'-TGCCACAAGCAGGAATGAGA-3' (обратный); у которых оценивалось пролиферативное пероксидазом (PGC)-1 $\alpha$ , 5'-TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT-3' (прямой) и 5'-CCACTTCAATCCACCCAGAAAG-3' (обратный); рецептор остеопротеина, активируемый пролиферацией пероксидазом (PPAR)- $\gamma$  1, 5'-GGAAGACCCTCGCATTCTT-3' (прямой) и 5'-GTAATCAGCAACCATTGGGTCA-3' (обратный); гликогенсинтаза (Gs) 1, 5'-TCCTGGCCCAGAACGAAAGA-3' (прямая) и 5'-TGAGTGGTGAAGATGGTGCC-3' (обратная); и гликозидаза дегидрофосфатдегидрогеназа (GAPDH), 5'-ACCTCAACTACATGGTCTAC-3' (прямая) и 5'-TTGTCATTGAGAGCAATGCC-3' (обратная). Уровни экспрессии мРНК оценивались по отношению к экспрессии гена GAPDH с использованием  $\Delta\Delta Ct$

метода.

## 2.11. Воспаление в C2C12, индуцированное LPS

Эксперимент проводили, как описано ранее [28, 30]. Вкратце, C2C12 индуцировали для дифференцировки с помощью юКРЕ (10 мкг/мл) или РМФ (соединение 1-8, 10 мкМ) в течение одной недели. Затем клетки культивировали с 1 мкг/мл LPS или LA в течение 1 часа. Собирали клетки и выделяли общуюРНК. Относительные уровни экспрессии мРНК общего интерлейкина (IL)-6 и фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$  исследовались с использованием ОТ-ПЦР.

## 2.12. статистический анализ

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SE. Для статистического сравнения экспериментальных данных *in vivo* был проведен один-way дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим t-тестом Уэлча. Достоверность различий от исходных данных (0 недель) обозначали\*: P < 0,05, \*\*: P < 0,01, а от контроля

обозначено как  $\dagger : P < 0,05$ ,  $\ddagger : P < 0,01$  соответственно. Тест *in vivo* проводили на 15 мышах в каждой группе. Однако одна мышь, получившая КРЕ, умерла в ST на 4-й неделе. Поэтому статистический анализ проводили на 15 мышах для контрольной группы и 14 мышах для группы КРЕ. Тот же самый метод, который описан выше для экспериментальных данных *in vivo*, использовали для статистического сравнения экспериментальных данных *in vitro*.

### 3. Результаты

#### 3.1. КРЕ подавлял снижение мышечной выносливости, вызванное утомлением в CST

КРЕ перорально вводили мышам в течение 4 недель, а мышечную выносливость оценивали в периоды 0, 1, 2 и 4 недели. В каждой группе было 15 мышей, различий между контрольной группой и группой КРЕ в определяемых исходных значениях (0 ч) не наблюдалось (рис. 3). Однако по результатам второго измерения (0,5 или 1 ч)

