

УДК 616-072.7 + 54-39 + 581.48 + 634.836

В. Х. Мамиконян

**Функциональные особенности вновь выявленных соединений
антиоксидантного действия из семян различных сортов винограда,
культивируемых в Армении**

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 9/VI 2008)

Ключевые слова: *фосфолипиды, малоновый диальдегид, оксидативный стресс, четыреххлористый углерод, экстракт семян винограда*

Одной из наиболее актуальных проблем современной медико-биологической науки является недостаточная осведомленность об особенностях патобиохимических механизмов этиопатогенеза воспалительного поражения желудочно-кишечного тракта при интоксикациях различного происхождения (пищевых, промышленных, медикоментозных и пр.). Последние в значительной степени характеризуются своеобразием функциональных срывов указанных биологических систем организма и главным образом печени, проявляющихся преимущественно в виде циррозов и сопутствующих, подчас необратимых осложнений, связываемых нередко с расстройствами деятельности систем биохимического саморегулирования.

Установлена важная патогенетическая роль нарушений филогенетически стабилизированного постоянства в живых системах качественно-количественных соотношений фосфолипидов (ФЛ) различных категорий [1]. Дисбаланс, развиваемый в отмеченных сферах биологических систем, инициируется преимущественно глубиной ферментативных расстройств, главным образом повышением активности Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 (ФЛазы A_2). Последнее сопровождается интенсивно развиваемым деацилированием мембраносвязанных ФЛ-глицеридов, в основном фосфатидилхолинов (ФХ). Процесс деацилирования последних характеризуется массивным освобождением жирных кислот (ЖК) преимущественно полиенового ряда и большого

количества лизофосфатидилхолинов (ЛФХ). Активное вовлечение значительной части ЖК в реакции свободнорадикального окисления (СРО) липидов завершается образованием высоких концентраций продуктов их перекисления в виде моно-, ди- и триеновых конъюгатов, соединений типа Шиффа, гидроперекисей и конечного продукта процесса СРО – малонового диальдегида (МДА). Образовавшаяся триада продуктов деградации мембраносвязанных ФЛ в виде ЛФХ, ЖК и МДА представляет собой комплекс вредоносных факторов, обуславливающих инициацию, развитие и генерализацию воспалительных осложнений различных биологических систем организма, в том числе и печени, в качестве факторов, обладающих мощным мембранотоксическим мембранолитическим действием [2,3]. Многочисленными исследованиями установлена положительная роль ЛФХ в умеренно доминирующих концентрациях над верхней границей нормы, иммуностимулирующая роль этих соединений в активации процесса индукции интерферона в цельной крови и мозговой ткани экспериментальных животных и др. [4].

Цель настоящего исследования состояла в выявлении и изучении особенностей детоксицирующего действия активных начал антиоксидантного действия, локализованных в семенах винограда различных сортов, культивируемых в Армении, при воспалительном повреждении печени, вызванном четыреххлористым углеродом (CCl_4) в эксперименте. Подобная принципиально новая постановка вопроса стимулирует как поиск до сих пор неизвестных функционально наиболее результативных природных факторов антиоксидантного действия, так и внедрение особо важных биотехнологических разработок по синтезу оригинальных физиологически активных соединений с высоким уровнем терапевтической эффективности. В отмеченном плане следует отметить проведенные в последнее время в Армении исследования специфики нарушения энергетического баланса при указанной интоксикации, по-новому осмысливающие метаболическую роль выявленной армянскими учеными новой категории металлопротеинов как важнейших регуляторов кислородтранспортирующих систем на уровне клеточных и субклеточных образований [5] в норме и при цирротических повреждениях печени, спровоцированных CCl_4 [6-8]. Эти исследования, выполненные в унисон с изучением изменений эндогенных систем антирадикальной защиты клетки, аденилатзависимых ферментных комплексов, акцентируют их взаимосвязь с особенностями метаболических расстройств мембраносвязанных ФЛ [7,9,10], сопрягающихся с ультраструктурными и гистологическими нарушениями [11], регистрируемыми при CCl_4 -индуцированных циррозах печени (ЦП).

