

ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ, ОТРИМАНИХ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ, НА АЗОТИСТИЙ МЕТАБОЛІЗМ

Л.М.Вороніна, А.Л.Загайко, Г.Б.Кравченко, Л.М.Соловйова*

Національний фармацевтичний університет
Національний інститут винограду і вина “Магарач”*

Ключові слова: насіння винограду; поліфеноли; стрес; адреналін; метаболізм амінокислот

Досліджено вплив попереднього введення поліфенольних екстрактів, отриманих з насіння винограду різних сортів, на розвиток модельної стрес-реакції за введення адреналіну. Показано, що введення адреналіну піддослідним щурам супроводжується характерними змінами метаболізму амінокислот, спрямованими на адаптацію, постачання джерел енергії та активацію енергетичного обміну. Ці зміни можуть бути причиною розвитку ендотеліальної дисфункції при стресі. За таких умов профілактичне застосування поліфенольних комплексів винограду значно полегшувало несприятливі метаболічні зміни, що відображалося в зниженні інтенсивності катаболічних процесів та проявів цитолізу. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок про значну протекторну активність досліджених екстрактів.

Роль стресу як фактора етіології та патогенезу атеросклерозу, виразкових уражень слизової оболонки шлунка (СОШ) і дванадцятипалої кишки, порушень функцій серця, печінки, вторинних імунodefіцитних станів, онкологічних захворювань у теперішній час доведена численними дослідженнями.

Механізм стресу полягає в тому, що у відповідь на незвичайні ситуації зовнішнього середовища порушення адренергічних центрів головного мозку викликає значне збільшення секреції рилізінг-факторів, гормонів і вивільнення нейромедіаторів. Спочатку гіпоталамус (ГТ) активує секрецію гормонів гіпофізу, надалі зростає вихід катехоламінів з адренергічних терміналей і наднирників, а надалі кортикостероїдів з наднирників [7, 10].

Адаптивний ефект складається з мобілізації енергетичних і

структурних ресурсів організму, що виражається збільшенням у крові концентрації глюкози, жирних кислот, нуклеотидів, амінокислот, а також мобілізацією функцій дихання і кровообігу.

Адреналін, що накопичується у крові, проникає у адренореактивні елементи заднього ГТ та приводить до активації гіпоталамо-гіпофізарно-кортикоадреналової системи, утворення кортикотропін-реалізуючого фактора, виділення адренкортикотропного гормону (АКТГ), кортикостероїдів, а також соматотропних та тиреоїдних гормонів. Як наслідок порушення тканинного метаболізму, дефіцит енергії приводить до вторинних метаболічних зрушень, у тому числі активує вільнорадикальне окиснення (ВРО) у клітині [9].

Особливий інтерес представляють дані про зміни обміну катехоламінів в ініціальному періоді

стресу у зв'язку з їх роллю в якості “пускових” факторів, що активують гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальну систему.

Разом з тим звичайні моделі стресу не дозволяють відокремити складові загальної реакції організму, тому для з'ясування внеску адреналової системи в розвиток стрес-реакції необхідно використовувати безпосереднє введення адреналіну.

Матеріали та методи

У роботі використовували безпородних щурів-самців масою 180-220 г, що утримувалися у віварії Національного фармацевтичного університету. Тваринам протягом 15 діб щодня перорально вводили поліфенольні екстракти з насіння винограду сортів “Каберне”, “Мерло”, “Ркацителі” та “Рислінг”, що містять близько 25 г поліфенолів у літрі та отримані в Національному інституті винограду і вина “Магарач” у заздалегідь підібраних ефективних дозах (в перерахунку на поліфеноли — 9 мг на 100 г ваги тіла). Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину.

Л.М.Вороніна — доктор біол. наук, професор, завідувачка кафедри біологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Л.М.Соловйова — канд. техн. наук, завідувачка лабораторії переробки відходів виноробства Національного інституту винограду і вина “Магарач” (м. Ялта)