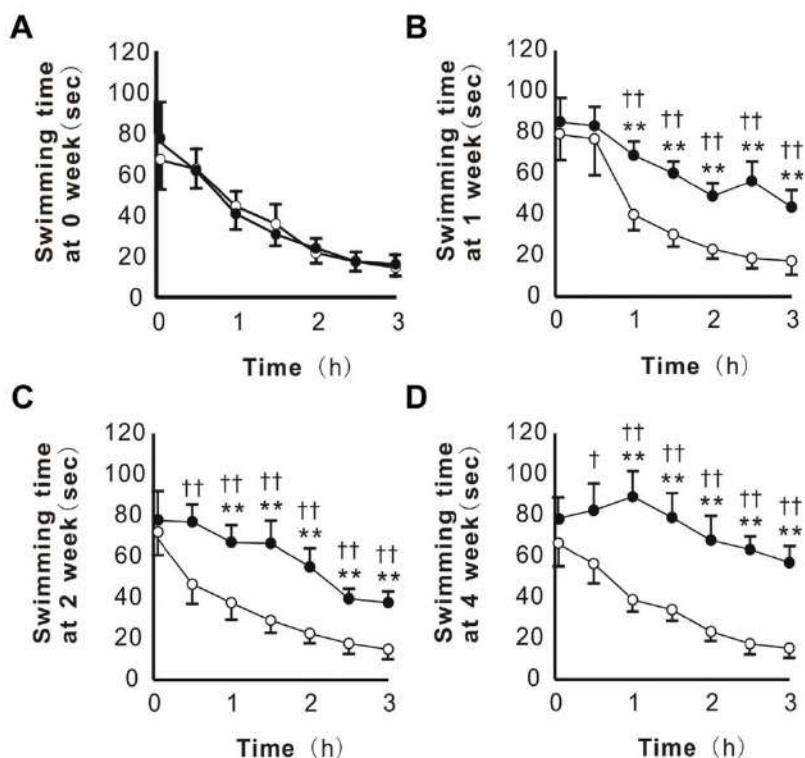


Рис. 3. КРЕ повышенной мышечной выносливости в teste последовательного вынужденного плавания (КСП). КСТ выполняли на 0-й (А), 1-й (Б), 2-й (С) и 4-й (Д) неделях. Согласно рис. 1Б, ST повторяли с 30-минутными интервалами, время плавания измеряли всего 7 раз. Каждая точка соответствует среднему значению с SE (контроль;  $n = 15$ , КРЕ;  $n = 14$ ). Незакрашенный кружок (\*) для контрольной группы закрытый кружок (•) для группы КРЕ. Звездочки коммюнике отмечены отдельно от исходного значения (0 неделя) при \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$  соответственно. К индикаторам обозначены отдельно от контроля в  $\dagger : P < 0,05$ ,  $\ddagger : P < 0,01$  соответственно.

уменьшение времени плавания было меньше в группе КРЕ, чем в контольной группе (рис. 3В-Д). Это подтверждено с 1-недельного периода и стало более четким в зависимости от времени (рис. 3В-Д). При определении 4-недельного периода продолжительность плавания для последнего измерения (3 ч) сократилась только на 27% по сравнению с первым измерением в группе КРЭ, в то время как в контольной группе оно сократилось на 78% (рис. 3Д), что указывает на усиление мышечной выносливости и/or быстрое восстановление после утомления, связанного с плаванием, в группе КРЕ.

### 3.2. КРЕ улучшил показатели физической подготовки и физкультурную

Показатели физической подготовки и физкультуры были исследованы чтобы обнаружить эффекты КРЕ через 2 дня после CST. В ST, который вызывал у мышей достоинство, усталость, время плавания было немного больше в группе КРЕ, чем в контольной группе, начиная с 1-недельного периода (рис. 4А). В тесте открытое поля, выполненного до ST

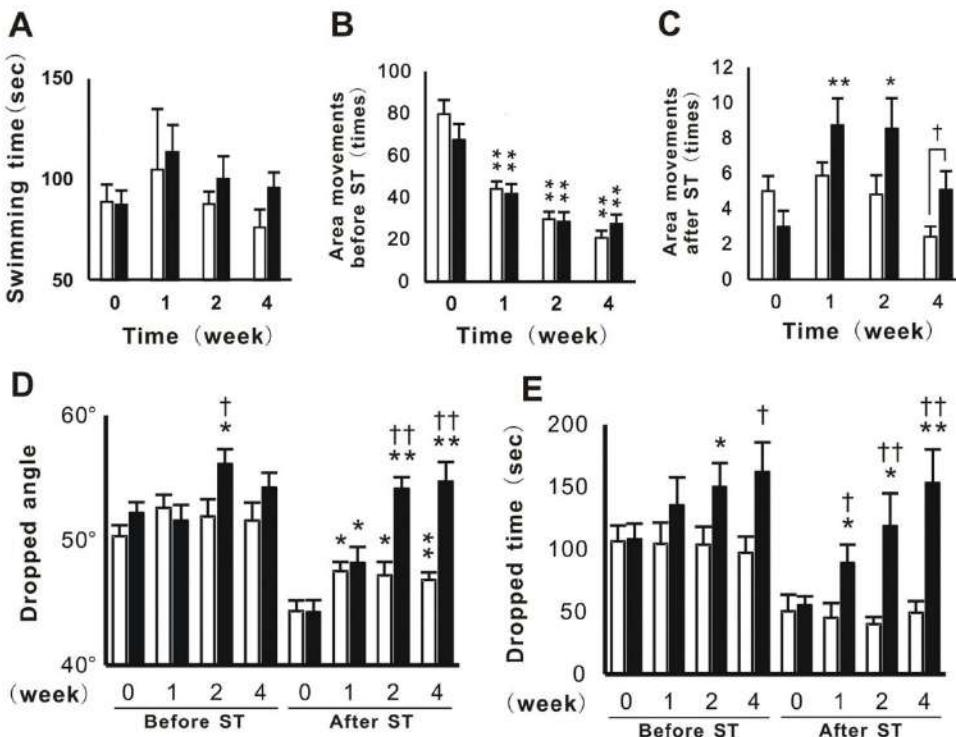


Рис. 4. Повышение физической подготовленности КРЕ с усталостью нагрузкой или без нее. Были проведены тесты измерения физической подготовленности (PT), состоящие из теста принудительного плавания (ST, А), теста в открытом поле (Б и С), теста с наклонной пластиной (Д) и теста на подвещивание на проволоке (Е). Столбцы предстают собой открытое поля (Б) и после (В) ЗТ укачивали отдельно. Каждый столбец представляет среднее значение с SE (контроль,  $n = 15$ , КРЕ,  $n = 14$ ). Звездочки означают наличие различий между исходным результатом и (0 неделя) при \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$  соответственно. Контролем обозначены различия между линиями от контроля в т:  $P < 0,05$ ,  $\dagger$ :  $P < 0,01$  соответственно.

