

УДК 615.076.9:57.017.73:633.31

Р. Ф. ЄРЬОМЕНКО

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ НА СТАН МЕМБРАННИХ БІЛКІВ ТА МЕМБРАН В УМОВАХ ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ

Наведені результати дослідження впливу екстракту з трави люцерни посівної (ЕТЛП) та препарату порівняння калію оротату на стан мембранних білків та мембран в умовах спонтанного гемолізу еритроцитів щурів за Jager F.C. та за активністю ферментів цитолізу. Встановлено, що превентивне введення ЕТЛП у дозах 25,50 і 100 мг/кг та калію оротату в дозі 180 мг/кг привело до покращення стану мембранних білків внаслідок нормалізації білкового обміну, стабілізації мембран еритроцитів, до достовірного зниження інтенсивності гемолізу та активності ферментів цитолізу АЛАТ та АсАТ у сироватці крові в порівнянні з тваринами ІК, що свідчить про їх значущу мембраностабілізуючу та цитопротекторну дію. ЕТЛП у дозі 25 мг/кг є потенційним коректором білкового обміну і краще в 1,4 рази за калію оротат здатен перешкоджати руйнуванню мембранних білків під час пошкодження мембран еритроцитів в умовах їх гемолізу та проявляє виражену мембраностабілізуючу і цитопротекторну дію.

Ключові слова: мембранні білки; еритроцити; екстракт люцерни; калію оротат; щури

ВСТУП

Відомо, що всі білки знаходяться в стані безперервного активного метаболізму — розпаду (катаболізму) та синтезу (анаболізму). Обміном білка забезпечується весь пластичний бік життєдіяльності організму, так як білки є безпосередньою складовою біологічних мембран, які представляють собою текучий фосfolіпідний бішар, в який занурені білки.

Складна динамічна структура біомембран, для якої характерні викривлення, фазові переходи, варіації товщини, утворення небезшарових структур, визначається специфічною взаємодією мембранних білків з ліпідами [1]. Така взаємодія забезпечує ефективне виконання біомембранами різноманітних функцій під час метаболізму.

Біомембрани надзвичайно різноманітні та здатні не тільки відділяти вміст клітини від зовнішнього середовища та забезпечувати розділ внутрішнього об'єму клітини, але й брати участь у регуляції множини процесів. Наприклад, плазматичні мембрани забезпечують дифузійний бар'єр, активний транспорт, електричну збудливість, міжклітинну комунікацію, гормональну та імунну відповідь тощо [1].

Унікальність функції кожної мембрани визначається властивостями різноманітних мембранних білків, що входять до її складу: інте-

гральних, що пронизують мембрану наскрізь, напівінтегральних, занурених одним кінцем у зовнішній або внутрішній ліпідний шар, поверхневих, що розташовані на зовнішній або прилеглий до внутрішнього боку мембрані. Деякі з інтегральних білків виконують функцію іонних каналів, різноманітних транспортерів та рецепторів. Так, заключений в еритроцити білок гемоглобін переносить кисень від легень до органів і тканин, де гемоглобін поглинає утворений вуглекислий газ та переносить його з кров'ю до легень, де він виводиться під час дихання.

Середній вміст білків у мембрані складає приблизно 60% (за масою сухої речовини), зокрема в мієліні міститься 20%, у мітохондріях — 80%, в еритроцитах — 60% білка. Зміна здатності білків до зв'язування з мембраною, наприклад, при злущуванні мембранних білків з плазматичної мембрани або при порушенні цілісності мембрани під впливом тих чи інших чинників, або при гіпопротеїнемії внаслідок порушення синтезу чи стимуляції розпаду білка, може призвести до втрати функціональної активності білків, мембрани, клітини, тканини, органу та організму в цілому, тобто до розвитку патологічного стану. Зокрема, під час гемолізу еритроцитів відбувається розрив біомембрани еритроциту та вихід білка гемоглобіну до плазми, що викликає анемію, гемоглобінурію та гіпопротеїнемію.

