

## СТРЕСС-ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИПРИМА

В. Г. Спрыгин, Н. Ф. Кушнерова, Т. Н. Гордейчук, С. Е. Фоменко<sup>1</sup>

Исследовано влияние полифенольного препарата диприма из гребней дальневосточного винограда на углеводный и липидный обмен печени при стрессе у крыс. Показано, что препарат обладает антистрессорным свойством, которое определяется входящими в его состав биологически активными природными полифенолами. Полифенольные структуры, выступая в качестве буферной окислительно-восстановительной системы в условиях стресса, дают возможность сохранения метаболических реакций липидно-углеводного обмена и создания в печени резерва окисленных формы никотинамидного кофермента НАД<sup>+</sup>, что способствует снятию тканевой гипоксии. Антиоксидантные свойства полифенолов диприма обуславливают сохранение фосфолипидного спектра плазматических мембран гепатоцитов.

**Ключевые слова:** стресс, полифенолы, катехин, углеводный метаболизм, липидный метаболизм

### ВВЕДЕНИЕ

Перспективными корректорами метаболических нарушений, возникающих при различных воздействиях на организм, в том числе при стрессовых, являются природные полифенольные соединения [17]. Богатым источником растительных полифенолов являются отходы переработки винограда [2]. Препарат, зарегистрированный под торговой маркой “диприм” (Рег. № 98717823 от 10.11.98) представляет собой водно-спиртовое извлечение из гребней (кисти после отделения ягод) дальневосточного винограда (патент № 1072309 от 09.10.98 г.). Более 50 % сухого остатка составляют полифенольные соединения, основным компонентом которых является катехино-проантоцианидиновый комплекс, характерный для гребней всех сортов винограда [19].

Целью настоящего исследования явилось изучение биохимических механизмов, которые лежат в основе нарушения реакции адаптации, а также возможности коррекции метаболических изменений при стрессе комплексом полифенолов, входящих в состав диприма.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат готовили на 40% этиловом спирте, в процессе реперколяции на 1кг сырья выход экстракта составлял 1 л. Суммарное содержание полифенолов, содержащих пирокатеховую группировку, определяли посредством осаждения ацетатом свинца и спектрофотометрически с помощью реактива Фолина-Дениса [2]. Катехино-проантоцианидиновый комплекс выделяли с использованием обращенно-фазовых патронов Sep-Pak C18 (Waters, МI, США) [19]. Тонкослойную хроматографию катехинов и процианидинов осуществляли на пластинках Сорбофил (Россия) в системе растворителей толуол:ацетон:уксусная кислота (30:30:10 по объему) [19]. В качестве стандартов использовали катехин (ICN, США), эпикатехин (ICN, США), пикногенол (“Sigma”, США).

Эксперимент проводили на белых крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе

питания. Стресс вызывали подвешиванием животных за шейную складку на 24 ч. Экстракт животным вводили внутрь в дозе 0,4 мл/100 г массы 2 раза в сутки (до подвешивания и через 4 часа после подвешивания). Животные были разделены на три группы по 10 крыс в каждой: 1-я — контрольная (интактные животные), 2-я — стресс, 3-я — стресс + диприм. Крыс умерщвляли путем декапитировали.

В гомогенате печени определяли содержание лактата [5], пирувата [8], концентрацию никотинамидного кофермента НАД<sup>+</sup> [15], активность лизосомального фермента бета-галактозидазы [6]. Соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН рассчитывали по величинам концентраций лактата и пирувата [1]. Уровень перекисного окисления оценивали по содержанию малонового диальдегида [22]. Экстракт общих липидов из ткани печени готовили по методу J. Folch и соавт. [11]. Приготовление силикагеля и пластинки для микротонкослойной хроматографии проводили согласно [20]. В качестве разделяющей системы для микротонкослойной хроматографии использовали смеси растворителей [18]. Идентификацию фосфолипидных фракций на хроматограммах проводили методами [3, 18, 21]. Количество полученных фракций фосфолипидов выражали в процентах от суммарного их содержания. Хроматографическое распределение нейтральных липидов и их количественное определение проводили методом одномерной тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей гексан-серный эфир-уксусная кислота в соотношении 90:10:1 (по объему) [9]. Обнаружение пятен нейтральных липидов осуществляли с помощью паров йода. Результаты выражали в процентах от суммы всех фракций.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование химического состава диприма (спиртовый экстракт из гребней винограда) показало наличие суммарной полифенольной фракции в количестве 3,5 мг/мл или 60% от сухого остатка исходного экстракта. Тонкослойная хроматография полученной полифенольной фракции в присутствии катехина и пикногенола в качестве свидетелей определила присутствие катехино-проантоцианидинового комплекса [19]. Полученные результаты обусловили выбор дозы диприма в количестве 4 мл (14 мг) на кг массы, так как, согласно данным литературы, это допустимая суточная доза [16]. Подвешивание крыс за шейную складку вызывало у них типичную картину стресса: гипертрофию надпочечников на 85% ( $14,75 \pm 1,73$  мг против  $7,99 \pm 0,55$  мг в контроле,  $p < 0,01$ ), появление язв в

<sup>1</sup> Государственное учреждение Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, 690041, ул. Балтийская, 43.