(рис. 4Б) к олич ест во движений в конт роле и К ПЭ в 1-, 2- и 4-недельном периодах были достоверно снижены по сравнению с показателями в 0-недельном периоде. Однако к олич ест во движений после СТ значительное увеличение было в группе КПЭ, но не в конт рольной группе на 1- и 2-недельных сроках (рис. 4В). Кроме того, к олич ест во движений после СТ было значительное увеличение в группе КПЭ через 4 недели (рис. 4С). В teste с наклонной пластиной углы падения были значительные в группе КПЭ, чем в конт рольной группе через 2 недели (рис. 4Д). Углы падения в группе КПЭ после СТ были такими же, как и до СТ в 2- и 4-недельные периоды (рис. 4Д). В teste на подвешивание на проволоке результаты были аналогичны результатам, полученным в teste на наклонной пластине, наблюдавшиеся в периоды от 1 до 4 недель. Из отчета, рассчитанного для времени падения после и до СТ, соотношение в группе КПЭ (96%) было почти вдвое на 4-недельном периоде (рис. 4Е), что указывает на увеличение силы захвата в группе КПЭ.

### 3.3. КПЭ и РМФ подавляли мышечное воспаление *in vitro* и *in vivo*.

В предыдущих экспериментах (рис. 3 и рис. 4) было показано, что КПЭ улучшает физическую работоспособность и мышечную выносливость *in vivo*. Поэтому мы попытались выяснить механизмы ответа на эти эффекты КПЭ. Этот спрессионный РНК оценивали по соотношению воспаления, а именно экспрессии IL-6 и TNF- $\alpha$  в камбаловидной мышце. Результаты показали, что уровень экспрессии мРНК IL-6 (фиг. 5А) и TNF- $\alpha$  (фиг. 5В) были ниже в группе КПЭ, чем в конт рольной группе.

Таким образом, противовоспалительные эффекты КПЭ могут способствовать улучшению физической формы мышечной выносливости.

Противовоспалительные эффекты КПЭ и РМФ были исследованы *in vitro* с использованием ранее опубликованного метода [30]. LPS и LA использовались для индукции мышечного воспаления. Уровни экспрессии мРНК IL-6 и TNF- $\alpha$  повышались под действием LPS, но не под действием LA (данное не поддается объяснению). Увеличение уровня экспрессии мРНК, индуцированное LPS, было слегка подавлено в клетках, культура которых с КПЭ. По аналогичной методике исследовали РМФ – соединения 1–8, выделенные из КФЭ. КПЭ и соединения 1, 2 и 8 значительное подавляли индуцированное LPS, увеличивая уровень экспрессии мРНК IL-6 (фиг. 5С) и TNF- $\alpha$  (фиг. 5Д). Соединения 3, 7 и 8 подавляли экспрессию мРНК TNF- $\alpha$ .

### 3.4. КПЭ увеличивает количество витамина D и снижает уровень LA в крови *in vivo*

Чтобы исследовать вклад механизмов, отличных от антиоксидантной активности, в улучшение физической работоспособности и мышечной выносливости, влияние КПЭ на метаболизацию оценивали по соотношению витамина D в крови. Часто касается ся витамина D в организме, так как он регулирует концентрацию кальция в крови.

