

Р. Ф. Єрмоєнко, Л. М. Малоштан, О. Ю. Яценко

Дослідження фармакологічної активності екстракту з трави люцерни посівної за умов субхронічного гепатиту в щурів

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: екстракт з трави люцерни посівної, субхронічний гепатит, антиоксидантна активність, мембраностабілізуюча активність

Захворювання печінки займають провідне місце в структурі захворюваності та поширеності хвороб органів травлення в сучасному світі. У 2010 році поширеність захворювань, зокрема, хронічного гепатиту серед населення України складала 769,7 на 100 тис. населення [7]. Печінка відіграє важливу роль у підтримці білкового гомеостазу, і її пошкодження призводить до порушення білоксинтезуючої функції. При таких захворюваннях печінки, як гепатит, ішемія, гепатоз, цироз тощо відбувається пошкодження гепатоцитів як структурного субстрату анаболізму та катаболізму білка, що супроводжується гіпопротеїнемією, диспротеїнемією, гіпер- γ -глобулінемією, гіперазотемією та підвищенням рівня в крові таких ферментів, як γ -глутамілтранспептидаза, амінотрансферази та інших за рахунок руйнування та загибелі гепатоцитів [6].

Зважаючи на це, доцільним є застосування в комплексній терапії захворювань печінки лікарських засобів, які б були донорами структурних компонентів амінокислот та інших біологічно активних речовин і попереджали руйнування гепатоцитів. Джерелом таких речовин є екстракт з трави люцерни посівної (*Medicago sativa*) (ЕТЛП) з роду бобових (*Fabaceae*), який містить білки, 17 амінокислот, у тому числі 8 незамінних, 8 ферментів, що розщиплюють білки та сприяють їхньому засвоєнню, зокрема – бетаїн, які можуть безпосередньо впливати на білоксинтетичні процеси в печінці; та біологічно активні речовини з антиоксидантними, мембра-

ностабілізуючими, 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; моно- та полісахариди; пігменти; крохмаль [4, 8].

Мета дослідження – вивчення фармакологічної активності ЕТЛП порівняно з класичним гепатопротектором силібором за умов субхронічного гепатиту в щурів.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 32 білих беспородних щурах масою 180–200 г, вирощених у віварії НФаУ, що утримувалися на стандартному харчовому раціоні відповідно до встановлених норм та з дотриманням вимог комісії з біоетики НФаУ та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001 р.), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) [3]. Тварини були розподілені на 4 групи по 8 особин у групі: 1 – інтактний контроль (ІК); 2 – контрольна патологія (КП); 3 – дослідна група тварин, яким перорально вводили ЕТЛП у дозі 25 мг/кг; 4 – дослідна група тварин, яким перорально вводили препарат порівняння силібор у дозі 50 мг/кг. Тваринам дослідних груп вводили препарати в вищезазначених дозах, КП – розчинник протягом 1-го тижня до початку та протягом усього терміну експерименту. Дозу ЕТЛП 25 мг/кг обрано згідно з результатами власних досліджень

[5], а дозу силібору 50 мг/кг згідно з даними літератури [7]. Субхронічний гепатит у тварин II–IV груп моделювали внутрішньошлунковим уведенням щурам етанолу та тетрахлорметану за визначеною схемою протягом 6 діб: спочатку вводили 50 % олійний розчин тетрахлорметану в дозі 0,4 мл/100 г маси тіла, через 2 год – вводили 40 % водний розчин етанолу в дозі 1,3 мл/100 г маси тіла [3]. ЕТЛП та силібор вводили тваринам під час експерименту щоденно протягом 6 діб через 2 год після введення етанолу. На 7 добу щурів зважували та виводили з експерименту методом декапітації під барбаміловим наркозом. Загальний стан щурів та функціональний стан печінки оцінювали наступними показниками: виживаність тварин, динаміка маси тіла, масовий коефіцієнт печінки (МКП), біохімічні показники, які визначали в гомогенаті печінки та в сироватці крові [1, 3]. Визначали показники, що характеризують білоксинтезуючу функцію печінки: у тканині печінки – вміст білка за Лоурі [1, 3], у сироватці крові – рівень загального білка, молекул середньої маси (МСМ), альбуміну, сечовини, показники окисної модифікації білків (ОМБ) – альдегідфенілгідразон (АФГ) та кетондинітрофенілгідразон (КФГ) [1–3, 9], активність ферментів аланінамінотрансферази (АлАТ), аспаратамінотрансферази (АсАТ) [1, 3], γ -глутамілтрансферази (ГГТ) [1, 3], рівень холестерину [1, 3]. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та стан антиоксидантного захисту (АОЗ) оцінювали за вмістом ТБК-реактивів, каталази та відновленого глутатіону (G-SH) у гомогенаті печінки [1, 3].