Таблиця 1

Вплив профілактичного введення поліфенольних екстрактів, отриманих з насіння винограду, на активність аргінази в печінці та нирках щурів при одноразовому введенні адреналіну ($M \pm m$, $n=36$)

| Група | Сироватка крові | Гомогенат печінки | | Гомогенат нирок | |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|-----------------------------|--|
| | аргінін, мкмоль/л (г) | аргінін, мкмоль/л (г) | аргіназа, мкмоль сечовини/хв на мг білка | аргінін, мкмоль/л (г) | аргіназа, мкмоль сечовини/хв на мг білка |
| Інтакт | 68,05±0,86 | 6,13±0,17 | 0,83±0,06 | 48,33±1,13 | 0,59±0,03 |
| Адреналін | 27,66±1,38 ^a | 4,39±0,34 ^a | 1,87±0,05 ^a | 67,93±0,79 ^a | 0,87±0,06 ^a |
| Адреналін + ПК "Каберне" | 48,23±0,86 ^{a b c} | 5,97±0,18 ^{b c} | 1,19±0,03 ^{a b c} | 41,02±0,31 ^{a b c} | 0,74±0,03 ^{a b c} |
| ПК "Каберне" | 66,80±0,37 | 6,12±0,24 | 0,82±0,03 | 48,06±0,16 | 0,61±0,02 |
| Адреналін + ПК "Ркацителі" | 44,69±0,37 ^{a b c} | 5,32±0,22 ^{a b c} | 1,56±0,02 ^{a b c} | 53,69±0,49 ^{a b c} | 0,72±0,02 ^{a b c} |
| ПК "Ркацителі" | 71,26±0,29 | 5,89±0,18 | 0,87±0,02 | 48,84±0,38 | 0,59±0,02 |

Примітки:

- 1) ^a — $p \leq 0,05$ відносно інтакту;
- 2) ^b — $p \leq 0,05$ відносно відповідного контролю;
- 3) ^c — $p \leq 0,05$ відносно стресу.

Нейрогенний стрес моделювали одноразовим підшкірним введенням адреналіну в дозі 2 мг на 100 г маси тіла [3]. Тварин декапітували через 1 годину після ін'єкції. Усі маніпуляції з тваринами проводили під хлоралозо-уретановим наркозом. Дослідження проводилися відповідно до національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985).

Кров збирали для одержання сироватки. Вміст сечовини визначали за кольоровою реакцією з діацетилмоноксимом (набір реактивів фірми "Felicit" (Україна)). Вміст креатину — за методом Егглтона [4], рівень креатиніну — методом за допомогою кольорової реакції Яффе (метод Поппера та ін.) [2] (набір реактивів фірми "Felicit" (Україна)). Визначення вмісту аргініну проводили за реакцією Сакагучі [6], цитруліну — за методом Горнола та Хантера [1]. Активність аргінази визначали за методом Шорма та Швейцера [5]. Вміст загального білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера [11].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

Як видно з отриманих нами даних (табл. 1), введення тваринам значних доз адреналіну викликало істотне зниження вмісту аргініну в крові та печінці та його зростання в нирках. Разом з тим активність аргінази в печінці зростала в 2,25 рази, а в нирках — на 47%. Падіння вмісту аргініну в печінці і крові може пояснюватися його розщепленням аргіназою, на користь чого свідчить і зростання вмісту сечовини (табл. 2). В нирках активація аргінази також супроводжується зростанням рівня сечовини, тому зростання вмісту аргініну в цій тканині можна пояснити порушенням співвідношення між його утворенням в орнітиновому циклі і розщепленням. На користь цього свідчить і значно більша кількість цитруліну в нирках та більш значне, ніж у печінці та крові, питоме зниження його вмісту (табл. 2).

У той же час цитрулін не тільки є попередником аргініну в орнітиновому циклі, а й продуктом NO-синтазної реакції, тому зни-

ження вмісту цієї амінокислоти може свідчити також про зниження утворення оксиду нітрогену та бути проявом ендотеліальної дисфункції при введенні адреналіну.

Ендотеліальна дисфункція характеризується порушенням синтезу NO або збільшенням його руйнування. Можливими негативними наслідками цього процесу є вазоконстрикція, агрегація тромбоцитів, адгезія лейкоцитів і проліферація гладком'язових клітин [12, 14].

Адреналін не тільки чинить пряму дію на тонус судин, але також індукує агрегацію тромбоцитів. Зокрема, цей гормон має здатність стимулювати дію інших індукторів агрегації в екстремальних чи патологічних умовах. Тому коли рівень адреналіну в крові підвищується, цей механізм активації тромбоцитів може ставати істотним фактором тромбоутворення. Крім того, в екстремальних ситуаціях (сильний емоційний стрес, гостра кровотеча і т.п.), коли концентрація адреналіну в крові підвищується в десятки разів, може виявлятися його взаємодія з α -адренорецепторами судин і переважати судинозвужувальні реакції [13].

