

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОРРЕКТОРА БЕЛКОВОГО ОБМЕНА ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ

[Р. Ф. Еременко, Л. Н. Малоштан](#)

Национальный фармацевтический университет (г. Харьков, Украина)

В данной работе показано, что экстракт из травы люцерны посевной (ЭТЛП) в дозе 25 мг/кг за счет содержания белков, аминокислот, флавоноидов, дубильных веществ и органических кислот способен ингибировать процессы свободнорадикального окисления такого биосубстрата, как белки, и восстанавливать функционирование антиоксидантной системы в условиях оксидативного стресса, инициированного тетрахлорметаном лучше, чем препараты сравнения силибор в дозе 50 мг/кг и калий оротат в дозе 180 мг/кг. Об этом свидетельствует ингибирование под влиянием ЭТЛП интенсивности окислительной модификации белков (ОМБ), что отразилось в снижении почти до интактного уровня ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белковых молекул — альдегидфенилгидразонов и кетондинитрофенилгидразонов при спонтанной и стимулированной ОМБ.

Ключевые слова: экстракт травы люцерны посевной, коррекция белкового обмена, перекисное окисление белков.

Еременко Римма Фуатовна — кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета, г. Харьков, Украина, рабочий телефон: (057) 706-30-73, e-mail: fuatovna@rambler.ru

Малоштан Людмила Николаевна — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета, г. Харьков, Украина, рабочий телефон: (057) 706-30-73, e-mail: fuatovna@rambler.ru

Введение. Известно, что процессы свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул во время окислительного стресса (ОС) могут деструктивно влиять на стабильность гомеостаза и быть причиной многих патологических процессов [1–3]. Окисленные макромолекулы, количество которых увеличивается лавинообразно, и которые являются неконтролируемыми и циркулируют в организме длительное время, формируют в организме патологические процессы, которые сопровождаются ростом катаболизма

и гиперкатаболизма. Мишенями для повреждающего действия свободных радикалов являются такие биосубстраты как белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Наиболее изученной в патогенезе заболеваний является роль перекисного окисления липидов (ПОЛ), которое является частным проявлением СРО и считается одним из универсальных и фундаментальных механизмов повреждения клеточных мембран [3-5]. Первыми субстратами, попадающими под действие окислительной модификации, являются молекулы белков [3-5]. Накопление окислительных белков рассматривается как один из факторов регуляции синтеза и распада белков, активации протеолитических ферментов, которые избирательно разрушают окисленные белки. Данный процесс рассматривается как проявление антиоксидантной защиты организма. Поэтому оценка степени окислительной модификации белков (ОМБ) является одним из ранних и наиболее надежных индикаторов повреждения СРО мембран, клеток и тканей, потому что белки крови, которые попали под окислительную деструкцию, имеют более длительный период распада, чем продукты ПОЛ, который делает их перспективным маркером интенсивности СРО [3, 5]. Благодаря изучению особенностей динамики антиоксидантной системы (АОС) и процессов липопероксидации стало возможным применение в практической медицине современных антиоксидантов, таких как кверцетин, силимарин, карнитин, триметазидин, цитохром-С. В настоящее время они стали обязательным компонентом при лечении инсультов, острых и хронических нарушений печени и других осложнений. Новым направлением стало исследование ОМБ при различных патологических состояниях в сыворотке крови [3].

Целью нашего исследования явилось изучение влияния корректора белкового обмена экстракта травы люцерны посевной (ЭТЛП), содержащий биологически активные вещества с антиоксидантными свойствами [6], на интенсивность СРО белков в условиях ОС организма.

Методы исследования. ОС вызывали у крыс с помощью классического мембранотоксина тетрахлорметана, повреждающее действие которого опосредствуется за счет интенсификации процессов СРО биосубстратов клеточных мембран, таких как белки и липиды. В качестве основных индукторов ОМБ в первую очередь рассматривают активаторы факторов O_2 , увеличения свободного Fe, продукты ПОЛ и снижение антиоксидантной защиты, альдегидфенилгидразоны (АФГ) и кетондинитрофенилгидразоны (КФГ) как раннего и позднего маркеров оксидативного стресса [3, 7].