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica 6,0». Для отримання статистичних висновків застосовували параметричні методи (метод Н'юмана-Кейлса). При порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $P < 0,05$. Результати дослідження наведено в таблицях 1–2 та рис. 1–2.

Результати та їх обговорення. Отримані результати дослідження свідчать про те, що субхронічний вплив на щурів групи КП етанолу та тетрахлор-

етану протягом 6 днів призводить до порушення функціонального стану організму, у тому числі – печінки. Негативні зміни функціонального стану організму та печінки щурів групи КП виявлялися тенденцією до зниження маси тіла, зменшенням виживаності на 12 %, збільшенням маси печінки, яке віддзеркалилось достовірним відносно ІК збільшенням МКП у 1,4 разу, що вказує на розвиток набряку й запалення та порушення трофічних і метаболічних процесів у печінці та в організмі тварин у цілому. Цей висновок підтверджується біохімічними дослідженнями сироватки крові щурів групи КП, результати яких показали, що під субхронічним впливом етанолу та тетрахлорметану відбувається руйнування мембран гепатоцитів, на що вказує: достовірне відносно ІК підвищення в сироватці крові активності ферментів АсАТ та АлАТ – у 1,5 та 1,9 разу відповідно, ГГТ – у 1,5 разу, рівня холестерину – у 1,5 разу (табл. 1).

У тканині печінки спостерігали інтенсифікацію процесів ПОЛ та порушення активності антиоксидантної системи (АОС), що проявилось вірогідним відносно ІК збільшенням рівня ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) у 1,2 разу та зменшенням активності в тканині печінки ферменту АОЗ каталази та вмісту G-SH у 1,4 та 1,2 разу відповідно (рис. 1) [3].

Субхронічний вплив етанолу та тетрахлорметану призвів до порушення білоксинтезуючої функції печінки тварин групи КП, що проявилось достовірним відносно ІК зниженням рівня загального білка в сироватці крові на 13 %, білка в тканині печінки – на 20 %; збільшенням таких продуктів руйнування білка як молекули середньої маси (МСМ) на 16 % та кінцевого продукту розпаду білка, сечовини – на 43 %; зниженням серед білкових фракцій транспортних білків альбумінів на 39 % та β -глобулінів – на 40 %, що вказує на розвиток гіпопротеїнемії, γ -глобулінів на 49 % і свідчить про диспротеїнемію та порушення функції імунної системи, та збільшенням α_1 -глобулінів на 117 %, які вказують на розвиток гострої фази пошкодження печінки (табл. 2) [1–3, 6, 8].

Показники функціонального стану печінки щурів за умов субхронічного гепатиту та застосування екстракту з трави люцерни посівної

Показник	Умови досліджу			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	ЕТЛП, 25 мг/кг	Силібор, 50 мг/кг
Вживаність, %	100	88	100	100
Динаміка маси тіла, %	+2,4 %	-4,2 %	-2,9 %	-0,9 %
МКП, г/100 г	3,38 ± 0,12	4,79 ± 0,24*	4,02 ± 0,18*/**	4,08 ± 0,12*/**
У сироватці крові				
АсАТ, ммоль/л·год	0,83 ± 0,03	1,25 ± 0,05*	1,21 ± 0,10*	1,05 ± 0,04*
АлАТ, ммоль/л·год	0,73 ± 0,06	1,36 ± 0,07*	0,99 ± 0,04*/**	0,96 ± 0,06*/**
γ-Глутаміл-трансфераза, мккат/л	0,77 ± 0,05	1,17 ± 0,10*	0,84 ± 0,06**	0,72 ± 0,02**
Холестерин, ммоль/л	1,08 ± 0,06	1,64 ± 0,17*	1,16 ± 0,04**	1,17 ± 0,12**

Примітка. *Відхилення показника достовірно відносно групи інтактного контролю, $P \leq 0,05$; **відхилення показника достовірно відносно групи контрольної патології, $P \leq 0,05$.