© Р. Ф. Єрьоменко, 2011

Отже, в комплексному лікуванні таких станів необхідно використовувати лікарські засоби-коректори білкового обміну, які б шляхом активації синтезу білка відновлювали білковий баланс в організмі, в тому числі і вміст мембранних білків та їх пластичну функцію. Таким лікарським засобом може бути екстракт з трави люцерни посівної (ЕТЛП) (*Medicago sativa*) з роду бобових (Fabaceae), який містить білки, 17 амінокислот, у тому числі 8 незамінних, 8 ферментів, що розщеплюють білки та сприяють їх засвоєнню, а також бетаїн дубильні речовини, сапоніни, кумарини, фітоестрогени, вітаміни А, Д, В₁, В₁₂, С, Е, К; мікро- та макроелементи Са, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, K, Si, Na, F; хлорофіл; ізофлавоноїди: геністеїн, дайдзеїн, куместрол; флавоноїди: апігенін, лютеолін, кверцетин, рутин та інші; органічні кислоти: кофейну, галову, ферулову, метоксикумарову, уронову; алкалоїди; аспарагін; антоціани; карбогідрати; моноцукри та полісахариди; пігменти; крохмаль [6].

Наявність у складі ЕТЛП великої кількості білка, амінокислот, у тому числі незамінних, флавоноїдів, органічних кислот, дубильних речовин, для яких характерною є антиоксидантна, протизапальна, мембраностабілізувальна, цитопротекторна та органопротекторна дія, зможе забезпечити відновлення вмісту мембранних білків і їх пластичної функції та за рахунок антиоксидантної дії — щільність біомембрани, що сприятиме стабілізації білкового обміну.

Зважаючи на вищевикладене, метою даної роботи стало дослідження впливу екстракту з трави люцерни посівної в порівнянні з калію оротатом на функціональний стан мембранних білків і мембран клітин в умовах гемолізу еритроцитів у щурів, на активність ферментів цитолізу АлАТ та АсАТ та здатність проявляти мембраностабілізувальну і цитопротекторну активність.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Вивчення впливу ЕТЛП в порівнянні з референс-препаратом калію оротатом на стан мембранних білків та мембран клітин проводили в умовах спонтанного гемолізу еритроцитів щурів за Jager F. C. [3] та за активністю ферментів цитолізу АлАТ та АсАТ у сироватці крові [3]. Метод за Jager F. C. [3] заснований на фотоелектроколориметричному визначенні позаеритроцитарного гемоглобіну, що надходить у середовище внаслідок спонтанного лізису мембран еритроцитів, викликаного пероксидним окисненням ліпідів киснем повітря. Активність ферментів цитолізу АлАТ та АсАТ визначали в сироватці крові щурів загальноприйнятими методами

за допомогою стандартних наборів реактивів фірми «Філісіт» [3].

Вивчення впливу ЕТЛП проводили з використанням 40 білих статевозрілих щурів, з яких було сформовано 5 груп по 8 тварин у кожній: перша група — інтактний контроль (ІК), друга група — тварини, які отримували калію оротат (КО) у дозі 180 мг/кг, третя група — тварини, які отримували ЕТЛП у дозі 25 мг/кг, четверта група — тварини, які отримували ЕТЛП у дозі 50 мг/кг, та п'ята група — тварини, які отримували ЕТЛП у дозі 100 мг/кг.

Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію ЦНДЛ НФаУ відповідно до встановлених норм [2,4]. Дослідження проведені з дотриманням гуманного поводження з тваринами у відповідності до правил «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986) [2].

Як референс-препарат обрано калію оротат виробництва ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (м. Київ), який є єдиним, дозволеним в Україні нестероїдним лікарським засобом, що застосовується у клініці при порушеннях білкового обміну та як загальний стимулятор обмінних процесів. Доза калію оротату 180 мг/кг визначена в процесі перерахунку з добової дози для людини (згідно з інструкцією максимальна добова доза, що може застосовуватись у дорослих, становить 3000 мг) на добову дозу для щура за методом Риболєва Ю. П. [8].