ЦП вызывали у 28 белых крыс-самцов массой 180-200 г внутрибрюшинной инъекцией CCl_4 из расчета 0.3 мл на весь вес 2 раза в неделю на протяжении 21 дня. Умерщвление животных производили методом декапитуирования под легким эфирным наркозом. Изоляцию головного мозга и печени, их декапсулирование и освобождение от кровеносных сосудов, а также получение мембран эритроцитов (МЭ) методом осмотического шока по Лимберу [12] производили на холоду в предельно ограниченные промежутки времени. Определение качественно-количественного состава ФЛ осуществляли методом одномерной восходящей хроматографии на силикагеле по Фолчу [13] в модификации Карагезяна [3], количественное определение МДА производили по Владимирову [15].

Таблица 1

Особенности качественно-количественных сдвигов фосфолипидов различных категорий (в %) в мозговой ткани белых крыс в контроле (К) при интоксикации CCl_4 и нормализующем действии экстрактов семян винограда (ЭСВ) на этом фоне

Показатели	Мозговая ткань				
	К	CCl_4	% от К	ЭСВ	% от К
Дифосфоинозитиды	6.3 ± 0.9	8.9 ± 0.9	+41.0	6.1 ± 0.9 *	-3.2
Монофосфоинозитиды	5.1 ± 0.5	7.3 ± 0.5	+43.0	5.0 ± 0.7 *	-2.0
Лизофосфатидилохолины	5.3 ± 0.9	22.9 ± 0.9	+332.0	9.5 ± 0.8	+79.2
Сфингомиелины	9.8 ± 0.9	13.3 ± 0.9	+35.7	10.3 ± 0.9 *	+5.0
Фосфатидилохолины	36.6 ± 1.1	16.4 ± 1.2	-51.2	31.8 ± 0.6 **	-13.1
Фосфатидилсерины	12.7 ± 0.7	9.3 ± 0.7	-27.3	13.4 ± 0.7 *	+5.5
Фосфатидилэтанол амины	16.3 ± 0.8	11.2 ± 0.8	-31.3	16.4 ± 0.8 *	+0.6
Кардиолипиды	4.8 ± 0.1	7.1 ± 0.2	+47.9	4.6 ± 0.2 *	-4.2
Фосфатидные кислоты	3.1 ± 0.3	3.6 ± 0.1	+16.0	2.9 ± 0.3 *	-6.5

Примечания. $n = 9$; без обозначений отклонения данных по CCl_4 и ЭСВ от контроля статистически достоверны; * – $p > 0.5$; ** – $p < 0.01$.

Изучение антирадикальных свойств активных начал семян винограда проводили в трех параллельных сериях опытов на 24 животных (по восемь

в каждой из них) с ярко выраженным CCl_4 -индуцированным оксидативным стрессом (ОС). Первой группе животных скармливали с пищей ежедневно 0.5 г порошка семян винограда, второй — 10-12 мл водных экстрактов последнего взамен воды, третьей одновременно давали то и другое в течение 20-21 дня. Приготовление водных экстрактов осуществляли тщательным растиранием в фарфоровой ступке 10 г порошка семян винограда с добавлением 200 мл дистиллированной воды.

Согласно данным, отраженным в табл. 1-3, ОС, индуцированный CCl_4 , характеризуется статистически достоверными качественно-количественными расстройствами индивидуальных представителей ФЛ в исследованных тканевых системах и МЭ с диаметрально противоположной направленностью и неодинаковой степенью выраженности. Это в основном касается отдельных фракций нейтральных ФЛ (НФЛ) и кислых ФЛ (КФЛ), среди которых особый интерес представляют лизопроизводные ФЛ-глицеридов и главным образом ЛФХ. Содержание последних по нашим наблюдениям на фоне CCl_4 -индуцированного ОС возрастает наиболее демонстративно в мозговой, затем печеночной тканях и в сравнительно меньшей степени в МЭ. Отмеченные сдвиги обусловлены многократным повышением активности ФЛазы A_2 , катализирующей два параллельно протекающих процесса: деацилирование ненасыщенных ЖК из структуры ФХ и одновременное образование ЛФХ. Эти соединения в комплексе с конечным продуктом СРО значительной части ЖК -- МДА участвуют в формировании высоких концентраций триады соединений мембранотоксического мембранолитического действия.

