

**ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ З ЛЮЦЕРНИ НА БІЛКОВИЙ  
ОБМІН В УМОВАХ ГОСТРОГО ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО  
УРАЖЕННЯ ГЕПАТОЦИТІВ****Національний фармацевтичний університет (м. Харків)**

Дана робота виконана у рамках науково-дослідної програми Національного фармацевтичного університету з проблеми МОЗ України “Створення нових лікарських препаратів на основі рослинної та природної сировини, у тому числі продуктів бджільництва, для дорослих та дітей” (номер Державної реєстрації 0198U007008).

**Вступ.** Відомо, що білковий обмін забезпечує весь пластичний бік життєдіяльності організму, бо білки є безпосередньою складовою біологічних мембран, які представляють собою текучий фосфоліпідний бішар, в який занурені білки. Середній вміст білків в мембрані складає приблизно 60% (за масою сухої речовини) [2]. 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 патологічних станів. З метою відновлення функціонування білкового обміну під час таких станів необхідно адекватне надходження до організму ззовні структурних компонентів – амінокислот та інших біологічно активних речовин-коректорів білкового обміну. Джерелом таких речовин може слугувати 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 розчіплюють білки та сприяють їх засвоєнню, зокрема – бетаїн, які можуть безпосередньо впливати на білоксинтетичні процеси в печінці; та біологічно активні речовини з антиоксидантними, мембраностабілізуювальними, органопротекторними, протизапальними та іншими властивостями, такі як: 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 генистеїн, дайдзеїн, куместрол; флавоноїди апігенін, лютеолін, кверцетин, рутин та інші; органічні кислоти кофейну, галову, ферулову, метоксикумарову, уронову; алкалоїди; аспарагін; антоціани; карбогідрати; моноцукра та полісахариди; пігменти; крохмаль [4].

Отже, вищевикладене а також дані про те, що в гепатоцитах рибосомами здійснюється синтез

білків (альбумін, глобуліни, протромбін, гепарин та тощо) та численних ферментів, що мають білкову природу, обґрунтовує доцільність вивчення впливу ЕТЛП на функціональний стан гепатоцитів щурів в умовах гепатиту, викликаного мембранотоксином тетрахлоретаном, який пошкоджує мембрани гепатоцитів інгібуючи мікросомальні ферменти печінки, активуючи утворення активних форм кисню (АФК) та відповідно – перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисну модифікацію білків (ОМБ) в гепатоцитах, що призводить до утворення великої кількості продуктів мембранного розпаду білкової природи та порушенню білкового обміну [2, 5].

**Мета дослідження** полягала у вивченні впливу ЕТЛП та препарату порівняння калію оротату на білковий обмін в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведено з використанням 32 білих безпородних щурів масою 180-200 г. з дотриманням вимог комісії з біоетики НФаУ та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) [3]. Тварин рандомізували по групах по 8 голів наступним чином: 1 – інтактний контроль (ІК); 2 – контрольна патологія (КП); 3 – дослідна, яким вводили ЕТЛП в дозі 25 мг/кг; 4 – дослідна, яким вводили калію оротат в дозі 180 мг/кг. Після рандомізації тваринам дослідних груп вводили препарати в вищезазначених дозах, групи КП – розчинник, протягом 2-х тижнів до та через 2 години після введення гепатотоксину [3]. Далі у тварин моделювали гостре ураження гепатоцитів відповідно до метода [3]. На 3-тю добу щурів вивішували та виводили з досліду методом декапітації в умовах барбамілового наркозу. Функціональний стан гепатоцитів та білкового обміну щурів оцінювали за допомогою таких показників: виживаність тварин, динаміка маси тіла, масовий коефіцієнт печінки (МКП), біохімічні показники, які визначали в гомогенаті печінки та в сироватці крові [3]. Визначали показники, що характеризують стан білкового обміну: в тканині печінки – вміст білка за Лоурі [3], в сироватці крові – рівень загального білка, молекул середньої маси (МСМ), альбуміну, сечовини, показники окисної модифікації білків (ОМБ) [3], активність ферментів аланінамінотрансферази