желудке ( $3,8 \pm 0,2$  ед./животное). В печени снижалось количество окисленной формы кофермента НАД<sup>+</sup> на 23% ( $0,2 \pm 0,02$  мкмоль/г против  $0,26 \pm 0,02$  мкмоль/г в контроле,  $p < 0,05$ ). Уменьшение величины соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН с 402 в контроле до 312 при стрессе указывает на смещение окислительно-восстановительного равновесия и снижение энергетического потенциала, что приводит к ряду изменений в организме, характеризующихся как состояние тканевой гипоксии. Подтверждением данного предположения является увеличение лактата на 38% ( $3,49 \pm 0,12$  мкмоль/г против  $2,53 \pm 0,1$  мкмоль/г в контроле,  $p < 0,001$ ). Тот факт, что при стрессе отмечается повышение количества пирувата на 7% ( $0,121 \pm 0,005$  мкмоль/г против  $0,113 \pm 0,002$  мкмоль/г в контроле,  $p < 0,01$ ), по нашему мнению, обусловлен блокированием превращения пировиноградной кислоты в ацетил КоА.

В печени крыс наблюдалось увеличение концентрации свободных жирных кислот на 13% ( $p < 0,05$ ), что может быть связано с активизацией липолиза в жировой ткани вследствие увеличения продукции катехоламинов, которое характерно для развития стресс-реакции (табл. 1). Увеличение содержания триацилглицеринов в печени на 10% ( $p < 0,001$ ), по-видимому, происходит за счет их ресинтеза из жирных кислот и глицерина, мобилизуемых при липолизе. Уменьшение содержания эфиров жирных кислот на 24% ( $p < 0,01$ ) и эфиров холестерина на 10% ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ) свидетельствует о нарушении этерифицирующей функции печени, а также синтеза и катаболизма липопротеидов. Возрастание содержания лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтаноламина в 1,5–2 раза ( $p < 0,001$ ) обусловлено активацией фосфолипазы А2, что согласуется со снижением количества фосфатидилхолина на 22% ( $p < 0,001$ ,  $n = 10$ ) и фосфатидилэтаноламина на 8% (табл. 2). Стресс-подвешивание активировало

реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ). Величина малонового диальдегида (МДА) в печени возрастала в 2 раза ( $101 \pm 11,6$  мкмоль/г против  $50 \pm 7,2$  мкмоль/г в контроле,  $p < 0,01$ ). Обнаруженные изменения в липидном составе способствуют “разрыхлению” мембран и повышению их проницаемости [13]. В пользу этого свидетельствует увеличение активности матричного фермента лизосом β-галактозидазы на 20% ( $0,195 \pm 0,007$  мкмоль/мин/г против  $0,163 \pm 0,005$  мкмоль/мин/г в контроле,  $p < 0,01$ ), что является чувствительным тестом, свидетельствующим о патологических изменениях в тканях, а конкретно, об их деструкции [4]. Повышение содержания фосфатидилсерина на 15% ( $p < 0,01$ ) и фосфатидилинозита на 26% ( $p < 0,01$ ) при стрессе соответствует известным в литературе данным [7]. Эти фосфолипиды влияют на реализацию гормональных эффектов через аденилатциклазную систему, запускающую каскад химических реакций липолиза при стрессе. Уменьшение количества дифосфатидилглицерина на 37% ( $p < 0,001$ ) — основного фосфолипида мембран митохондрий — указывает на угнетение процессов синтеза АТФ.