Продукты ОМБ повреждают мембраны митохондрий, вызывая стойкие нарушения метаболизма. ОМБ вызывают изменения свойств белковой молекулы: фрагментацию, агрегацию и подверженность протеолизу. В результате происходит образование продуктов с высокой функциональной активностью. Резкое усиление окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты приводит к развитию оксидативного стресса, являющегося одним из универсальных механизмов повреждения тканей организма. АФГ являются более ранними маркерами окислительной деструкции белка, а КФГ — более поздними. Определение продуктов спонтанной ОМБ позволяет оценить способность организма обновлять свой белковый фонд, что характеризует окислительный потенциал организма. Стимулированная ОМБ характеризует степень резервно-адаптационных возможностей организма, насколько АОС готова к возможным стрессовым повреждениям [2].

Исследование проведено на 40 белых нелинейных крысах массой 180–200 г. с соблюдением требований комиссии по биоэтике НФаУ и «Общих этических принципов

экспериментов на животных» (Киев, 2001), которые согласуются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) [7]. Животных рандомизировали по группам по 8 голов следующим образом: 1 — интактный контроль (ИК); 2 — контрольная патология (КП); 3 — опытная, которым вводили ЭТЛП в дозе 25 мг/кг; 4 — опытная, которым вводили силибор в дозе 50 мг/кг, 5 — опытная, которым вводили калия оротат в дозе 180 мг/кг. Исследуемый ЭТЛП и препараты сравнения вводили внутривентрикулярно на фоне модельной патологии, которую вызывали введением тетрахлорметана крысам в течение 6-ти суток. CCl_4 вводили в виде 50 % масляного раствора в дозе 0,4 мл/100 г массы тела [7]. Исследуемый ЭТЛП, а также препараты сравнения силибор и калия оротат вводили животным во время эксперимента ежедневно в течение 6-ти суток через 2 часа после введения мембранотоксина [7]. На 7-е сутки крыс взвешивали и выводили из эксперимента путем декапитации в условиях барбамилового наркоза. В сыворотке крови определяли показатели ОМБ по методу О. Е. Дубининой [3].

Уровень продуктов ОМБ — АФГ и КФГ определяли как исходно (спонтанная активность), так и после стимулирования двухвалентным железом (металл-индуцированная модификационная деструкция протеиновых молекул в условиях интенсификации генерации свободных радикалов). Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Для инициации окислительной модификации белка использовали среду Фентона: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4), Fe^{2+} (10^{-3} М) и H_2O_2 (3×10^{-4} М). Для определения ОМБ проводили предварительное их осаждение с помощью 20 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Для работы брали два образца биопробы: для спонтанной и металл-индуцированной регистрации ОМБ [3].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica 6,0». Для получения статистических данных использовали параметрические методы (метод Ньюмана-Кейлса). При сравнении статистических выборок был принят уровень значимости $p < 0,05$. Результаты исследования представлены на рис. 1, 2.

Результаты исследования и обсуждение. В результате исследования было установлено, что субхроническое введение в течение 7-ми дней гепатотоксина тетрахлорметана на организм крыс вызывает развитие ОС и напряжение АОС (рис. 1, 2). О развитии ОС в результате СРО биосубстратов свидетельствует рост в сыворотке крови уровня ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белков АФГ и КФГ при спонтанной ОМБ в 2,27 и 2,72 раза соответственно (рис. 1), а при стимулируемой ОМБ — в 1,85 и у 2,31 раза соответственно (рис. 2), что свидетельствует о значимой интенсификации ОМБ.