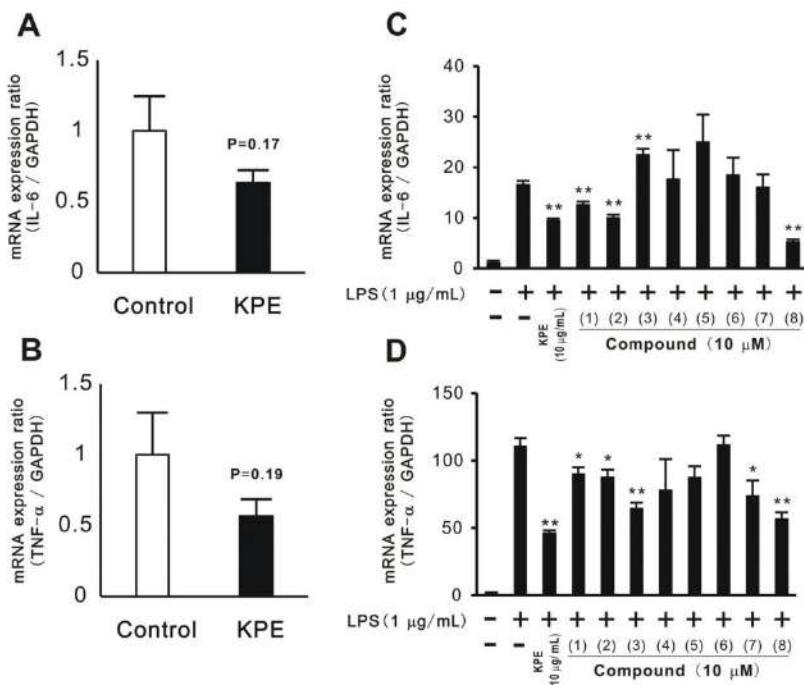


Рис. 5. КРЕ и РМФ подавляли мышечное воспаление *in vivo* и *in vitro*. СуммарнуюРНК экстрагировали из к амбаловидной мышцы мыши после завершения тестов по измерению физической активности и. ЭкспрессиюРНК IL-6 (А) и TNF-α (Б) оценивали с помощью юПЦР в реальном времени. С2С12, дифференцированный с КРЕ (10 мкг/мл), и соединения 1–8 (10 мкМ) культуры инфицировали с LPS (концентрация 1 мкг/мл) в течение 1 часа. Тогда суммарнуюРНК экстрагировали из клеток и оценивали экспрессиюРНК IL-6 (С) и TNF-α (Д). Каждый образец представляет среднее значение с SE (А и Б: n = 14, С и Д: n = 4). Звездочки обозначают статистическую значимость от контроля (А и Б) или контрола, полученного только с LPS (С и Д) при \*: p<0,05, \*\*: p<0,01 соответственно.

Число, отношение экспрессии митохондриальной ДНК к геномной ДНК было измерено. Результаты показали, что КРЕ увеличивает количество митохондриальной ДНК в к амбаловидной мышце (рис. 6А). Экспрессия мРНК PGC-1α, которая связана с митохондриальным биосинтезом, имеет тенденцию к увеличению при КРЕ (рис. 6В). Аналогичным образом оценивали экспрессиюРНК Gsy и гликоген. Результаты показали, что КРЕ имеет тенденцию к усиливать экспрессиюРНК Gsy (рис. 6С) и увеличивать содержание гликогена (рис. 6Д). Поэтому было высказано предположение, что КРЕ увеличивает количество митохондрий за счет усиления экспрессии PGC-1α и содержания гликогена за счет усиления экспрессии Gsy. Кроме того, КРЕ снижал уровень LA в крови (рис. 6Е).

### 3.5. РМФ способствовали накоплению гликогена *in vitro*.

Ранее мы сообщали, что РМФ в КРЕ увеличивали экспрессиюРНК переносчик глюкозы типа 4 (GLUT4) и PGC-1α. Поэтому здесь мы определили, влияют ли РМФ на накопление гликогена. ЭкспрессиюРНК Gsy измеряли в С2С12, обработанных КРЕ или РМФ. КРЕ и многие РМФ