Після рандомізації тваринам внутрішньошлунково вводили ЕТЛП у дозах 25, 50 та 100 мг/кг і препарат порівняння калію оротат у дозі 180 мг/кг протягом двох тижнів. Групі інтактного контролю в цей період внутрішньошлунково вводили еквівалентну кількість розчинника. Далі проводили визначення ступеня гемолізу еритроцитів за методом [3] та активності цитолітичних ферментів у сироватці крові за методом [3]. Результати обробляли статистично за допомогою програми Statistica 6. Здатність перешкоджати пошкодженню мембранних білків еритроцитів оцінювали за зміною кількості гемолізованих еритроцитів у тварин дослідних груп у порівнянні зі щурами групи ІК і виражали у %.

Результати наведені в табл. 1 та 2.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати дослідження, наведені в табл. 1 та 2, дозволили встановити, що превентивне введення ЕТЛП у дозах 25,50 і 100 мг/кг та калію оротату в дозі 180 мг/кг привело до покращення стану мембранних білків, стабілізації

Таблиця 1

**РІВЕНЬ ВПЛИВУ ДОСЛІДЖУВАНИХ ОБ'ЄКТІВ НА СТАН МЕМБРАННИХ БІЛКІВ
В УМОВАХ МОДЕЛІ СПОНТАННОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА JAGER F. C.**

Умови досліджу	Ступінь гемолізу еритроцитів, %	Мембраностабілізуюча активність, %
Інтактний контроль (ІК)	9,47±0,91	—
Калію оротат (КО), 180 мг/кг	5,94±0,73*	37,28
ЕТЛП, 25 мг/кг	4,73±0,66*	50,06
ЕТЛП, 50 мг/кг	5,12±0,49*	45,93
ЕТЛП, 100 мг/кг	4,44±0,60*	53,11

* — відхилення показника достовірне відносно групи ІК, $P \leq 0,05$.

Показники активності цитолітичних ферментів у сироватці крові щурів в умовах субхронічного гепатиту, викликаного тетрахлорметаном та етанолом.

Таблиця 2

**ВПЛИВ ДОСЛІДЖУВАНИХ ОБ'ЄКТІВ НА АКТИВНІСТЬ
ЦИТОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ**

Умови досліджу	АлАТ, ммоль/г×л	АсАТ, ммоль/г×л
Інтактний контроль (ІК)	0,37±0,02	0,39±0,02
Калію оротат (КО), 180 мг/кг	0,31±0,01*	0,32±0,01*
ЕТЛП, 25 мг/кг	0,26±0,01*	0,30±0,01*
ЕТЛП, 50 мг/кг	0,30±0,01*	0,35±0,01
ЕТЛП, 100 мг/кг	0,31±0,01*	0,37±0,02

* — відхилення показника достовірне відносно групи ІК, $P \leq 0,05$.

мембран еритроцитів та достовірного зниження інтенсивності гемолізу в порівнянні з тваринами ІК і до достовірного в порівнянні з групою ІК зниження активності цитолітичних ферментів АлАТ та АсАТ у сироватці крові, що свідчить про їх значущу мембраностабілізуючу та цитопротекторну дію (табл. 1, 2). Так, достовірно в порівнянні з ІК знижують ступінь гемолізу еритроцитів ЕТЛП в дозі 25 мг/кг — у 2 рази, 50 мг/кг — у 1,8 рази, 100 мг/кг — у 2,1 рази, калію оротат у дозі 180 мг/кг — у 1,6 рази. Екстракт з трави люцерни посівної проявляє значущу мембраностабілізуючу та цитопротекторну дію в дозах 25, 50 і 100 мг/кг, що складає 50,06%, 45,93% та 53,11% відповідно, а також калію оротату в дозі 180 мг/кг, що становить 37,28% і її можна оцінити як помірну (табл. 1).