Зростання в сироватці крові рівня раних та пізніх маркерів окисної деструкції білків АФГ та КФГ при спонтанній ОМБ на 136 % ($\lambda = 274$ нм) та 200 % ($\lambda = 363$ нм) відповідно свідчить про інтенсифікацію ОМБ та пошкодження системи АОЗ організму тварин (рис. 2) [2, 9].

Лікувально-профілактичне введення ЕТЛП та силібору відновлювало функціональний стан печінки, що проявилось, у першу чергу, підвищенням виживаності до 100 %, зменшенням втрати маси тіла та достовірним відносно групи КП зниженням масового коефіцієнта печінки на 16–17 %. Останнє також свідчить про протизапальні властивості ЕТЛП та силібору та їхній позитивний вплив на трофічні процеси в печінці. Про антицитолітичну, мембранопротекторну та органопротекторну дію ЕТЛП та силібору свідчить достовірне відносно групи КП зниження активності ферментів АлАТ на 27,2 % та на 29,4 % відповідно, ГГТ до інтактного рівня – на 28,2 % та на 38,4 % відповідно та холестерину також до інтактного рівня – на 29,3 % та на 28,7 % відповідно (табл. 1).

Антиоксидантні властивості ЕТЛП та силібору проявилися незначним інгібуванням процесів ПОЛ, зокрема, вміст ТБК-АП у гомогенаті печінки тенденційно відносно КП знижувався до рівня інтактних тварин. На відміну від силібору в дозі 50 мг/кг ЕТЛП у дозі 25 мг/кг достовірно відносно групи КП підвищу-

вав у гомогенаті печінки активність ферменту АОЗ каталази на 15 %. Уміст відновленого глутатіону під впливом ЕТЛП залишався на рівні показника інтактних тварин, у той час як силібор сприяв його підвищенню достовірно відносно групи К майже в 2,5 разу (рис. 1).

Аналіз біохімічних показників, що характеризують білоксинтезуючу функцію печінки, показав, що лікувально-профілактичне введення ЕТЛП у дозі 25 мг/кг та препарату порівняння силібору в дозі 50 мг/кг щурам із субхронічним етанол-тетрахлорметановим гепатитом призводило до достовірного порівняно з групою КП збільшення вмісту загального білка в сироватці крові на 20 % і вмісту білка в тканині

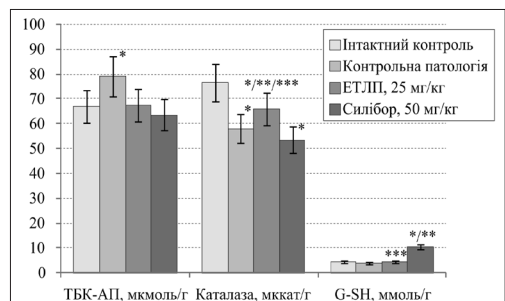


Рис. 1. Показники стану перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту у тканині печінки щурів за умов субхронічного гепатиту та застосування екстракту з трави люцерни посівної.

Примітка. *Відхилення показника достовірно відносно групи інтактного контролю, $P \leq 0,05$; **достовірно відносно групи контрольної патології, $P \leq 0,05$; ***достовірно відносно групи, що отримувала Силібор, $P \leq 0,05$.