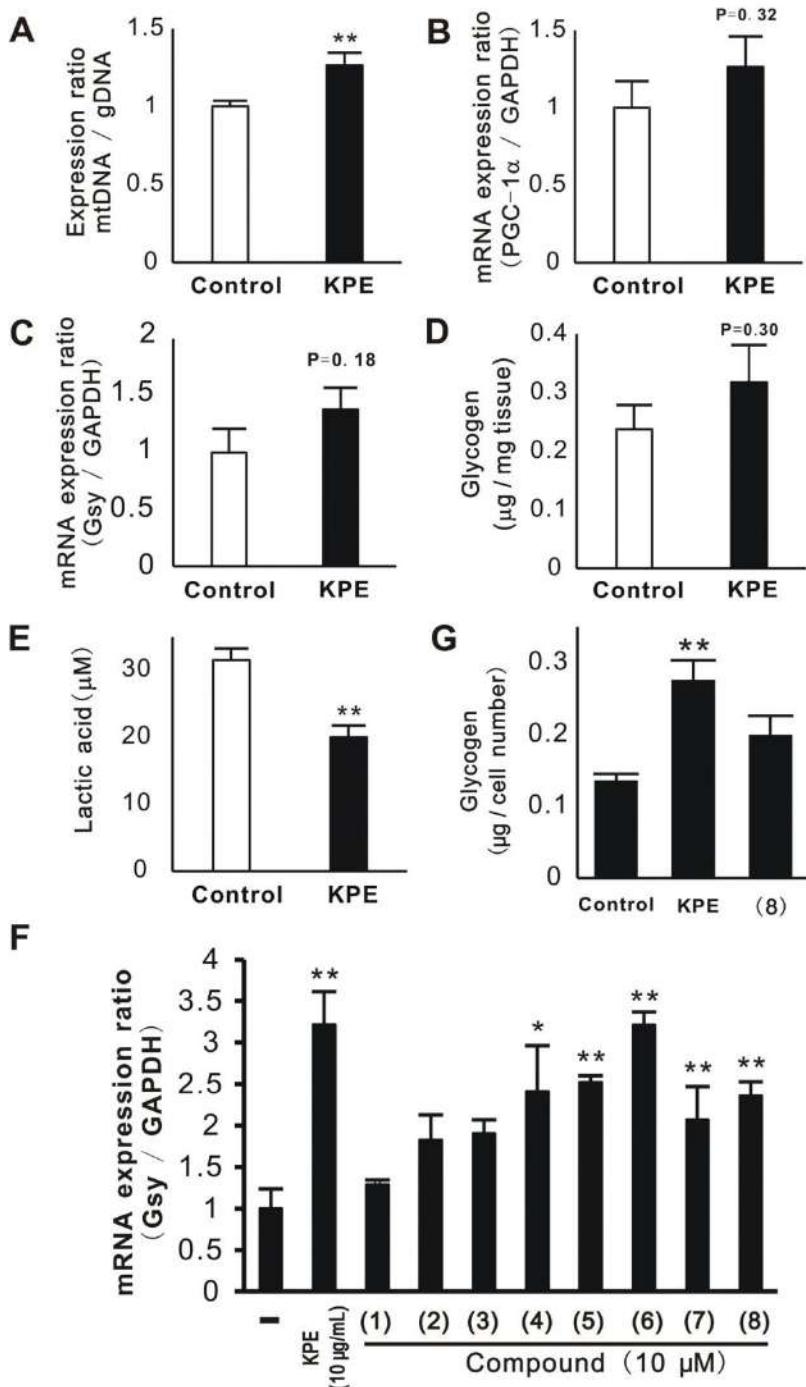


Рис. 6. Влияние КПЭ на митохондрии и гликоген *in vitro* и *in vivo*. Тотальная нуклеиновая кислота, мРНК и гликоген изолировали из камбаловидной мышцы мыши и C2C12, обработанный KPE (10 мкг/мл) или соединениями 1–8 (10 мкМ). *In vivo* (AE) общую ДНК очищали на предметике экспрессии митохондриальной ДНК (мтДНК) с использованием ПЦР в реальном времени (A). мтДНК нормализовали по экспрессии геномической ДНК (гДНК). Экспрессию мРНК PGC-1 $\alpha$  (B) и гликогенсинтазы (Gsy, C) очищали с помощью ПЦР в реальном времени. Мышечный гликоген определяли фенол-сернокислотным методом (D). Содержание гликогена нормализовали по массе тканей. Молочную кислоту крови (МК) измеряли с помощью юнабора (E).

(4, 5, 6, 7 и 8) значительность увелич илиэкспрессиоGsy (фиг. 6F). Затем оценивали влияние KPE и соединения 8 на содержание гликогена в C2C12. Соединение 8 было выбрано потому, что оно известно, что оно активирует AMPK [28].

KPE значительность увеличил содержание гликогена (рис. 6G), тогда как соединение 8 немного увеличил его содержание. Этот результат подтверждает, что PMFs в KPE способствуют накоплению гликогена.

#### 4. Дискussion

Результаты настоящего исследования показывают, что KPE повышает физическую работоспособность (рис. 4) и мышечную выносливость (рис. 3 и рис. 4). Вместе с наклонной глязмой идет подвещивание на проволоке после ST выносливость и работоспособность были лучше в группе KPE, чем в контролльной группе. Было предложено противовоспалительное действие и усиление энергетического метаболизма в качестве механизмов, с помощью которых оторвавшиеся KPE улучшают работоспособность. Следует отметить, что оценивали усиление экскрессии мРНК, связанное с воспалением и накоплением гликогена. Результаты показали, что KPE имеет тенденцию подавлять экспрессию мРНК IL-6 и TNF- $\alpha$  в камбаловидной мышце (рис. 5A, B) без существенных различий, наблюдаемых по сравнению с контролльной мышцей. Вместе с in vitro KPE подавляя экспрессию мРНК воспалительных факторов, индуцированных LPS. Когда PMF (1-8) исследовали с использованием того же метода, было обнаружено, что 1, 2 и 8 значительность подавляют экспрессию мРНК IL-6 и TNF- $\alpha$ . KPE продемонстрировал ингибирующую тенденцию от ношения экспрессии мРНК IL-6 и TNF- $\alpha$  в исследованиях in vivo. Чтобы объяснить это, необходимо выделить наименее исследование противовоспалительного эффекта KPE в мышцах с большими различиями в мышцах. Что касается повышающей регуляции GLUT4 и PGC-1 $\alpha$ , 2 и 8 оказывали аналогичные сильные эффекты [27]. Следует отметить, что 3'- и 4'-метоксигруппы могут не быть необходимыми для этого актива.

