УДК 616.379-008.64:599.323.45:591.111.1:633.881

М.Р. ХОХЛА, Г.Я. КЛЕВЕТА, Я.П. ЧАЙКА, М.І. СКИБІЦЬКА, Н.О. СИБІРНА
Львівський національний університет ім. Івана Франка

Вплив екстракту галеги лікарської на структурно-функціональний стан мембран еритроцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету

Важливою проблемою сучасної діабетології є рання інвалідність і смертність хворих на цукровий діабет (ЦД) 1-го типу, однією з причин яких є діабетичні ангіопатії. Патогенез мікросудинних ускладнень пов'язаний із залученням у патологічний процес еритроцитів, найчисленнішої клітинної популяції русла крові. Червоні кров'яні клітини виконують не лише специфічну газотранспортну функцію, але й беруть участь у регуляції реологічних властивостей крові.

Однією з патологічних змін реологічного статусу крові за умов ЦД є структурно-функціональна дестабілізація її клітинних компонентів (еритроцитів, тромбоцитів), що виникає внаслідок неензиматичного глікозилювання білків, окисної модифікації ліпідних і білкових молекул мембран еритроцитів. Як наслідок, підвищується агрегаційна здатність еритроцитів і знижується їхня здатність до деформації, що є причиною зростання в'язкості крові та утруднення її руху мікроциркуляційним руслом та відіграє важливу роль у розвитку судинних ускладнень ЦД [7].

Корекцію судинних порушень ЦД можна здійснювати різними шляхами, зокрема, застосовуючи препарати, що знижують рівень глюкози у крові. Оскільки використання синтетичних лікарських препаратів має низку побічних ефектів і протипоказань, увага дослідників все частіше спрямована на застосування субстанцій природного, зокрема, рослинного походження, які виявляють суттєву біологічну ефективність. До лікарських рослин, речовини яких мають найбільш виражену цукрознижувальну дію та використовуються у клінічній діабетології, належить галега лікарська (*Galega officinalis L.*) [1, 11, 12]. Біологічна дія галеги лікарської сьогодні недостатньо вивчена. Тому існує потреба

© Хохла М.Р., Клевета Г.Я., Чайка Я.П. та ін., 2012

детального дослідження на рівні морфо-функціонального стану органів і систем, які найбільше уражуються при діабеті, зокрема системи периферичної крові.

Мета роботи — дослідити вплив екстракту галеги лікарської на структурно-функціональний стан мембран еритроцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу шляхом визначення агрегації цих клітин, індукованої речовинами різної природи.

Матеріали та методи досліджень. Досліди проведено на білих безпородних щурах масою тіла 100...150 г, які перебували у стандартних умовах віварію, з дотриманням етичних норм проведення експериментальних досліджень згідно з "Загальними принципами роботи на тваринах", затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 26.02.2006 р.

Експериментальний ЦД 1-го типу індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину ("*Sigma*", США) з розрахунку 5,5 мг на 100 г маси тіла. Для експерименту використовували тварин з концентрацією глюкози в крові понад 14,09±1,44 ммоль/л (після 18-годинного голодування). Концентрацію глюкози в крові визначали глюкозооксидазним методом (набір реактивів "Діаглюк", Львів, Україна). Через два тижні після індукції ЦД тваринам вводили per os безалкалоїдну фракцію ЕГЛ дозою 0,6 г/кг маси тіла впродовж 14 діб. Отримання екстракту галеги лікарської та поділ його на алкалоїдвмісну і безалкалоїдну фракції було проведено згідно з протоколом [10].