При введении экспериментальным животным диприма (3-я группа) в период стресса наблюдалась коррекция биохимических нарушений, им обусловленных. На 15%, по сравнению с “чистым” стрессом, уменьшилась масса надпочечников, что составляло  $12,6 \pm 0,42$  мг. Практически отсутствовали язвы слизистой желудка ( $0,4 \pm 0,01$  ед./животное), что объясняется присутствием в диприме полифенолов, которые способны встраиваться в плазматические мембраны клеток и увеличивать их жесткость за счет образования внутримембранных мостиков [10]. Нормализовалось содержание окисленной формы НАД<sup>+</sup> ( $0,26 \pm 0,01$  мкмоль/г), что связано, по нашему мне-

Таблица 1. Влияние диприма на содержание нейтральных липидов в печени крыс при стрессе (в % от суммы;  $M \pm m$ )

Фракции фосфолипидов	Группы животных		
	1-я — контроль	2-я — стресс	3-я — стресс + диприм
Триацил-глицерины	$19,69 \pm 0,24$	$21,75 \pm 0,43^B$	$18,95 \pm 0,21^C$
Свободные жирные кислоты	$14,67 \pm 0,34$	$16,65 \pm 0,61^B$	$14,94 \pm 0,37^Г$
Эфиры жирных кислот	$16,82 \pm 1,02$	$12,73 \pm 0,76^B$	$17,43 \pm 0,81^A$
Холестерин	$15,99 \pm 0,42$	$16,69 \pm 0,34$	$16,65 \pm 0,73$
Эфиры холестерина	$19,42 \pm 0,61$	$17,49 \pm 0,60^A$	$17,60 \pm 0,89$
Остаточная фракция	$13,24 \pm 0,67$	$14,85 \pm 1,27$	$14,34 \pm 0,75$

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 различие статистически значимы по сравнению: <sup>A, B, B</sup> — с контролем; <sup>Г, Д, Е</sup> — со 2-й группой при: <sup>A, Г</sup> —  $p < 0,05$ ; <sup>Б, Д</sup> —  $p < 0,01$ ; <sup>Б, С</sup> —  $p < 0,001$ .

Таблица 2. Влияние диприма на фосфолипидный состав печени крыс при стрессе (в % от суммы;  $M \pm m$ )

Фракции фосфолипидов	Группы животных		
	1-я — контроль	2-я — стресс	3-я — стресс + диприм
Фосфатидилхолин	$39,23 \pm 1,45$	$30,54 \pm 0,85^B$	$42,34 \pm 1,90^C$
Лизофосфатидилхолин	$4,48 \pm 0,31$	$8,98 \pm 0,29^B$	$4,25 \pm 0,38^C$
Сфингомиелин	$6,43 \pm 0,46$	$7,70 \pm 0,23^A$	$6,70 \pm 0,26^A$
Фосфатидилэтаноламин	$22,53 \pm 1,0$	$20,69 \pm 0,28$	$21,57 \pm 0,90$
Лизофосфатидилэтаноламин	$3,63 \pm 0,36$	$8,92 \pm 0,65^B$	$3,46 \pm 0,27^C$
Фосфатидилсерин	$4,6 \pm 0,16$	$5,27 \pm 0,166$	$4,32 \pm 0,13^Г$
Фосфатидилинозитол	$8,35 \pm 0,64$	$10,50 \pm 0,426$	$8,50 \pm 0,72^Г$
Фосфатидная кислота	$3,34 \pm 0,28$	$2,78 \pm 0,35$	$3,49 \pm 0,24$
Дифосфатидилглицерин	$7,45 \pm 0,31$	$4,71 \pm 0,23^B$	$5,37 \pm 0,12^Г$

нию, со способностью полифенольных соединений к процессу, называемому “семихинонной осцилляцией” [12], позволяющей им выступать в качестве универсальной буферной емкости, которая акцептирует или донирует протоны и электроны, обуславливая регуляцию окислительно-восстановительного баланса организма. Увеличение соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН до 442 предполагает восстановление реакций аэробного гликолиза. Подтверждением этому является снижение количества лактата до  $2,2 \pm 0,21$  мкмоль/г и пирувата до  $0,108 \pm 0,001$  мкмоль/г, что на 37 и 11% ( $p < 0,001$ ), соответственно, меньше таковых величин при стрессе без введения препарата. В пользу этого положения свидетельствует также более высокое содержание ДФГ (на 14% выше, чем во 2-й группе;  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ) необходимого для функционирования ферментов дыхательной цепи. Снижение содержания СЖК до контрольных величин может быть обусловлено ингибированием липаз полифенолами диприма [14]. В связи с этим уменьшилось количество лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтаноламина в среднем на 53 – 61% ( $p < 0,05$ ) при одновременном возрастании содержания фосфатидилхолина на 39% ( $p < 0,001$ ). Увеличение количества эфиров жирных кислот на 37% ( $p < 0,001$ ) свидетельствует о сохранении этерифицирующей функции печени и биосинтеза фосфолипидов. Полифенолы диприма, являясь “ловушками” свободных радикалов [12], в значительной степени снижали процесс перекисного окисления липидов, что подтверждается уменьшением содержания МДА в печени до  $64 \pm 8,2$  мкмоль/г. Способность полифенолов встраиваться в плазматические мембраны клеток, подавляя в них процессы перекисного окисления и увеличивая их жесткость [10], обусловила сохранение величин фосфатидилсерина, фосфатидилинозина, фосфатидной кислоты, а также активности β-галактозидазы на уровне контрольных значений.