Ранее сообщали, что PMF, включая KPE, активировали AMPK [27]. Было показано, что активаторами AMPK, такими как AICAR, повышают физическую работоспособность и мышечную выносливость in vivo [27]. Было обнаружено, что длительное лечение AICAR увеличивает накопление гликогена и усиливает окисление жирных кислот в скелетных мышцах у крыс с дефицитом инсулина [31], в то время как другой активатор, C24 снижал уровень глюкозы в жирных кислотах в крови мыши db/db с диабетом [32]. Так же сообщалось, что AMPK играет важную роль в уменьшении воспаления и резистентности к инсулину [33]. Этот результат подтверждается с настолько же результатами наших предыдущих выводами о членстве имбре. KPE и PMF, особенно соединение 8, способствовали поглощению липидов накоплению

---

In vitro (F, G) экспрессии мРНК Gsy оценивали с помощью юПЦР в реальном времени (F) и определяли содержание гликогена (G). Содержание гликогена в этих клетках нормализовали по различиям в клетках. Каждый отдельный представляет собой среднее значение с SE (in vivo: контролльная роль: n = 15, KPE: n = 14, in vitro: n = 4). Звездочки указывают статистическую значимость от контроля от контролльной роли, \*: P < 0,05, \*\*: P < 0,01 соответственно.

гликоген, акт ивац ия мит охондрий и увеличение ч исла мит охондрий (рис. 6 и наши предыдущие результаты [8]). Кроме того, сообщалось, что КРЕ подавляет увеличение массы яичника, как оплоднение висцеральной жировой, дисфункциональный метаболизм липидов, гиперинсулинемию и резистентность к инсулину, гипертонию и периферическую артериальную гипертензию мышцы TSOD [1]. Следует отметить, что акт ивац ия АМРК с помощью юКРЕ может способствовать этому. Этот механизм является результатом действия физической активности подогрева и выносливости. Акт ивац ия АМРК пищевыми ингредиентами отличается от акт ивац ии такими лекарствами, как AICAR и C24. Применение яичного имбиря в качестве нового подхода к профилактике заболеваний является многобenefициальным из-за его безопасности и эффективности происхождения в качестве пищи [34].

Были проведены линические исследования яичного имбиря, в которых отсутствие сообщалось об улучшении физической активности и способности к физической активности [6, 7] и повышении активности антиоксидантных ферментов (повышение активности супeroxиддисмутазы глутатионпероксидазы и каталазы сыворотки) и снижение МДА. Уровень был предложен в качестве одного из механизмов физической активности яичного имбиря [7]. Так же сообщалось о стимулировании пот ребления энергии за счет акт ивац ии яичного имбиря в бурой жировой ткани [35]. Таким образом, яичный имбирь может быть поддающимся ингредиентом для улучшения физической формы мышечной выносливости и усталости и имеет антиоксидантные свойства. С другой стороны хорошо известно, что легкие физические упражнения оказывают такое же влияние на здоровье, как и КРЕ [36, 37, 38, 39, 40].

Мы считаем, что яичный имбирь станет полезным ингредиентом в обработанных пищевых продуктах и пищевых добавках, которые будут иметь эффект для физических упражнений и укрепления здоровья.

## Декларации

### Заявление о вкладе автора

Казуя Тода: задумал и разработал эксперимент; Провел эксперимент; Проанализировал и интерпретировал данные; Предоставленные реагенты; материяльные инструменты; Анализ или данные; Написал бумагу.

Shoketsu Hitoe: Провел эксперимент; Проанализировал и интерпретировал данные; Написал бумагу.

Сёго Такэда: Провёл эксперимент

Хироши Симода: задумал и спроектировал эксперимент; Проанализировал и интерпретировал данные; Написал бумагу.

### Заявление о финансировании

Это исследование не получило никакого либо специального гранта от финансирующих агентов в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

## Заявление о конкурирующих интересах

Все авторы имеющие отношение к этому исследованию являются сотрудниками компании Oryza Oil and Fat Chemical Co., Ltd. (Япония). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с этой рукописью.

## Дополнительная информация

Дополнительная информация по данному документу отсутствует.