Ще одним ефектом, який спостерігається при введенні адре-

Таблиця 2

**Вплив профілактичного введення поліфенольних екстрактів,
отриманих з насіння винограду, на вміст деяких небілкових нітрогеновмісних сполук
у сироватці крові та органах шурів за умов введення адреналіну ($M \pm m$, $n=36$)**

| Група тварин | Показник | | | |
|----------------------------|---|---|------------------------------|------------------------------------|
| | сечовина, ммоль/л (мкмоль/г тканини) | цитрулін, мкмоль/л (нмоль/г тканини) | креатин, мкмоль/л (г) | креатинін, мкмоль/л (г тканини) |
| Сироватка крові | | | | |
| Інтакт | 8,15±0,24 | 41,39±2,38 | 75,34±0,44 | 68,40±3,31 |
| Адреналін | 9,16±0,21 ^a | 22,06±2,65 ^a | 22,69±0,70 ^a | 139,68±7,68 ^a |
| Адреналін + ПК "Каберне" | 8,94±0,14 ^{a b c} | 33,33±1,87 ^{a b c} | 48,24±0,71 ^{a b c} | 85,81±1,28 ^{a b c} |
| ПК "Каберне" | 8,37±0,11 | 40,96±1,89 | 76,32±0,62 | 70,01±1,31 |
| Адреналін + ПК "Ркацителі" | 8,35±0,13 ^{b c} | 28,91±1,53 ^{a b c} | 38,18±0,49 ^{a b c} | 61,73±1,96 ^{b c} |
| ПК "Ркацителі" | 8,01±0,09 | 41,03±1,17 | 77,02±0,27 | 71,31±1,89 |
| Гомогенат печінки | | | | |
| Інтакт | 5,94±0,17 | 21,40±1,86 | 425,24±0,84 | 59,33±1,96 |
| Адреналін | 10,18±0,31 ^a | 11,46±1,13 ^a | 200,77±0,92 ^a | 82,62±6,08 ^a |
| Адреналін + ПК "Каберне" | 7,84±0,09 ^{a b c} | 17,22±1,18 ^{b c} | 255,45±2,11 ^{a b c} | 70,78±1,67 ^{a b c} |
| ПК "Каберне" | 6,09±0,15 | 21,74±1,64 | 428,78±2,33 | 60,99±1,62 |
| Адреналін + ПК "Ркацителі" | 8,21±0,09 ^{a b c} | 16,14±0,92 ^{a b c} | 203,95±2,87 ^{a b c} | 73,28±2,07 ^{a b c} |
| ПК "Ркацителі" | 5,91±0,15 | 21,79±1,44 | 430,31±3,44 | 58,13±1,57 |
| Гомогенат нирок | | | | |
| Інтакт | 20,19±1,22 | 103,61±12,17 | Не досліджували | |
| Адреналін | 31,75±0,39 ^a | 71,92±1,62 ^a | | |
| Адреналін + ПК "Каберне" | 25,17±1,09 ^{a b c} | 85,95±1,19 ^{a b c} | | |
| ПК "Каберне" | 21,58±0,55 | 100,09±2,81 | | |
| Адреналін + ПК "Ркацителі" | 26,53±1,26 ^{a b c} | 83,70±1,28 ^{a b c} | | |
| ПК "Ркацителі" | 22,38±0,27 | 101,85±1,99 | | |

Примітки:

- 1) ^a — $p \leq 0,05$ відносно інтакту;
- 2) ^b — $p \leq 0,05$ відносно відповідного контролю;
- 3) ^c — $p \leq 0,05$ відносно стресу.

наліну, може бути активація енергетичного обміну, наслідком якого і виступає зростання інтенсивності реакцій орнітинового циклу, спрямованого на знешкодження продуктів транс/ дезамінування амінокислот.

Крім того, нестача аргініну за цих умов спричиняє дефіцит креатину, необхідного для утворення одного з джерел метаболічної енергії — креатинфосфату (табл. 2). Це тим більш ускладнює перебіг адаптивних реакцій, оскільки розпад креатинфосфату, очевидно, зростає, на що вказує збільшення рівня креатиніну в крові та печінці тварин.