## ВЫВОДЫ

1. Растительный препарат диприм обладает антистрессорным свойством, которое определяется входящими в его состав биологически активными природными полифенолами.

2. Полифенольные структуры, выступая в качестве буферной окислительно-восстановительной системы в условиях стресса, дают возможность сохранения метаболических реакций липидно-углеводного обмена и

создания в печени резерва окисленной формы никотинамидного кофермента НАД<sup>+</sup>, что способствует снятию тканевой гипоксии.

3. Антиоксидантные свойства полифенолов диприма обуславливают сохранение фосфолипидного спектра плазматических мембран гепатоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Ермолаева, *Регуляция глюконеогенеза в онтогенезе*, Наука, Москва (1987).
2. М. Н. Запроматов, *Основы биохимии фенольных соединений*, Высшая школа, Москва (1974).
3. Т. Кейтс, *Техника липидологии*, Москва (1975).
4. Н. Н. Маянская, Л. Е. Панин, А. Николаев, С. Д. Маянская, *Вопр. мед. хим.*, **36**(6), 5 – 8 (1990).
5. Р. В. Меркурьева, Г. Л. Билич, Р. П. Нарциссов, *Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и ферментных систем различной клеточной локализации*, Июшкар-Ола (1982).
6. А. А. Покровский, А. Г. Пономарева, *Ферментные методы анализа*, Москва, (1969), сс. 471 – 472.
7. Я. Х. Туракулов, Т. С. Саатов, *Биохимия липидов и их роль в обмене веществ*, Москва, (1981), сс. 139 – 146.
8. В. В. Умбрайт, *Манометрические методы изучения тканевого обмена*, Москва (1951).
9. J. S. Amenta, *J. Lipid Res.*, **5**(2), 270 – 272 (1964).
10. A. Arora, T. M. Byrem, M. G. Nair, and G. M. Strasburg, *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**(1), 102 – 109 (2000).
11. J. Folch, M. Less, and G. H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.*, **226**(1), 497 – 509 (1957).
12. W. F. Hodnick, B. Kalyanaraman, C. A. Pritsos, and R. S. Pardini, *Basic Life Sci.*, **49**, 149 – 152 (1988).
13. B. H. Juurlink and P. G. Paterson, *J. Nat. Prod.*, **62**(3), 441 – 444 (1999).
14. K. Kawaguchi, T. Mizuno, K. Aida, and K. Uchino, *Biosci. Biotechn. Biochem.*, **61**(1), 102 – 104 (1997).
15. M. Klingenberg, *Methods of Enzymatic Analysis*, **4**, New York (1963), 528 – 538.
16. J. Kuhnau, *World Rev. Nutr. Diet*, Hamburg, (1976), 117 – 191.
17. A. J. Parr and G. P. Bolwell, *J. Sci. Food Agric.*, **80**(7), 985 – 1012 (2000).
18. G. Rouser, G. Kritchevsky, and A. Yamamoto, *Lipid Chromatographic Analysis*, New York, (1967), 99 – 162.
19. B. Sun, C. Leonardo, J. M. Ricardo da Silva, and I. Spranger, *J. Agric. Food Chem.*, **46**(4), 1390 – 1396 (1998).
20. V. I. Svetashev and V. E. Vaskovsky, *J. Chromatography*, **67**(2), 376 – 378 (1972).
21. V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, and I. M. Vasenden, *J. Chromatography*, **114**(1), 129 – 141 (1975).
22. K. Yagi, *Biochem Med*, **15**(2), 212 – 216 (1976).

Поступила 07.06.2001

## ANTISTRESS PROTECTOR EFFECT OF DIPRIM

V. G. Sprygin, N. F. Kushnerova, T. N. Gordeichuk, and S. E. Fomenko

Department of Biochemical Technologies, Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far East Division, Russian Academy of Sciences, ul. Baltiiskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia

Diprim, a polyphenol preparation from crests of Far-Eastern grape species, influences the carbohydrate and lipid metabolism in liver of rats subjected to stress. The drug possesses antistress properties determined by the biologically active natural polyphenol derivatives. Playing the role of a buffer redox system under the stressed conditions, the polyphenol structures provide for the possibility of retaining the carbohydrate and lipid metabolism in rat liver and creating a reserve of the oxidized form of nicotinamide NAD<sup>+</sup> coenzyme, which favors removal of the tissue hypoxia. The antioxidant properties of polyphenols from diprim preserve the phospholipid spectrum of the plasmic membranes of hepatocytes.