Из категории НФЛ не меньший интерес представляют и количественные изменения сфингомиелинов (СФМ), а также фосфатидилэтаноламинов (ФЭ). СФМ отводится не второстепенная роль в инициации, развитии и генерализации реакций тканевого и организменного иммунитета [14]. Заметное возрастание содержания этих липидов в исследованных биологических системах расценивается как одно из частных проявлений компенсаторно-приспособительной реакции организма в поддержании иммунной активности на тканевом и организменном уровне. Возрастание количественного содержания ФЭ в исследованных биологических объектах сопрягается с логически развиваемыми сдвигами в уровне фосфатидилсеринов (ФС). ФХ и ЛФХ при изучаемом болезненном состоянии организма. Как явствует из данных, отраженных в таблицах, уменьшение количества ФС в результате повышения активности ФС-декарбоксилазы ведет к образованию значительных концентраций ФЭ. Несмотря на это уровень последних не увеличивается, а, наоборот, убывает. Этот сдвиг мы склонны интерпретировать массивным вовлечением ФЭ как имевшихся, так и образовавшихся в результате

декарбоксилирования ФС в реакции метилирования, завершающиеся выходом значительного количества ФХ. Однако и в данном случае вопреки ожиданиям уровень последних не только не возрастает, а, наоборот, заметно убывает под действием, как указывалось выше, активировавшейся ФЛазы А₂, объективным подтверждением чего является чувствительное возрастание количества ЛФХ в результате деацилирования ФХ.

Таблица 2

Особенности качественно-количественных сдвигов фосфолипидов различных категорий (в %) в печеночной ткани белых крыс в контроле (К) при интоксикации ССl₄ и нормализующем действии экстрактов семян винограда (ЭСВ) на этом фоне

Показатели	Печеночная ткань				
	К	ССl ₄	% от К	ЭСВ	% от К
Монофосфоинозитиды	4.8±0.5	7.0±0.4	+45.8	4.6±0.4	-4.2
Лизофосфатидилолины	7.9±0.8	18.0±0.6	+127.8	11.7±0.5	+48.1
Сфингомиелины	11.0±0.9	16.2±0.7	+47.3	13.1±0.9	+19.1
Фосфатидилолины	35.6±1.1	26.6±1.0	-25.3	32.6±1.0	-8.4
Фосфатидилсерин	15.0±0.8	10.3±0.6	-31.3	13.8±0.7	-8.0
Фосфатидилэтанол амины	18.9±0.8	14.2±0.6	-25.0	18.1±0.7	-4.2
Кардиолипиды	6.8±0.2	7.7±0.3	+13.2	6.6±0.2	-3.0

Примечания. n = 9; объяснения те же, что и в табл.1.

Высокие концентрации ЛФХ под действием экстракта семян винограда наблюдаются во всех исследованных биологических системах. Согласно нашим многократным наблюдениям последние обладают ярко выраженным нормализующим действием на расстроенные звенья метаболизма ФЛ. При этом исключение составляют ЛФХ, уровень которых, хотя и подвергается заметному понижению по сравнению с тем, что наблюдается на фоне стабильно проявляющегося ССl₄-индуцированного ОС, тем не менее устанавливается на метке, статистически достоверно доминирующей над верхней границей нормы. Что касается остальных трех представителей КФЛ – монофосфоинозитидов (МФИ), кардиолипидов (КЛ) и фосфатидных кислот (ФК), то во всех случаях рассматриваемых ОС наблюдается количественное

возрастание указанных соединений. Учитывая глубину метаболических нарушений при ОС различной генерации, легко представить себе биологическую оправданность количественного возрастания МФИ, КЛ и ФК при изучаемой патологии как отражение адекватного подключения систем, ответственных за поддержание эндогенных механизмов антирадикальной защиты клетки и субклеточных образований. С отмеченной точки зрения трудно переоценить значение количественного возрастания МФИ, обеспечивающих бесперебойность процесса трансдукции внешнего сигнала внутрь клетки, а также роль КЛ и ФК как основных липидных регуляторов процессов митохондриального окисления и дыхания, что особенно важно при болезненных состояниях организма.