Показники білоксинтезуючої функції печінки у щурів за умов субхронічного гепатиту та застосування екстракту з трави люцерни посівної

Показник	Умови досліджу			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	ЕТЛП, 25 мг/кг	Силібор, 50 мг/кг
Загальний білок (кров), г/л	75,1 ± 2,3	65,5 ± 2,8*	77,5 ± 4,4**	79,1 ± 2,8**
Білок (печінка), г/100 мг	0,10 ± 0,01	0,080 ± 0,004*	0,120 ± 0,004**	0,120 ± 0,004**
МСМ, ум. од.	0,202 ± 0,004	0,234 ± 0,016*	0,206 ± 0,003**	0,211 ± 0,004**
Сечовина, ммоль/л	4,67 ± 0,43	6,67 ± 0,71*	5,93 ± 0,30	5,87 ± 0,52
Білкові фракції, г/л:				
Альбуміни	21,1 ± 2,8	12,9 ± 2,8*	16,8 ± 1,8	19,1 ± 2,5
α ₁ -Глобуліни	4,1 ± 1,3	8,9 ± 3,1*	10,2 ± 1,2*	10,10 ± 2,89*
α ₂ -Глобуліни	12,30 ± 1,39	12,60 ± 1,13	14,50 ± 1,49	15,10 ± 1,73
β-Глобуліни	17,50 ± 2,12	10,50 ± 1,94*	14,00 ± 1,08	15,00 ± 1,15
γ-Глобуліни	16,20 ± 2,58	8,34 ± 1,93*	13,40 ± 1,94	15,20 ± 2,13

Примітка. *Відхилення показника достовірно відносно групи інтактного контролю, $P \leq 0,05$;

**відхилення показника достовірно відносно групи контрольної патології, $P \leq 0,05$.

печінки на 50 % та достовірного відносно групи ІК збільшення вмісту білка в тканині на 20 %, що свідчить про здатність досліджуваних препаратів не тільки відновлювати білоксинтетичні процеси в печінці. У групах тварин, які отримували ЕТЛП та силібор, спостерігали достовірне відносно групи КП зниження кількості МСМ у сироватці крові майже на 15 % та тенденцію до зменшення рівня в сироватці крові сечовини на 12 %. Про зниження гіпопротеїнемії в організмі щурів під впливом ЕТЛП та силібору свідчить зростання в сироватці крові білкової фракції альбумінів приблизно на 40 % та β-глобулінів – у середньому на 40 % порівняно з КП. Про відновлення функції імунної системи свідчить зростання γ-глобулінової фракції білків на 60 % (ЕТЛП) та 82 % (силібор) порівняно з групою КП (табл. 2).

Під впливом ЕТЛП у 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 АФГ та КФГ при спонтанній ОМБ – на 52,7 % та на 59,4 % відповідно. Силібор у меншому ступені змінював ці показники: він достовірно відносно групи КП знижував рівень АФГ та КФГ при спонтан-

ній ОМБ на 27 % та на 57,2 % відповідно (рис. 2).

Таким чином, ЕТЛП за умов курсового введення щурам з моделлю субхронічного гепатиту сприяє 100 % виживаності тварин, зменшує прояви інтоксикації та відновлює функціональний стан печінки, що може бути зумовлено біологічно активними речовинами, що входять до складу ЕТЛП (білок, амінокислоти, дубильні речовини, ізофлавоноїди, флавоноїди апігенін, лютеолін, кверцетин, рутин, органічні кислоти кофейна, галова, ферулова тощо).

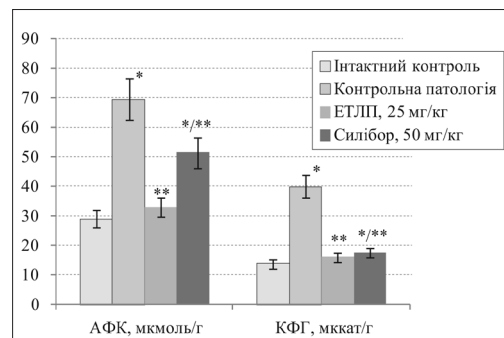


Рис. 2. Показники окисної модифікації у щурів за умов субхронічного гепатиту та застосування екстракту з трави люцерни посівної, у. о.

Примітка. *Відхилення показника достовірно відносно групи інтактного контролю, $P \leq 0,05$; **достовірно відносно групи контрольної патології, $P \leq 0,05$.