Отже, введення високих доз адреналіну не лише спричиняє розвиток ендотеліальної дисфункції, а й провокує енергетичний голод, що може розглядатися як один з механізмів переключення метаболізму з вуглеводного типу на жировий за умов стресу.

Оскільки одним з важливих наслідків підвищення вмісту адреналіну в крові є активація вільнорадикального окиснення, становило інтерес дослідження впливу сполук з антиоксидантними властивостями на перебіг реакцій, спричинених введенням адреналіну. Особливо перспективним може бути дослідження спо-

лук, які володіють, поряд з антиоксидантною, фітоестрогенною активністю, оскільки протекторний вплив естрогенів на серцево-судинну систему добре відомий [8]. В експериментах на тваринах і в клінічних дослідженнях підтверджено, що зменшення вмісту естрогенів призводить до дисфункції ендотелю. Доведені позитивні ефекти естрогенів на ендотеліальну функцію, у тому числі стимуляція активності NO-синтази, збільшення базального рівня NO. Однак у літературі є неоднозначні дані про клінічну ефективність гормонозамісної терапії. Незважаючи на те, що естрогени виявляють ряд ен-

дотелій-залежних ефектів, пов'язаних з вазодилатацією і NO; відома також їхня протромботична і прозапальна дія, що може нейтралізувати інші позитивні ефекти [15]. Фітоестрогени можуть бути позбавлені цих негативних ефектів, що робить їх дослідження надзвичайно актуальним.

Проведені дослідження показують, що застосування поліфенольних комплексів, отриманих з винограду як червоних (Каберне), так і білих (Ркацителі) сортів, значно знижує прояви не-

сприятливих метаболічних змін за введення адреналіну.

Так, комплекс з насіння "Каберне" повністю нормалізував рівень аргініну та цитруліну в печінці, інші показники також змінювалися в напрямку нормалізації. Комплекс "Ркацителі" виявив дещо меншу, але порівнювану активність у відношенні досліджених показників: під його впливом нормалізувався вміст креатиніну та сечовини в крові; інші показники також відрізнялися від стресорних в бік нормалізації.

Привертає увагу і те, що вплив "Каберне" виявився більш істотним в області амінокислот, а "Ркацителі" — в області продуктів катаболізму, що може свідчити про дещо різні механізми впливу даних комплексів.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють зробити висновки про доцільність використання поліфенольних комплексів, отриманих з Винограду культурного, в комплексній профілактиці негативних наслідків стресу, в тому числі — ендотеліальної дисфункції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Асатиани В.С. *Биохимическая фотометрия*. — М: Изд-во АН СССР, 1957. — 645 с.
2. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х т.* — Мн: Беларусь, 2000. — Т. 1. — 495 с.
3. Куимов А.Д., Антонов А.Р., Николаев Л.И. и др. *Стресс, артериальная гипертензия, инфаркт миокарда*. — Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 1996. — 246 с.
4. *Практикум по биохимии / Под ред. С.Е.Северина, Г.А.Соловьевой*. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 509 с.
5. Ceyer J.W., Dabish D. // *Analytical biochemistry*. — 1971. — №39. — P. 412-417.
6. Gilboe D.D., William J.N. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1956. — №91. — P. 535-536.
7. Goldshtein D.S. // *Endocrine regulations*. — 2003. — Vol. 37. — P. 69-80.
8. Grady D., Rubin S., Pettiti D. // *Ann. Intern. Med.* — 1992. — №117. — P. 1016-1037.
9. Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. // *Arter. Thromb Vasc Biol.* — 2005. — №25. — P. 29-38.
10. McEwen B.S. // *Physiol. Rev.* — 2007. — №87. — P. 873-904.
11. Miller G.L. // *Anal. Chem.* — 1959. — Vol. 31, №5. — P. 964-966.
12. Moinard C., Cynober L. // *J. Nutr.* — 2007. — №137. — P. 1621-1625.
13. Ratheiser K.M., Brillon D.J., Campbell R.G. et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1998. — №68. — P. 1046-1052.
14. Shaikh A.K., Suryakar A.N. // *Biomed. Res.* — 2008. — Vol. 19, №3. — P. 211-214.
15. Williams J.K., Adams M.R. // *Nature Med.* — 1997. — №3. — P. 273-274.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 10.11.2009 р.