Установлено, що ЕТЛП та калію оротат здатні достовірно в порівнянні з групою ІК знижувати активність АлАТ — маркерного ферменту цитолізу переважно гепатоцитів та АсАТ — маркерного ферменту цитолізу переважно кардіоміоцитів, що свідчить про їх значущу цитопротекторну дію (табл. 2). Так, спостерігаємо достовірне відносно ІК зниження активності АлАТ та АсАТ під впливом калію оротату в дозі 180 мг/кг на 16% та 18% відповідно, ЕТЛП у дозі 25 мг/кг — на 30% та 23% відповідно, ЕТЛП у дозі 50 мг/кг — на 19% та 10% відповідно та ЕТЛП у дозі 100 мг/кг —

на 16% та 5% відповідно. Отже, з наведеного видно, що ЕТЛП у дозі 25 мг/кг найефективніша за всі інші дози та майже у 2 рази ефективніша за препарат порівняння калію оротат, що знижує активність цитолітичних ферментів АлАТ та АсАТ і проявляє цитопротекторну дію, яка сприятиме підвищенню щільності мембран та підвищенню мембраностабілізуючого ефекту.

Отже, за результатами цього експерименту визначено, що для подальших досліджень раціонально використовувати ЕТЛП у дозі 25 мг/кг, в якій він найефективніше впливає на білковий обмін, зокрема на функцію мембранних білків, мембран еритроцитів та мембран гепато- та кардіоміоцитів тварин.

Порівняльний аналіз здатності ЕТЛП та калію оротату стимулювати мембранні білки та стабілізувати мембрани свідчить на його користь. Отже калію оротат у дозі 180 мг/кг поступається ЕТЛП у дозі 25 мг/кг за зниженням ступеня гемолізу еритроцитів та рівнем активності АлАТ у 1,3 та 1,9 рази відповідно (табл. 1 та 2), за зниженням ступеня гемолізу еритроцитів ЕТЛП у дозі 50 мг/кг — у 1,2 рази та ЕТЛП у дозі 100 мг/кг — у 1,3 рази (табл. 1), а рівень активності АлАТ та АсАТ калію оротату знаходиться на рівні ЕТЛП у дозі 50 мг/кг та 100 мг/кг. За вираженістю мембраностабілізуючої та цитопротекторної дії ЕТЛП у дозах 25 та 100 мг/кг має

перевагу над калію оротатом у дозі 180 мг/кг у 1,4 рази (табл. 1).

На нашу думку, екстракт з трави люцерни посівної за рахунок наявності в складі БАР великої кількості білка та амінокислот, у тому числі і незамінних, здатен корегувати білковий обмін та покращувати пластичну функцію мембранних білків, а за наявності флавоноїдів, органічних кислот та дубильних речовин — знижувати активність цитолітичних ферментів і стабілізувати ліпідний шар мембран і чинити виражену мембраностабілізуювальну та цитопротекторну дію.

Таким чином, вищенаведене свідчить про те, що ЕТЛП у дозі 25 мг/кг є потенційним коректором білкового обміну і краще в 1,4–1,9 рази за калію оротат здатен перешкоджати руйнуванню мембранних білків під час пошкодження мембран еритроцитів в умовах їх гемолізу і знижувати активність цитолітичних ферментів та проявляти виражену мембраностабілізуювальну і цитопротекторну дію.

ВИСНОВКИ

1. Установлено, що ЕТЛП у дозах 25, 50 і 100 мг/кг та калію оротат у дозі 180 мг/кг при превентивному введенні приводять до покращення стану мембранних білків внаслідок нормалізації білкового обміну, стабілізації мембран еритроцитів і до достовірного зниження інтенсивності гемолізу та зниження активності цитолітичних ферментів у порівнянні з тваринами ІК, що свідчить про їх значущу мембраностабілізуювальну та цитопротекторну дію.
2. Порівняльний аналіз здатності ЕТЛП і калію оротату стимулювати мембранні білки та стабілізувати мембрани свідчить на користь ЕТЛП. Калію оротат у дозі 180 мг/кг поступається ЕТЛП у дозі 25 мг/кг за зниженням ступеня гемолізу еритроцитів у 1,3 рази, за вираженістю мембраностабілізуювальної дії — у 1,4 рази, а цитопротекторної дії — у 1,9 рази.
3. Установлено, що ЕТЛП за рахунок наявності в складі БАР великої кількості білка та амінокислот, у тому числі і незамінних, здатен корегувати білковий обмін та покращувати пластичну функцію мембранних білків,

а за наявності флавоноїдів, органічних кислот і дубильних речовин — знижувати активність цитолітичних ферментів, стабілізувати ліпідний шар мембран і чинити виражену мембраностабілізуювальну та цитопротекторну дію.