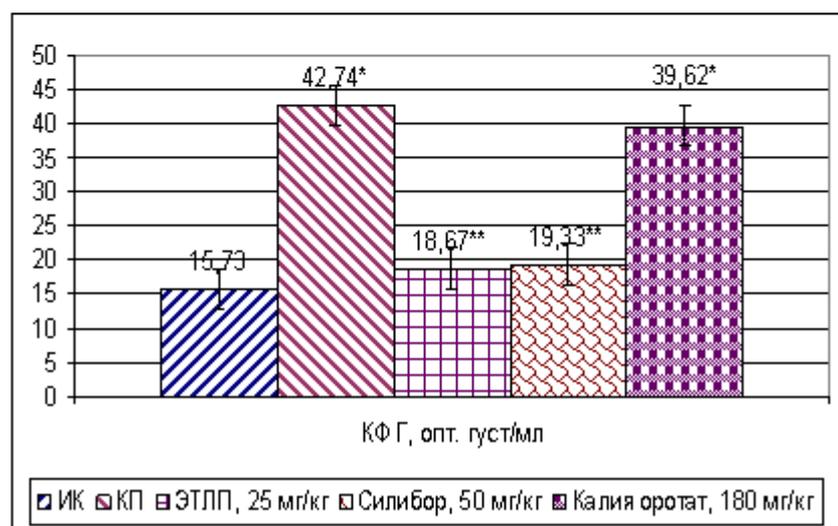
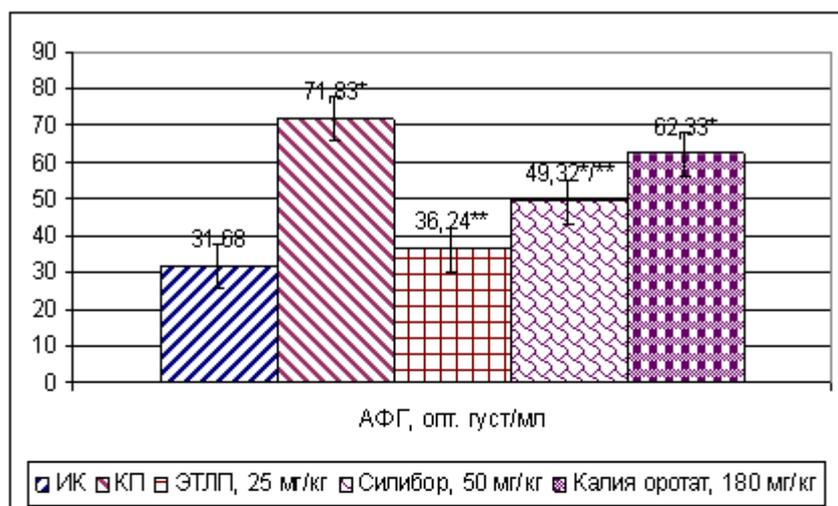


Рис. 1. Влияние ЭТЛП и препаратов сравнения силибора и калия оротата на уровень ранних и поздних маркеров АФГ и КФГ соответственно в условиях спонтанной ОМБ