Агрегаційну здатність еритроцитів вивчали турбідиметричним методом [9] за допомогою двоканального лазерного аналізатора агрегації "LA 230" (НВФ "БИОЛА", Росія) в суспензії відмитих еритроцитів ($4{,}2\times10^6$ клітин в 1 мл) при перемішуванні зі швидкістю 200 об./хв (+37°С). Максимальний ступінь агрегації визначали як максимальне значення світлопропускання після додавання індуктора і виражали у відсотках. Як індуктори агрегації використовували альціановий синій у концентрації 7 мкг/мл та лектини: WGA ("*Sigma*", США), MAA ("*Sigma*", США) і SNA ("*Sigma*", США)) у концентрації 10 мкг/мл. *WGA* — лектин зародків пшениці *(Triticum vulgaris)* — специфічний до *N*-ацетил-β,D-глюкозаміну *(β-DglcNAc)* і *N*-ацетилнейрамінової кислоти (NeuNAc); *MAA* — лектин акації амурської *(Maackia amurensis)* — специфічний до послідовності *NeuNAc*(α2→3) *DGal/DgalNAc*, не зв'язує при цьому *NeuNAc*(α2→6) *DGal/DgalN* послідовності в олігосахаридах; *SNA* — лектин бузини чорної *(Sambucus nigra)* — специфічний до послідовності *NeuNAc*(α2→6) *DGal/DgalNAc*, не зв'язує при цьому *NeuNAc*(α2→3) *DGal/DgalNAc* послідовності в олігосахаридах [3].

Загальний вміст сіалових кислот у мембранах еритроцитів визначали методом Ворена [14]. Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Функціональний стан клітин значною мірою залежить від структурно-функціональної організації рецепторних молекул клітинної мембрани. Кількість рецепторів на поверхні мембрани клітин за різних умов функціонування клітини може змінюватись, але їхня структура залишається відносно стабільною. Рецепторами є переважно глікопротеїни, вуглеводна частина яких у вигляді олігосахаридних ланцюгів утворює надмембранні комплекси. При різних патологічних станах можливі зміни кількісних і якісних характеристик глікокон'югатів поверхні клітин [2, 6, 8].

Альціановий синій — органічний барвник, молекула якого має позитивний заряд і вступає в електростатичну взаємодію з кислими мукополісахаридами плазматичної мембрани клітини [4]. У результаті дослідження альціаніндукованої агрегації еритроцитів за умов ЦД виявлено підвищення максимального ступеня агрегації на 96 % порівняно з контролем (рис. 1, *а*). Ці дані свідчать про зміну фіксова-