использованная литература

- [1] T. Akase, T. Shimada, S. Terabayashi, Y. Ikeya, H. Sanada, M. Aburada, Эффекты против ожирения Kaempferia parviflora у мышей со спонтанным ожирением, страдающих диабетом II типа, J. Nat. Med. 65 (2011) 73–80.
- [2] Т. Симада, Т. Хорикава, ЮИкеки, Х. Мацуо, К. Киношита, Т. Тагучи, К. Ичиносе, К. Такахаси, М. Абурада, Профилактика действий на ноги экстракта Kaempferia parviflora и его основных компонентов полиметоксифлавонOIDов на метаболические заболевания, Fitoterapia 82 (2011) 1272–1278.
- [3] C. Ruijanawate, D. Kanjanapothi, D. Amornlerdpison, S.J Pojanagaroon, Противовенальный эффект Kaempferia parviflora, J. Ethnopharmacol. 102 (2005) 120–122.
- [4] В. Кусиригин, С. Сричайратанакул, П. Лерттаракарннон, Н. Лайлэрд, М. Суттаджит, К. Джайканг, К. Чайясут, Антиоксидантная активность: полифенольное содержание и антигликозидное действие некоторых эфирных масел венских растений, традиционно используемых при диабете. Больные, мед. хим. 5 (2009) 139–147.
- [5] Г. Чатупранин, С. Чайякул, В. Верават напакул, Т. Йимпламай, К. Pholpramool, Повышение активности адреналина у самцов крыс с помощью ягод анольного экстракта Kaempferia parviflora и физическая упражнений, Andrologia 44 (2012) 323–328.
- [6] К. Промтея, В. Кхагиничонг, Б. Шрипанидкулай, У. Чатчаван, Влияние экстракта Kaempferia parviflora на физическую форму футбольистов: рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, Мед. науч. Монит. Базовое разрешение 21 (2015) 100–108.
- [7] Дж. Ваттанатанорн, С. Мучимагура, Т. Тонг-Ун, Н. Сэнхонг, В. Тухумми, Б. Шрипанидкулай, Положительный эффект модуляции 8-недельного лечения Kaempferia parviflora на связанные со здоровьем физическую форму и окислительную способность у взрослых добровольцев пожилого возраста, Evid. Дополнение на основе. Альтернативный. Мед. 2012 (2012) 732816.

- [8] К. Тода, С. Такеда, С. Хигоэ, С. Накамура, Х. Мацуда, Х. Симода, Повышение выработки энергии экстрактом чеснока имбиря, содержащим полиметоксифлавонOIDЫ в миокардах за счет улучшения метаболизма глюкозы молочной кислоты и липидов, Дж. Нат. Мед. 70 (2015) 163–172.
- [9] WM Fletcher, Молочная кислота в мышцах амфибий, J. Physiol. 35 (1907) 247–309.
- [10] H. Westerblad, JD Bruton, J. Lannergren, Влияние внутреннего рН на сократительную функцию мышц: отдельные волокна мышц мыши снижаются при повышении температуры, J. Physiol. 500 (1997) 193–204.
- [11] CM Stary, MC Hogan, Внутренний рН во время последовательных сокращений в изолированных одиночных волокнах скелетных мышц Xenopus, J. Appl. Физиол. 99 (2005) 308–312.
- [12] OB Nielsen, F. de Paoli, K. Overgaard, Защитное действие молочной кислоты на производство силы скелетных мышц, J. Physiol. 536 (2001) 161–166.
- [13] TH Pedersen, OB Nielsen, GD Lamb, DG Stephenson, Внутренний рН ацидоз повышает способность работоспособности мышц, Science 305 (2004) 1144–1147 гг.
- [14] TG Favero, Высвобождение Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматической мембраны и мышечная усталость, J. заявл. Физиол. 87 (1999) 471–483.
- [15] OB Nielsen, T. Clausen, Насос Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> защищает способность сократимости мышц во время упражнений, Exerc. Спортивная наука. Ред. 28 (2000) 159–164.
- [16] Д.Г. Аллен, А.А. Каббара, Нк. Вестерблад, Мышечная усталость: роль внутреннего запаса кальция, Сап. Дж. Заявл. Физиол. 27 (2002) 83–96.
- [17] Р. Ванденбум, Миофibrillлярный комплекс и усталость: обзор, Кан. Дж. заявл. Физиол. 29 (2004) 330–356.
- [18] С.К. Пауэрс, Л.Л. Джи, А.Н. Каваис, М.Дж. Джексон, Активные формы ислорода: влияние на скелетные мышцы, Compr. Физиол. 1 (2011) 941–969.
- [19] HR Gosker, AM Schols, Мышечная усталость при ХОБЛ, но нет финишной четырехминутного зрения, евро. Дыхание Журнал 31 (2008) 693–694.
- [20] Дж. Финстерер, Биомаркер усталости периферических мышц во время тренировки, ВМС Опорно-двигательный аппарат. Беспорядок. 13 (2012) 218.
- [21] X. Liu, G. Wu, D. Shi, R. Zhu, H. Zeng, B. Cao, M. Huang, H. Liao, Влияние оксида азота на нейро-мышечную передачу воспалительного реагента, Int. Дж. биол. науч. 11 (2015) 156–167.