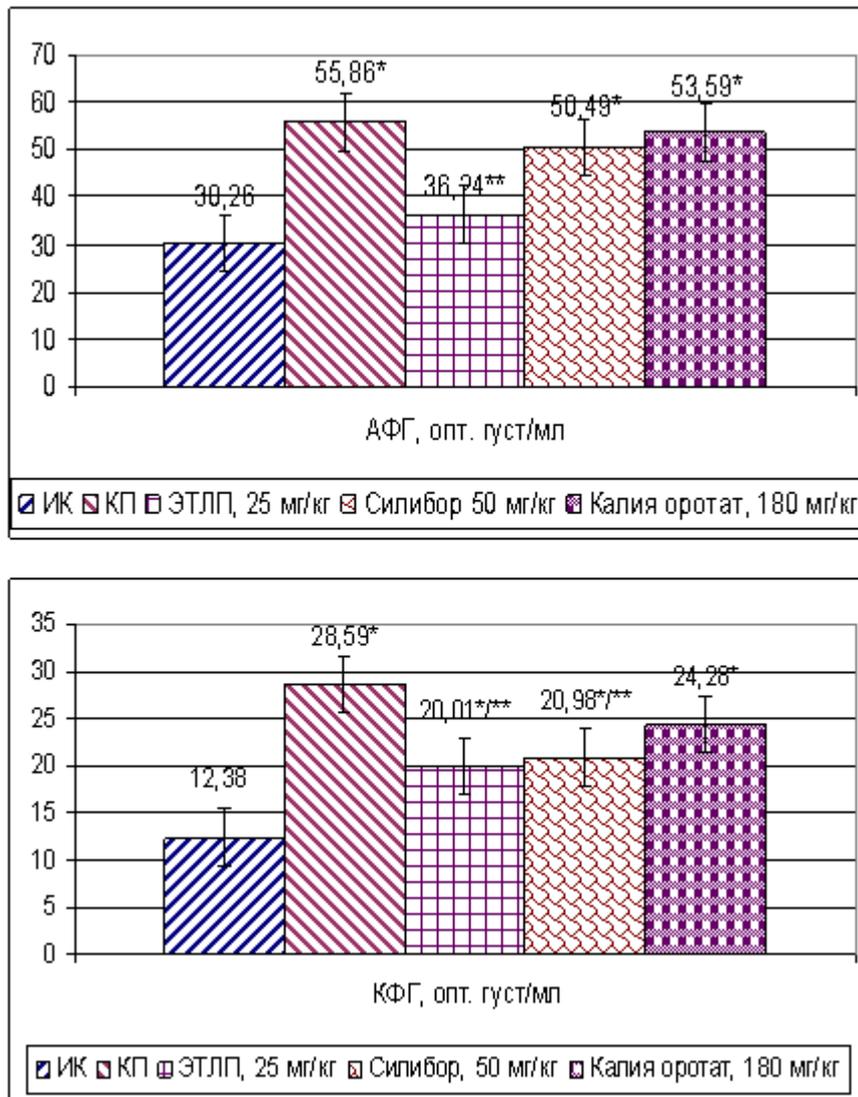


Рис. 2. Влияние ЭТЛП и препаратов сравнения силибора и калия оротата на уровень ранних и поздних маркеров АФГ и КФГ соответственно в условиях стимулированной ОМБ; * — отклонение показателя достоверно по отношению к группе ИК, $p \leq 0,05$; ** — отклонение показателя достоверно по отношению к группе КП, $p \leq 0,05$

Исследуемый ЭТЛП в дозе 25 мг/кг, который в своем составе содержит БАВ с установленными антиоксидантными свойствами — белки, аминокислоты, флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты [6], способствовал снижению интенсивности ОМБ, о чем свидетельствует достоверное относительно группы КП снижение почти до интактного уровня ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белковых молекул (ОДБМ) АФГ и КФГ при спонтанной и стимулированной ОМБ (рис. 1, 2). Так, под воздействием ЭТЛП уровень ранних маркеров ОДБМ АФГ снижался относительно группы КП в 1,98 раза при спонтанной ОМБ и в 1,84 раза — при стимулированной ОМБ. Уровень поздних маркеров ОДБМ КФГ под воздействием исследуемого ЭТЛП снижался в 2,28 раза при спонтанной ОМБ и в 1,43 раза — при стимулированной ОМБ (рис. 1, 2). Это говорит о том, что ЭТЛП способствует восполнению запаса нормальных неокисленных белковых молекул, которые заменяют окисленные фракции белков и восстанавливают их функции.

Препарат сравнения с выраженными антиоксидантными свойствами и аналог по составу силибор в дозе 50 мг/кг несколько уступал ЭТЛП по влиянию на показатели ОДБМ

достоверно относительно группы КП, снижая уровень ранних маркеров АФГ в 1,46 раза только при спонтанной ОМБ и не изменяя его при стимулируемой ОМБ, а уровень поздних маркеров ОДМБ КФГ при спонтанной ОМБ — в 2,26 раза и при стимулируемой ОМБ — в 1,42 раза (рис. 1, 2).