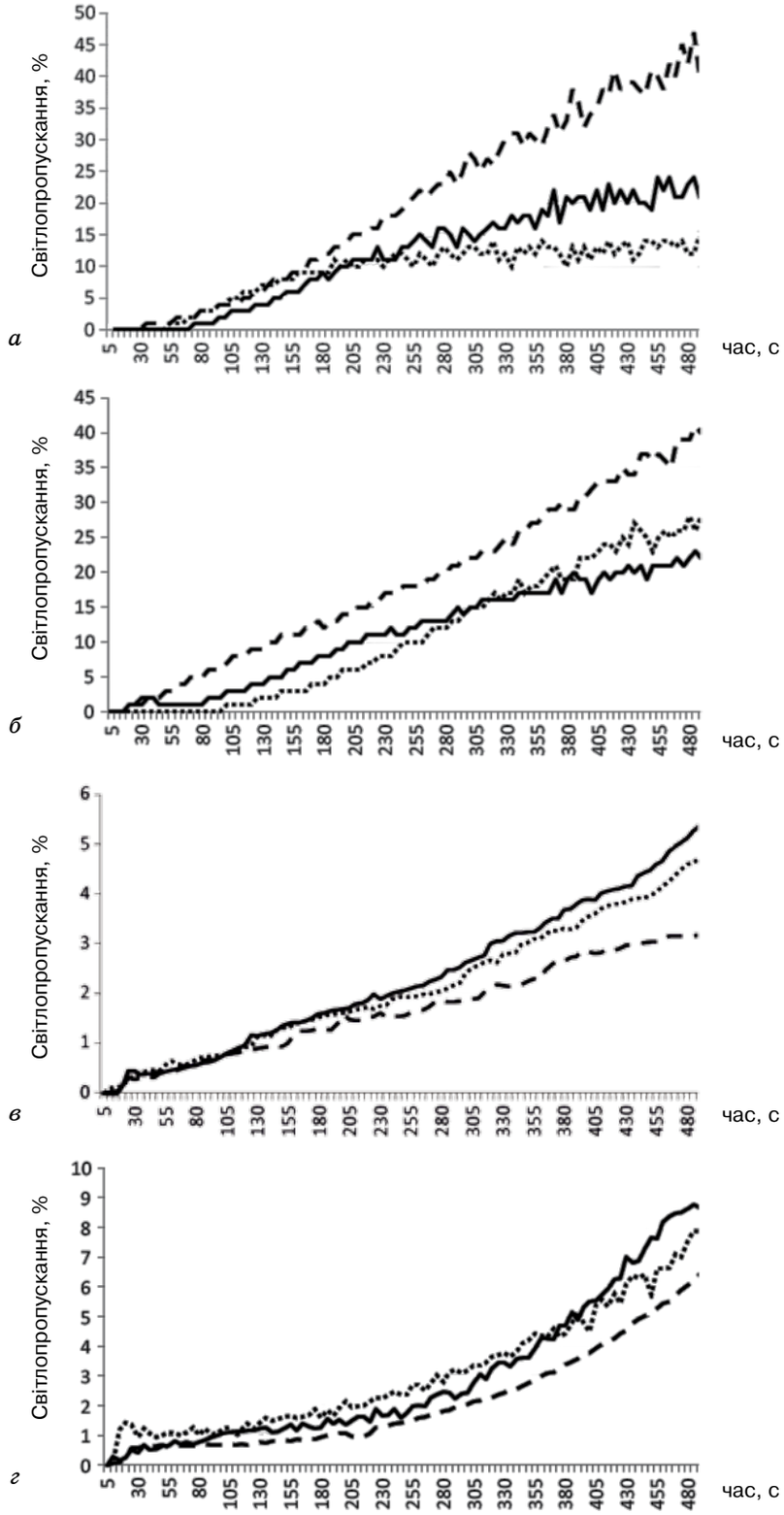

Рис. 1. Типові криві агрегації еритроцитів за умов ЕЦД та введення ЕГЛ при використанні індукторів агрегації різної природи: *а* — альціановий синій; *б* — лектин *WGA*; *в* — лектин *SNA*; *г* — лектин *MAA*

ного поверхневого заряду еритроцитів у щурів за умов ЦД 1-го типу, основний вклад у формування якого вносять залишки сіалових кислот у складі глікопротеїнів та гліколіпідів мембран еритроцитів [5]. Введення тваринам ЕГЛ нормалізує функціональний стан еритроцитів, що виявляється у зниженні агрегаційної здатності (ступінь агрегації знижувався на 51% щодо еритроцитів діабетичних тварин) (рис. 1, *а*).

Різноманіття сіалогліканів на клітинній поверхні зумовлено утворенням різних зв'язків сіалових кислот із субтермінальними залишками вуглеводів. Для порівняння кількості залишків сіалових кислот, приєднаних до субтермінального залишку моносахариду, яким найчастіше є галактоза, приєднана $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ глікозидним зв'язком до поверхні еритроцитарної мембрани, як індуктори агрегації було використано сіалоспецифічні лектини *WGA*, *MAA* та *SNA*.

При використанні як індуктора агрегації лектину *WGA* за умов ЕЦД встановлено підвищення максимального ступеня агрегації на 81%. Це свідчить про підвищення рівня експонування глікопротеїнів на поверхні клітин, які комплементарні до цього лектину. Введення ЕГЛ щурам за умов діабету зумовлює суттєве зниження агрегаційної здатності еритроцитів (на 40% щодо еритроцитів діабетичних тварин) (рис. 1, *б*).

Розвиток ЦД супроводжується зменшенням на 19% ступеня агрегації при використанні як індуктора агрегації лектину *MAA* та більш вираженим зниженням (на 43% ($p < 0{,}05$)) цього показника при *SNA*-індукованій агрегації. Пригнічення процесу агрегації за умов діабету при використанні цих лектинів свідчить про знижене експонування сіалових кислот, приєднаних $\alpha 2 \rightarrow 3$ та $\alpha 2 \rightarrow 6$ -глікозидним зв'язком до субтермінальних залишків галактози. Слід зазначити, що кількість сайтів зв'язування лектину *SNA* на еритроцитах щурів за патологічних умов знижувалася удвічі більше, ніж для лектину *MAA*. При застосуванні ЕГЛ агрегаційна здатність еритроцитів поверталася до значень норми (рис. 1, *в*, *г*).