Таблиця 1

**Динаміка маси тіла, виживаність та маса печінки в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів у щурів**

Показник	Умови досліджу			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	ЕТЛП, 25 мг/кг	Калію оротат, 180 мг/кг
Вихідна маса тіла, г	193,33±3,80	192,22±2,78	202,78±4,79	191,67±3,07
Маса тіла наприкінці досліджу, г	200,83±7,46	164,00±8,83*	193,33±6,40**	183,33±7,92
Динаміка маси тіла,%	+3,9%	-14,7%	-4,7%	-4,4%
Виживаність,%	100	89	100	100
Маса печінки,г	7,79±0,40	9,52±0,18*	10,05±0,36*	10,45±0,44*
МКП,%	3,91±0,27	5,56±0,14*	5,20±0,09*	5,74±0,33*

**Примітка:** \* – відхилення показника достовірно по відношенню до групи інтактного контролю, P≤0,05; \*\* – відхилення показника достовірно по відношенню до групи контрольної патології, P≤0,05.

Таблиця 2

**Характеристика функціонального стану печінки щурів в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів, за біохімічними показниками сироватки крові**

Показник	Умови досліджу			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Люцерна, 25 мг/кг	Калію оротат, 180 мг/кг
АсАТ, ммоль/л•год	0,99±0,06	1,68±0,10*	1,35±0,11 <sup>*/**</sup>	1,77±0,08*
АлАТ, ммоль/л•год	0,88±0,02	1,54±0,07*	1,21±0,11 <sup>*/**</sup>	1,44±0,08*
γ-Глутамілтрансфе-раза, мккат/л	1,08±0,04	1,40±0,08*	1,09±0,05**	1,32±0,09*
Холестерин, ммоль/л	1,06±0,08	1,49±0,04*	1,04±0,14**	1,16±0,18

(АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) [1], γ-глутамілтрансферази (ГГТ) [1], рівень холестерину [1]. Інтенсивність процесів ПОЛ та стан антиоксидантного захисту оцінювали за вмістом ТБК-реактивів, каталази та відновленого глутатіону (G-SH) в гомогенаті печінки [3]. Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету статистичних програм «Statistica 6,0». Для отримання статистичних висновків застосовували параметричні методи (метод Н'юмана-Кейлса). При порівнянні статистичних виборок був прийнятий рівень значущості p<0,05. Результати дослідження надані в **таблицях 1-4**.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Аналіз показників функціонального стану дослідних щурів, наведених в **таблицях 1-3**, свідчить про розвиток патологічного стану внаслідок тетрахлорметанового пошкодження гепатоцитів у щурів групи КП, що віддзеркалилось у достовірному відносно групи ІК зниженні маси тіла на 15% і виживаності – на 11%, та збільшенні маси печінки у 1,2 рази й МКП – у 1,4 рази (**табл. 1**). Під впливом превентивно-лікувального введення нового препарату ЕТЛП в дозі 25 мг/кг та референсного калію оротату в дозі 180 мг/кг відбуваються позитивні зміни в організмі щурів, які відбилися збільшенням до інтактного 100% рівня виживаності. На відміну від калію оротату ЕТЛП сприяв достовірному відносно групи КП збільшенню маси тіла на 10%. Обидва препарати не змінювали відносно групи КП масу печінки та МКП (**табл. 1**). Результати дослідження, наведені в **таблицях 2-3**, вказують на пошкодження гепатоцитів тетрахлоретаном у дослідних тварин, що проявилось у сироватці крові