Висновок

У досліджах на щурах з моделлю субхронічного гепатиту встановлено, що курсове лікувально-профілактичне введення екстракту з трави люцерни посівної (щоденно протягом 6 днів у дозі 25 мг/кг) сприяє 100 % виживаності тварин, зменшенню ознак інтоксикації (масового коефіцієнта печінки, вмісту молекул середньої маси та сечовини в крові), нормалізації функціонального

стану печінки (зниження активності маркерних ферментів цитолізу, підвищення вмісту загального білка в тканині печінки, загального білка та окремих його фракцій у крові, зменшення вмісту продуктів ПОЛ, у тому числі продуктів окисної модифікації білків тощо). За гепатопротекторною активністю екстракт з трави люцерни посівної не поступається, а за окремими показниками переважає препарат порівняння силібор.

1. Биохимические показатели крови, их референсные значения, причины изменения уровня в сыворотке крови [Электронный ресурс] / В. В. Андрушкевич. – Новосибирск, 2006. – Режим доступа: 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: метод. рек; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
4. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко та ін. // Фармацевтичний часопис. – 2008. – № 2(6). – С. 27–30.
5. Єрьоменко Р. Ф. Дослідження впливу екстракту з трави люцерни посівної на стан мембранных білків та мембран в умовах гемолізу еритроцитів / Р. Ф. Єрьоменко // Український біофармацевтичний журнал. – 2011. – № 6 (17). – С. 22–26.
6. Ежова Г. П. Биомедицинские исследования гомеостаза организма человека: учеб. – метод. пособ. / Г. П. Ежова, А. А. Бабаев. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. – 80 с.
7. Синтез эфирных тритерпеноидов группы лупана и их гепатопротекторная активность / О. Б. Флехтер, Л. Т. Карачурина, В. В. Поройков [и др.] // Биоорганическая химия. – 2000. – Т. 26, № 3. – С. 215–223.
8. Ткач С. М. Современные подходы к диагностике и лечению жировой болезни печени / С. М. Ткач // Здоров'я України. – 2008. – № 22. – С. 64–65.
9. 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.

Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан, О. Ю. Яценко

Исследование фармакологической активности экстракта из травы люцерны посевной в условиях субхронического гепатита у крыс

Установлено, что субхроническое влияние комбинации гепатотоксинов этанола и тетрахлорметана на печень крыс вызывает деструкцию мембран гепатоцитов и приводит к нарушению функциональной активности печени. Экстракт из травы люцерны посевной (ЭТЛП) в дозе 25 мг/кг лучше, чем препарат сравнения силібор в дозе 50 мг/кг, при лечебно-профилактическом введении восстанавливает белоксинтезирующую функцию печени за счет содержания большого количества белка, аминокислот и других биологически активных веществ, которые определяют антиоксидантные, мембраностабилизирующие, органопротекторные и противовоспалительные свойства ЭТЛП.

Ключевые слова: экстракт из травы люцерны посевной, субхронический гепатит, антиоксидантная активность, мембраностабилизирующая активность

R. F. Yeromenko, L. M. Maloshtan, O. Yu. Yatsenko

The study of the pharmacological activity of extract *Medicago sativa* sowing grass under conditions of subchronic hepatitis on rats

It was found that the subchronic effect of a combination of hepatotoxins of ethanol and carbon tetrachloride on the liver of rats caused the destruction of the membrane of hepatocytes and lead to the disruption of the functional activity of the liver. The extract *Medicago sativa* sowing grass (EGMS), dosing 25 mg / kg, is better than the reference medicine of silibor dosing 50 mg / kg both in medical-prophylactic oral administration, can restore the protein synthesis function of the liver due to the high protein content, amino acids and other biologically active substances that determine the antioxidant, membrane stabilizing, organoprotective and anti-inflammatory properties of EGMS.

Key words: extract *Medicago sativa* sowing grass, subchronic hepatitis, antioxidant activity, membrane stabilizing activity

Надійшла: 18.02.2013 р.

Контактна особа: Єрьоменко Римма Фуатівна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біології, фізіології та анатомії людини, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, м. Харків, 61002. Тел./факс: +38 0 57 706 30 73.