В отличие от ЭТЛП и силибора, препарат сравнения калия оротат в дозе 180 мг/кг, который является аналогом по действию, стимулируя синтез белка в организме, не проявил антиоксидантных свойств, о чем свидетельствует отсутствие изменений относительно группы КП в значениях показателей ОДМБ (рис. 1, 2).

Следовательно, ЭТЛП в 1,2 раза превосходил препарат сравнения силибор, что способствовало восстановлению антиоксидантной защиты и функционированию АОС организма крыс, в то время как препарат сравнения калия оротат, стимулируя синтез белка, не способен ингибировать процессы СРО белков и улучшать АОС.

Окислительная деструкция белков является одним из признаков ОС. Уровень ОМБ в сыворотке крови крыс опытных групп был сравним и превышал соответствующие значения спонтанной ОМБ интактной группы животных. В ранних стадиях ОС преобладают АФГ (маркеры фрагментации белков), в поздних стадиях — КФГ (маркеры агрегации белков). В контрольной группе значительно преобладает второй маркер ОС. Тот факт, что в модифицированных группах белков обнаружено преобладание АФГ над КФГ при введении ЭТЛП в дозе 25 мг/кг, свидетельствует о том, что под воздействием ЭТЛП процесс ОС не переходит в развитую стадию и носит обратимый характер. Также следует отметить, что преобладание АФГ-форм может свидетельствовать о наличии процесса фрагментации белков с образованием средних и низкомолекулярных фрагментов [5, 8]. Данный процесс сопровождается интенсивностью обменных процессов организма и, следовательно, отражается на возможности восстановления уровня белков в крови и тканях.

Анализ полученных результатов говорит о том, что ЭТЛП способствует восполнению запаса нормальных неокисленных белковых молекул, которые заменяют окисленные фракции белков и восстанавливают их функции, что способствует росту активности АОЗ и функционирования АОС организма (рис. 1, 2). Об этом свидетельствует способность ЭТЛП предотвращать ОМБ на ранних (ингибирует образование АФГ) и поздних (ингибирует образование КФГ) этапах процесса в спонтанных условиях (рис. 1) и менее интенсивно при стимуляции процессов окисления (рис. 2). В отличие от ЭТЛП силибор проявлял антиоксидантную активность только на позднем этапе как спонтанного, так и стимулированного процесса окисления белковых молекул, что говорит о том, что силибор не способен предотвращать манифестацию процесса окисления и за счет антиоксидантных свойств биофлавоноидов ингибирует уже активированные процессы СРО. Также, это позволяет сделать вывод, что ЭТЛП имеет отличный от силибора механизм действия и подтверждает его способность восстанавливать белковый обмен в условиях оксидативного стресса.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что экстракт из травы люцерны посевной в дозе 25 мг/кг за счет содержания белков, аминокислот, флавоноидов, дубильных веществ и органических кислот способен ингибировать процессы свободнорадикального окисления такого биосубстрата как белки и восстанавливать функционирование АОС в условиях оксидативного стресса, инициированного тетрахлорметаном, лучше, чем препараты сравнения силибор в дозе 50 мг/кг и калия оротат в дозе 180 мг/кг. Об этом свидетельствует ингибирование под влиянием ЭТЛП интенсивности ОМБ, что отразилось в снижении почти до интактного уровня ранних

и поздних маркеров окислительной деструкции белковых молекул — АФГ и КФГ при спонтанной и стимулированной ОМБ.