щурів групи КП достовірним відносно ІК зростанням активності таких ферментів, як цитолітичних – АсАТ та АлАТ у 1,7 та 1,75 рази відповідно, мембранного – ГГТ – у 1,3 рази, що свідчить також про деструкцію мембран та білкових молекул [1]. Про порушення мембран гепатоцитів також говорить достовірне відносно ІК зростання в сироватці крові рівня холестерину в 1,4 рази (**табл. 2**). Дані **таблиці 3** також свідчать про порушення функціональної активності гепатоцитів щурів групи КП внаслідок інтенсифікації переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ), негативних змін з боку функцій антиоксидантної системи (АОС) та антиоксидантного захисту (АОЗ), що віддзеркалились у зміні показників ПОЛ-АОС в гомогенаті печінки тварин групи КП: достовірно відносно групи ІК збільшився у 1,4 рази рівень кінцевого продукту ПОЛ ТБК-реактивів, зменшилися активність ферменту АОЗ каталази у 1,3 рази та рівень показника стану АОС відновленого глутатіону G-SH у 1,3 рази. На відміну від препарату порівняння калію оротату в дозі 180 мг/кг ЕТЛП в дозі 25 мг/кг проявив антицитолітичні властивості – достовірно відносно групи КП знижуючи у 1,3 рази активність АсАТ та АлАТ в сироватці крові, мембраностабілізувальну дію достовірно в порівнянні з КП знижуючи рівень ГГТ у 1,3 рази та холестерину у 1,4 рази в сироватці крові (**табл. 2**), антиоксидантні властивості, які віддзеркалились тенденційним відносно КП зниженням у гомогенаті печінки показника інтенсивності ПОЛ ТБК-реактивів у 1,3 та відновленням показників активності АОЗ та АОС каталази – у 1,1 рази та ВГ – у 1,2 рази відповідно (**табл. 3**).

Тетрахлорметанове пошкодження цілісності та функцій гепатоцитів призвело до змін стану

Таблиця 3

**Характеристика функціонального стану печінки щурів в умовах гострого гепатиту, викликаного тетрахлоретаном, за біохімічними показниками тканини печінки**

Показник	Умови досліджу			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Люцерна, 25 мг/кг	Калію оротат, 180 мг/кг
ТБК-АП, мкмоль/г	53,20±6,17	73,55±15,22*	56,55±5,54	70,94±8,11
Каталаза, мкат/г	85,40±1,71	66,69±5,91*	73,88±3,99	71,17±2,07
G-SH, ммоль/г	4,07±0,21	3,16±0,14*	3,91±0,13	4,46±0,40

**Примітка:** \* – відхилення показника достовірно по відношенню до групи інтактного контролю, P≤0,05; \*\* – відхилення показника достовірно по відношенню до групи контрольної патології, P≤0,05.

Таблиця 4

**Стан білкового обміну щурів в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів**

Показник	Умови досліджу				
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Люцерна, 25 мг/кг	Калію оротат, 180 мг/кг	
Загальний білок, г/л	62,49±1,77	69,95±2,20	69,57±3,26	70,49±3,13	
Білок за Лоурі, г/100 мг	0,090±0,004	0,078±0,003*	0,092±0,003**	0,099±0,003**	
МСМ, у. од.	0,234±0,008	0,311±0,007*	0,273±0,003	0,275±0,009	
Альбумін, г/л	36,19±0,89	39,61±0,68	40,93±3,51	39,76±2,54	
Сечовина, ммоль/л	4,37±0,26	5,28±0,31	5,60±0,58	6,18±0,69	
Білкові фракції:					
Альбуміни	43,59±2,05	37,59±4,41	44,79±0,80	41,76±1,94	
α <sub>1</sub> -Глобуліни	20,17±3,94	31,00±1,79*	23,13±3,26	24,67±1,84	
α <sub>2</sub> -Глобуліни	54,33±2,59	59,57±2,83	52,50±3,40	50,17±3,39	
β-Глобуліни	60,17±2,39	57,86±2,52	56,25±2,89	59,67±1,91	
γ-Глобуліни	29,83±2,36	32,00±4,09	28,50±2,76	41,50±1,99*	
Окисна модифікація білків, опт. густ/мл					
Спонтанна	274 нм	28,61±4,95	68,06±5,41*	31,13±2,19**	48,98±3,16
	363 нм	11,60±2,26	38,37±6,36*	14,50±1,94**	15,38±2,56**
Стимульована	274 нм	27,00±4,79	52,17±7,63*	23,63±4,06**	46,88±3,56*
	363 нм	8,25±1,27	24,54±1,86*	15,90±1,76**	16,96±3,12*

**Примітка:** \* – відхилення показника достовірно по відношенню до групи інтактного контролю, P≤0,05; \*\* – відхилення показника достовірно по відношенню до групи контрольної патології, P≤0,05.