Таблица 3

Особенности качественно-количественных сдвигов фосфолипидов различных категорий (в %) в мембранах эритроцитов белых крыс в контроле (К) при интоксикации CCl_4 и нормализующем действии экстрактов семян винограда (ЭСВ) на этом фоне

Показатели	Мембраны эритроцитов				
	К	CCl_4	% от К	ЭСВ	% от К
Моноэсфосфоинозитид	4.2 ± 0.4	5.2 ± 0.4	+23.8	$4.3 \pm 0.3^*$	+2.4
Лизофосфатидилхолины	12.1 ± 0.5	26.1 ± 0.6	+115.7	18.5 ± 0.5	+52.9
Сфингомиелины	10.0 ± 0.5	15.0 ± 0.5	+50.0	$11.1 \pm 0.4^{**}$	+11.1
Фосфатидилхолины	34.7 ± 0.9	23.6 ± 0.9	-32.0	$29.4 \pm 0.8^{**}$	-15.3
Фосфатидилсеринны	14.5 ± 0.8	9.4 ± 0.8	-35.2	$12.9 \pm 0.7^*$	-11.0
Фосфатидилэтаноламины	18.4 ± 0.8	12.9 ± 0.7	-30.0	$17.5 \pm 0.8^*$	-5.2
Кардиолипиды	6.1 ± 0.3	7.8 ± 0.3	+27.9	$6.3 \pm 0.3^*$	+3.3

Примечания. $n = 10$; объяснения те же, что и в табл. 1.

Учитывая взаимообусловленность описанных качественно-количественных расстройств ФЛ различных категорий при отравлениях CCl_4 , сопровождающихся нарушениями интенсивности течения реакций СРО ЖК, изучались также особенности динамики перекисеобразовательного процесса по выходу МДА. Установлено, что CCl_4 -индуцированный ОС у белых крыс

характеризуется ярко выраженной интенсификацией течения СРО ЖК, приводящей к трехкратному возрастанию уровня МДА в печеночной ткани, двухкратному – в мозговой ткани и к 2.6-кратному в МЭ по сравнению с контрольными показателями. Примечательно при этом отчетливо проявляющееся ингибирующее воздействие на перекисеобразовательный процесс активных начал семян винограда, использованных как в виде порошка, скармливаемого животным с пищей, так и особенно в виде его водных экстрактов, используемых взамен воды. Однако как в первом, так и во втором варианте, несмотря на чувствительное ингибирование интенсивности течения СРО ЖК, уровень МДА продолжал статистически достоверно доминировать над нормой и приравнивался к последней с незначительными отклонениями лишь при сочетанном применении этих двух методических вариантов по принципам одновременно проводимой комбинированной антиоксидантотерапии.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют об исключительно высокой антиоксидантной активности факторов, обнаруживаемых в составе семян виноградов различных сортов, а также об их мощном регуляторном действии на расстроенные звенья реакций тканевого метаболизма ФЛ в условиях ОС, модулированного CCl_4 .

Научно-технологический центр органической
и фармацевтической химии НАН РА

В. Х. Мамиконян

Функциональные особенности вновь выявленных соединений антиоксидантного действия из семян различных сортов винограда, культивируемых в Армении

Выявлена исключительно высокая антиоксидантная активность соединений, обнаруженных в составе семян виноградов различных сортов. Полученные данные свидетельствуют об их мощном регуляторном действии на расстроенные звенья реакций тканевого метаболизма фосфолипидов в условиях оксидативного стресса, модулированного CCl_4 .