Список литературы

1. Горожанская Э. Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях (лекция) / Э. Г. Горожанская // *Клин. лаб. диагностика*. — 2010. — № 6. — С. 28-44.
2. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов [и др.] // *Соврем. проблемы токсикологии*. — 2005. — № 3. — С. 20-26.
3. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко биологические аспекты / Е. Е. Дубинина. — СПб. : Мед. пресса, 2006. — 400 с.
4. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. — 2003. — Vol. 329. — P. 23-38.
5. Cai Z. Protein. Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.-J. Yan // *Protein Journal of Biochemical and Pharmacological Research*. — 2013. — Vol. 1 (1). — P. 15-26.
6. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрмоєнко [та інш.] // *Фармацевтичний часопис*. — 2008. — № 2 (6). — С. 27-30.
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. — К. : Авіцена, 2001. — 528 с.
8. Єрмоєнко Р. Ф. Визначення впливу екстракту з трави люцерни посівної на білковий обмін у системі крові за умов доксорубіцинової гіпопротеїнемії / Р. Ф. Єрмоєнко // *Медична хімія*. — 2012. — Т. 14, № 1 (50). — С. 100-103.

ASSESSMENT OF INFLUENCE OF PROTEIN METABOLISM CORRECTOR OF LUCERN HERB ON PROCESSES OF PROTEIN OXIDATION

[R. F. Eremenko, L. N. Maloshtan](#)

National Pharmaceutical University (Kharkov, the Ukraine)

In this work it is shown that lucern herb extract (LHE) in a dose of 25 mg/kg at the expense of the content of proteins, amino acids, flavonoids, tannins and organic acids is capable to inhibit processes of free radical oxidation of such biosubstratum as proteins, and to restore functioning of antioxidant system at oxidative stress initiated by tetrachlormethane is better, than comparison medicines as silibor in a dose of 50 mg/kg and potassium orotate in a dose of 180 mg/kg. The inhibition testifies that under the influence of LHE intensity of the oxidizing modification of proteins (OMP) that was reflected in decrease almost to intact level of early and late markers of oxidizing destruction of proteinaceous molecules — aldehydphenylhydrazone and ketondinitrophenylhydrazone at spontaneous and stimulated OMP.

Keywords: extract of lucern herb, correction of protein metabolism, peroxidation of proteins.

About authors:

Eremenko Rimma Fuatovna — candidate of biological science, assistant professor of physiology and human anatomy at National Pharmaceutical University, office phone: (057) 706-30-73, e-mail: fuatovna@rambler.ru

Maloshtan Lyudmila Nikolaevna — doctor of biological science, professor, head of biology and human anatomy chair at National Pharmaceutical University, office phone: +38(057) 706-30-73, e-mail: fuatovna@rambler.ru

List of the Literature:

1. Gorozhanskaya E. G. Free radical oxidation and mechanisms of antioxidant protection in normal cell and at tumoral diseases (lecture) / E. G. Gorozhanskaya // Clin. lab. diagnostics. — 2010. — № 6. — P. 28-44.
2. Toxicological consequences of oxidizing modification of proteins at various pathological states (literature review) / Y. I. Gubsky, I. F. Belenichev, S. V. Pavlov [etc.] // Modern toxicological problems. — 2005. — № 3. — P. 20-26.
3. Dubinina E. E. Products of metabolism of oxygen in functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinic biological aspects / E. E. Dubinina. — SPb.: Medical press, 2006. — 400 P.
4. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini [et al.] // Clin. Chim. Acta. — 2003. — Vol. 329. — P. 23-38.
5. Cai Z. Protein. Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.-J.

- Yan // Protein Journal of Biochemical and Pharmacological Research. — 2013. — Vol. 1 (1). — P. 15-26.
6. Research of phenolic complex from lucern herb / S. V. Kovalyov, A. M. Kovalyova, G. F. Eremenko [and others] // Pharmaceutical magazine. — 2008. — № 2 (6). — P. 27-30.
 7. Preclinical researches of medicines: methodical guidance / Under the editorship of the member correspondent of AMS of Ukraine of A. V. Stefanov. — K.: Avicenna, 2001. — 528 P.
 8. Eremenko G. F. Definition of influence of lucern herb on proteinaceous exchange in blood system at doxorubicine hypoproteinemia / G. F. Eremenko // Medical chemistry. — 2012. — V. 14, № 1 (50). — P. 100-103.