білкового обміну за рахунок утворення обламків білкових молекул внаслідок деструкції мембран та білкових компонентів клітин, що показано в **таблиці 4**: достовірно відносно групи ІК рівень білка в тканині печінки знижується у 1,2 рази і настільки ж збільшується в сироватці крові, зростає рівень МСМ у 1,3 рази, сечовини у – 1,2 рази, α<sub>1</sub>-глобулінової фракції білків – у 1,5 рази, тенденційно зменшується альбумінова і β-глобулінова фракції білків у 1,2 і 1,1 рази відповідно та збільшується γ-глобулінова – у 1,1 рази. Спостерігається інтенсифікація окисної модифікації білків (ОМБ), що віддзеркалилось у зростанні достовірно відносно ІК рівня ранніх та пізніх маркерів окисної деструкції білків альдегідфенілгідразонів (АФГ) та кетондинітрофенілгідразонів (КФГ) при спонтанній ОМБ у 2,4 та 3,3 рази відповідно і при стимульованій ОМБ у 1,9 та 3 рази відповідно.

Превентивно-лікувальне введення ЕТЛП в дозі 25 мг/кг відновлювало стан білкового обміну та перешкоджало деструкції мембранних та клітинних білків в умовах тетрахлорметанового ураження гепатоцитів, чого не можна сказати в повній мірі про референсний калію оротат в дозі 180 мг/кг. Так, ЕТЛП та калію оротат достовірно відносно групи КП

до інтактного рівня збільшували вміст білку в тканині печінки та не впливали на рівень загального білка в сироватці крові. Обидва препарати тенденційно зменшували кількість МСМ у 1,2 рази та не впливали на рівень альбуміну та сечовини. Аналіз білкових фракцій показав, що ЕТЛП та калію оротат тенденційно відносно групи КП збільшували вміст альбуміну у 1,2 та 1,1 відповідно, що свідчить про відновлення кількості транспортних білків та їх функції, знижували до інтактного рівня α-глобулінової фракції білків, що говорить про протизапальні властивості ЕТЛП та калію оротату. ЕТЛП проявляв деяку імунопротекторну активність – знижував кількість γ-глобулінових білків у 1,1 рази, а калію оротат навпаки – достовірно відносно і ІК і КП збільшував їх кількість у 1,4 та 1,3 рази відповідно, що вказує на напругу імунної системи та можливі алергізувальні властивості калію оротату. Під впливом ЕТЛП в дозі 25 мг/кг спостерігали зниження інтенсивності окисної модифікації білків, про що свідчить достовірне відносно групи КП зниження майже до інтактного рівня ранніх та пізніх маркерів окисної деструкції білкових молекул (ОДБМ) АФГ та КТГ при спонтанній ОМБ – у 2,2 та 2,65 рази відповідно, а при стимульованій – у 2,2 та 1,6 рази

відповідно. Референсний калію оротат в дозі 180 мг/кг в меншому ступені змінював ці показники: він достовірно відносно групи КП знижував рівень АФГ та КТГ при спонтанній ОМБ у 1,4 та 2,5 рази відповідно, а при стимульованій – знижував тільки рівень пізніх маркерів ОДБМ КФГ у 1,4 рази. Отже за здатністю перешкоджати деструкції білкових молекул ЕТЛП в дозі 25 мг/кг має перевагу над препаратом порівняння калію оротатом в дозі 180 мг/кг у 1,1-2 рази.

**Висновки.** Встановлено, що в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів у щурів відбувається деструкція мембранних та клітинних білків, що призводить до порушення цілісності мембран та функціональної активності гепатоцитів. Екстракт з трави люцерни посівної в дозі 25 мг/кг майже в 2 рази краще за референсний калію оротат

в дозі 180 мг/кг при превентивно-лікувальному введенні відновлює стан білкового обміну та попереджає деструкцію білкових молекул за рахунок вмісту великої кількості білка, амінокислот, та інших біологічно активних речовин, які визначають антиоксидантні, мембраностабілізуювальні, органопротекторні, протизапальні властивості ЕТЛП.

**Перспективи подальших досліджень.** Зважаючи на те, що ЕТЛП в дозі 25 мг/кг є коректором білкового обміну в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів, перспективним та доцільним є поглиблене вивчення превентивно-лікувального впливу ЕТЛП на стан білкового обміну в печінці здорових щурів та у щурів з хронічним перебігом модельованого ураження печінки.