- [22] BB Kahn, T. Alquier, D. Carling, DG Hardie, AMP-активированная протеинкиназа: древний индикатор орнитогенетики дает ключ к современному пониманию метаболизма, *Cell Metab.* 1 (2005) 15–25.
- [23] DG Hardie, BE Schaffer, A. Brunet, AMPK: путь восприятия энергии с несколькими входами и выходами, *Trends Cell Biol.* 26 (2016) 190–201.
- [24] И.В. Астаратенкова, В.А. Рогозкин, Участие AMPK в регуляции метаболизма скелетных мышц, *Росс Физиол ЖИМ ИМ Сеченова* 99 (2013) 657–673.
- [25] H. Nasri, M. Rafieian-Kopaei, Metformin: Current Knowledge, *J. Res. Med. Sci.* 19 (2014) 658–664.
- [26] С.К. Малин, С.Р. Каширская, Влияние метформина на потеюшеса: потенциальная роль механизма *Curr. мнение Эндокринол. Диабет Ожирение*. 21 (2014) 323–329.
- [27] В. А. Наркап, М. Даунс, Р. Т. Юэ. Эмблер, ЮХ. Ван, Э. Банайо, М. М. Михайлова, М.С. Нельсон, ЮЗоу, Х. Джугилон, Х. Канг, Р. Дж. Шоу, Р. М. Эванс, Агонисты AMPK и PPAR $\delta$  являются миметиками упражнений, *Cell* 134 (2008) 405–415.
- [28] TM Henagan, WT Cefalu, DM Ribnicky, RC Noland, K. Dunville, W. У. Кэмбелл, Л.К. Стюарт, Л.А. Форни, Т.В. Геттис, Дж.С. Чанг, компакт-диск Моррисон, Влияние диетического фактора верцетина и богатого кверцетина на иномекстракт ракта к расногого лука *in vivo* на миграцию охондрий скелетных мышц, метаболизм и чувствительность к инсулину, *Genes Nutr.* 10 (2015) 2.
- [29] С. Ло, Дж. Рассел, А. В. Тейлор, Определение гликогена в малых тканях. образцы *J. Appl. Физиол.* 28 (1970) 234–236.
- [30] RA Frost, GJ Nystrom, CH Lang, Липополисахарид и провоспалительные цитокины стимулируют экспрессию интегральной мембранных белков C2C12: роль Jun NH2-контрольной киназы Ат. Дж. Физиол. Регул. интегр. Комп. Физиол. 285 (2003) R1153–R1164.
- [31] К. Ф. Витцель, Г. Бикопулос, С. Хунг, К. Е. Пистор, Дж. Д. Паттерсон, Р. Кури, Р.Б. Седдида, Хроническое лечение активающим АМФ-киназой AICAR повышает риск определения гликогена и снижение жировых кислот в скелетных мышцах, но не снижает гипергликемию и гипергликемию при дефиците инсулина, *PLoS One* 8 (2013) e62190.
- [32] YY Li, LF Yu, LN Zhang, BY Qiu, MB Su, F. Wu, DK Chen, T. Пань, М. Гу, В. Чжан, В. П. Ма, Х. В. Цзян, Дж. И. Ли, Ф. Дж. Нан, Дж. Ли, Новый низкомолекулярный активатор AMPK перорально не оказывает благоприятное воздействие на мышцы db/db с диабетом, *Toxicol. заявление. Фармакол.* 273 (2013) 325–334.

- [33] S. Liong, M. Lappas, Активация AMPK улучшает воспаление и резистентность к инсулину в жировой ткани и скелетных мышцах беременных женщин, *J. Physiol. Biochem.* 71 (2015) 703–717.
- [34] P. Sudwan, K. Saenphet, S. Saenphet, S. Suwansirikul, Влияние *Kaempferia parviflora* Wall. пример Бейкеро сек сальвой активности самцов крыс и ее токсичности, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 37 (2006) 210–215.
- [35] M. Мацусита, T. Ёнеширо, C. Аига, T. Камия, H. Кусаба, K. Ямагути, K. Такагаки, T. Камея, X. Сугие, M. Сайто, Экстракт *Kaempferia parviflora* улучшает все тело расход энергии у человека: роль бурой жировой ткани, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 61 (2015) 79–83.
- [36] A. Pingitore, GP Lima, F. Mastorci, A. Quinones, G. Iervasi, C. Vassalle, Упражнения и окислительный стресс: потенциальный антиоксидантный эффект в спорте, *Nutrition* 31 (2015) 916–922.
- [37] JF Horowitz, S. Klein, Липидный обмен во время упражнений на выносливость, *Am. J. Clin. Endocrinol.* 172 (2000) 558C–563C.
- [38] H.A. Джонсон, C.P. Стэннард, M.B. Томпсон, Мышечный тонус при гликогене в упражнениях на выносливость: последствия для производительности, *Sports Med.* 34 (2004) 151–164.
- [39] FB Stephens, SD Galloway, Карбонат и окисление жиров, *Nestlé Nutr. Inst. Maastricht Ser.* 76 (2013) 13–23.
- [40] Б.К. Педерсен, Б. Салтин, Упражнения как лечение — доказательства назначения упражнений в качестве терапии при 26 различных хронических заболеваниях, *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* 25 (Приложение 3) (2015) 1–72.