4. Доведено, що ЕТЛП у дозі 25 мг/кг є потенційним коректором білкового обміну і краще в 1,4–1,9 рази за калію оротат здатен перешкоджати руйнуванню мембранних білків під час пошкодження мембран еритроцитів в умовах їх гемолізу, знижувати активність цитолітичних ферментів та проявляти виражену мембраностабілізуювальну та цитопротекторну дію.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
2. Гринштейн С. В. Структурно-функциональные особенности мембранных белков / С. В. Гринштейн, О. А. Кост // Успехи биол. химии. — 2001. — Т. 41. — С. 77–104.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. — К.: Авіденна, 2001. — 528 с.
4. Западнюк М. П. Лабораторные животные. Использование в эксперименте / М. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. — К.: Высш. шк., 1983. — 382 с.
5. Карп'юк У. В. Стандартизація густого екстракту з трави сої щетинистої та вивчення його анаболічної активності / [У. В. Карп'юк, Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан, В. С. Кисличенко та ін.] // Фармакол. та лікарська токсикол. — 2009. — № 3 (10). — С. 38–43.
6. Ковальов С. В. Дослідження фенольного комплексу з трави люцерни посівної / [С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан та ін.] // Фармац. часопис. — 2008. — № 2 (6). — С. 27–30.
7. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Докл. АН СССР. — 1979. — Т. 247, № 6. — С. 1513–1516.

УДК 615.076.9:57.017.73:633.31**Р. Ф. Еременко****ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ НА СОСТОЯНИЕ
МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И МЕМБРАН В УСЛОВИЯХ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ**

Приведены результаты исследования влияния экстракта травы люцерны посевной (ЭТЛП) и препарата сравнения калия оротата на состояние мембранных белков и мембран в условиях спонтанного гемолиза эритроцитов крыс по Jager F.C. и по активности ферментов цитолиза. Установлено, что превентивное введение ЭТЛП в дозах 25,50 и 100 мг/кг и калия оротата в дозе 180 мг/кг привело к улучшению состояния мембранных белков в результате нормализации белкового обмена, стабилизации мембран эритроцитов, к достоверному снижению интенсивности гемолиза и активности ферментов цитолиза АлАТ и АсАТ в сыворотке крови по сравнению с животными ИК, что свидетельствует об их значимом мембраностабилизирующем и цитопротекторном действии. ЭТЛП в дозе 25 мг/кг является потенциальным корректором белкового обмена и лучше в 1,4 раза по сравнению с калием оротатом способен препятствовать разрушению мембранных белков во время повреждения мембран эритроцитов в условиях их гемолиза и проявляет выраженное мембраностабилизирующее и цитопротекторное действие.

Ключевые слова: белки мембран; эритроциты; экстракт люцерны; калия оротат; крысы

UDC 615.076.9:57.017.73:633.31**R. F. Yeremenko****RESEARCH OF INFLUENCE OF EXTRACT OF MEDICAGO SATIVA****SOWING GRASS ON A MEMBRANES PROTEINS AND MEMBRANES IN****THE CONDITIONS OF HEMOLYSIS OF BLOOD ERYTHROCYTES**

Results of medicago sativa grass extract (EGMS) influence on membrane proteins and lipids under experimental spontaneous hemolysis of rats erythrocytes by Jager method was described in present article. It has shown that preventive administration of EGMS in doses 25,50 and 100 mg per kg and potassium orotate, in a dose 180 mg per kg leads to protein metabolism normalization erythrocytes membranes stabilization hemolysis decreasing and AlAT, AsAT activity in blood serum. It is an evidence that EGMS is membranoprotective and cytoprotective substance.

Key words: membranes proteins; red blood cells; extract of medicago sativa; potassium orotate; rats

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.

Кафедра біології, фізіології

та анатомії людини НФаУ

Тел. (057) 706-30-73, (057) 788-53-19

e-mail: fuatovna@rambler.ru

Надійшла до редакції:

11.11.2011 р.