### Список літератури

1. Биохимические показатели крови, их референсные значения, причины изменения уровня в сыворотке крови: [Электронный ресурс] / В. В. Андрушкевич. – г. Новосибирск. – 2006 – . Режим доступа к источнику: [http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/bioxim\\_poka-zat.shtml](http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/bioxim_poka-zat.shtml).
2. Гринштейн С. В. Структурно-функциональные особенности мембранных белков / С. В. Гринштейн, О. А. Кост // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 77-104.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл. -кор. АМН України О. В. Стефанова – К.: Авіцена. – 2001. – 528 с.
4. Ковальов С. В. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан, В. М. Ковальов // Фармацевтичний часопис. – 2008. – № 2(6). – С. 27-30.
5. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий [и др.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – № 3. – С. 20-26.

УДК 615.322:612.015.348:616.36 – 002

#### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ НА БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ТЕТРАХЛОРЕТАНОВОГО ПОРАЖЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ

Еременко Р. Ф.

**Резюме.** Установлено, что в условиях острого тетрахлорметанового поражения гепатоцитов у крыс происходит деструкция мембранных и клеточных белков и других белковых молекул, что приводит к нарушению целостности мембран и функциональной активности гепатоцитов. Экстракт из травы люцерны посевной (ЭТЛП) в дозе 25 мг/кг почти в 2 раза лучше, чем референсный калия оротат в дозе 180 мг/кг при превентивно-лечебном введении восстанавливает состояние белкового обмена и предупреждает деструкцию белковых молекул за счет содержания большого количества белка, аминокислот и других биологически активных веществ, которые определяют антиоксидантные, мембраностабилизирующие, органопротекторные и противовоспалительные свойства ЭТЛП.

**Ключевые слова:** тетрахлорметановое поражение печени, экстракт травы люцерны, коррекция белкового обмена, антиоксидантные, мембраностабилизирующие свойства.

УДК 615.322:612.015.348:616.36 – 002

#### ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ З ЛЮЦЕРНИ НА БІЛКОВИЙ ОБМІН В УМОВАХ ГОСТРОГО ТЕТРАХЛОРЕТАНОВОГО УРАЖЕННЯ ГЕПАТОЦИТІВ

Еременко Р. Ф.

**Резюме.** Встановлено, що в умовах гострого тетрахлорметанового ураження гепатоцитів у щурів відбувається деструкція мембранних та клітинних білків, що призводить до порушення цілісності мембран та функціональної активності гепатоцитів. Екстракт з трави люцерни (ЕТЛП) в дозі 25 мг/кг майже в 2 рази краще за референсний калію оротат в дозі 180 мг/кг при превентивно-лікувальному введенні відновлює стан білкового обміну та попереджає деструкцію білкових молекул за рахунок вмісту великої кількості білка, амінокислот, та інших біологічно активних речовин, які визначають антиоксидантні, мембраностабілізуювальні, органопротекторні, протизапальні властивості ЕТЛП.

**Ключові слова:** тетрахлорметанове ураження печінки, екстракт з трави люцерни, корекція білкового обміну, антиоксидантні, мембраностабілізуювальні властивості.

UDC 615.322:612.015.348:616.36 – 002

### **The Study of the Influence of Extract *Medicago Sativa* Sowing Grass on Protein Metabolism in Conditions of Acute CCl<sub>4</sub> Lesion of Hepatocytes**

**Yeromenko R. F.**

**Summary:** It was found out that in conditions of acute CCl<sub>4</sub> lesion of hepatocytes of rats destruction of membrane and cellular proteins and other protein molecules is observed. It leads to violation of membrane integrity and functional activity of hepatocytes. With preventive and curative introduction 25 mg/kg of extract *Medicago sativa* sowing grass (EMSG) restores the state of protein metabolism almost twice as better as 180 mg/kg of reference potassium orotate. It prevents destruction of protein molecules due to the large amount of protein, amino acids and other biologically active substances that determine antioxidant, membrane stabilizing, organoprotective and anti-inflammatory properties of EMSG.

**Key words:** CCl<sub>4</sub> liver lesion, extract *Medicago sativa* sowing grass, correction of protein metabolism, antioxidant, membrane stabilizing properties.

Стаття надійшла 4. 10. 2012 р.

Рецензент – проф. Дев'яткіна Т. О.