Վ. Խ. Մամիկոնյան

Նայաստանում բազմազվող խաղողի փարբեր փեսակների կորիզներում հայտնաբերված հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված նոր սիստեմային ֆունկցիոնալ ազդեցության առանձնահատկությունները

Հայտնաբերված է խաղողի փարբեր փեսակների կորիզների բաղադրության մեջ առաջացող հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված գործոնների բացառիկ օգտակարությունը: Ստացված արդյունքները վկայում են նշված նյութերի վառ արդիապատկան կանոնավորիչ դերի մասին CCl_4 -ով առաջացած թունավորումների հետեւանքով ֆոսֆոլիպիդային զգալի փոփոխությունների հիմքում ընկած որակա-քանակական խանգարումների ժամանակ: Վերը նշվածը վկայում է խաղողի լայնածավալ օգտակարության մասին ինչպես նորմալում, այնպես էլ, առավել եւս, փարբեր հիվանդագին վիճակների ժամանակ:

V. Kh. Mamikonyan

The Functional Specificities of Newly Reviewed Substances with Antioxidant Activity from Seeds of Different Sorts of Grapes Cultivated in Armenia

The data obtained have shown that grape seeds are the very important source for the big quantities of factors with antioxidant activity. According to the results of our investigations it was possible to demonstrate the regulatory role of substances mentioned in normalization of phospholipid metabolism and free radical peroxidation of lipids disorders in different biological systems of the organism under the conditions of oxidative stress developing by CCl_4 toxic action.

Литература

1. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л. Наука. 1981. 340 с.
2. Карагезян К.Г. - *Вопр. биохимии мозга*. Вып. 2. Изд. АН АрмССР. Ереван 1966. С.136-139.
3. Карагезян К.Г. *Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма*. Ереван. Изд. АН АрмССР. 1972. 267 с.
4. Goetzel E.J., Lynch K.R. - *Annals of the N. Y. Academy of Sciences*. 2002. V. 905. 357 p.
5. Симосян М.А., Симосян Г.М., Мелкоян Р.В. *Способ получения металлопротеинов*. Изобретение N 000610. Патентное управление. Ереван. 1996.
6. Маргарян А.С., Симосян А.А., Симосян М.А., Аветисян А.А. - *Доклады НАН Армении*. 2004. Т. 104. N2. С. 130-135.
7. Маргарян А.С., Симосян Г.М., Симосян А.А., Симосян М.А. - *Вопросы*

теоретической и клинической медицины, 2004. Т. 7. N1 (31). С. 3-7.

8. Маргарян А.С. Нарушение фосфолипидного и энергетического обмена при экспериментальном циррозе печени крыс и корректирующее действие антиоксидантных факторов. Автореф. канд. дис. Ереван. 2006. 26 с.

9. Карагезян К.Г., Маргарян А.С., Овсепян Л.М., Симосян А.А., Симосян Л.А., Батикян И.Г., Бадалян Р.Б. - Биол. ж. Армении. 2005. Т. 57. N3-4. С. 165-169.

10. Карагезян К.Г., Маргарян А.С., Овсепян Л.М., Симосян А.А. - Доклады ИАН Армении, 2005. Т. 105. N4. С. 390-394.

11. Меликсетян И.Б., Маргарян А.С., Абрамян С.С., Симосян Л.А., Бадалян Р.Б., Батикян И.Г., Симосян А.А. - Биол. ж. Армении. 2006. Т. 58. N1-2. С. 48-54.

12. Limber G.R., Davis R.F. - Blood. 1970. V. 36. P. 111-118.

13. Folch J., Lees M., Sloan-Stane J.A. - J. Biol.Chem. 1957. V. 226. P. 497-509.

14. Дятловицкая Э.В. - Иммунология. 1990. Т.14. N1. С. 27-79.

15. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. В кн.: Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. Наука. 1972. С. 241-243.