Для підтвердження даних, отриманих методом альціан- та лектиніндукованої агрегації еритроцитів, було визначено вміст мембранозв'язаних сіалових кислот. Вміст останніх за умов стрептозотоцинового

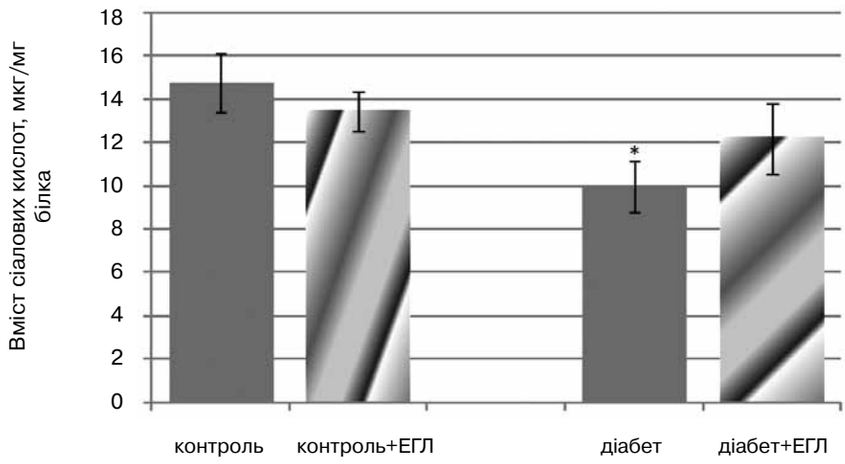

Рис. 2. Вміст сіалових кислот за умов ЦД та введення ЕГЛ

цукрового діабету знижувався на 32% ($p < 0,05$) (рис. 2), що може свідчити про процеси десіалізації, які супроводжуються демаскуванням субтермінальних залишків галактози, що є маркерами елімінації глікопротеїнів у печінці [13]. Застосування ЕГЛ за умов діабету призводить до зростання вмісту сіалових кислот на 22%, що узгоджується із нормалізуючим впливом досліджуваного лікувального екстракту на показники агрегації еритроцитів.

Виходячи з аналізу отриманих експериментальних даних дослідження агрегаційної здатності еритроцитів із використанням як індуктора агрегації альціанового синього можна зробити висновок, що за цукрового діабету знижується загальний негативний поверхневий заряд. Ймовірно, основний вклад у зміну цього показника знижує вміст мембранозв'язаних сіалових кислот, що містяться у складі як глікопротеїнів, так і гліколіпідів. Наведені дані щодо зниження *MAA*- та *SNA*-індукованої агрегації на тлі зменшення вмісту сіалових кислот можуть свідчити про активацію нейрамінідази при цукровому діабеті. Активність цього ензиму залежить від багатьох чинників, зокрема, значення pH крові, яке за умов цукрового діабету знижується внаслідок розвитку метаболічного ацидозу та гіпоксії через відносний чи абсолютний дефіцит інсуліну.

Отже, застосування ЕГЛ виявляє нормалізуючий вплив на функціональний стан еритроцитів. Не виключено, що такий ефект зумовлений впливом біологічно активних речовин екстракту лікарської рослини на активність ензимів, задіяних у відщепленні чи перенесенні залишків сіалових кислот (нейрамінідази, транссіалідази та сіалілтрансферази). Існують літературні дані, в яких показано вплив екстрактів деяких рослин на активність транссіалідази [2].

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ажунова Т.А., Маркизов П.В.* Антидиабетическая активность галеги лекарственной *(Galega officinalis L.)* // Хим.-фарм. журн. — 1994. — № 28 (6). — Р. 35–36. 2. *Аксенов Д.В., Каплун В.В., Тертов В.В. и др.* Влияние экстрактов растительного происхождения на активность транссиалидазы плазмы крови человека // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2007. — № 143(1). — С. 52–56. 3. *Антонюк В.О.* Лектини та їх сировинні джерела. — Львів: Кварт, 2005. — 180 с. 4. *Булегенов К.Е., Балмуханов Б.С.* Агрегация эритроцитов в присутствии альцианового голубого // Кардиология. — 1993. — № 3. — Р. 42–44. 5. *Канюка О.П., Філяк Є.З., Сибірна Н.О.* Особливості структурно-функціональної організації мембран еритроцитів мишей дикого типу та мишей із нокаутом гена *pttg* // Біол. студії. — 2011. № 5(1). — Р. 97–104. 6. *Киричук В.Ф., Воскобой И.В.* Влияние лектинов на агрегацию нейтрофилов и эритроцитов здоровых людей // Цитология. — 2004. — № 46(3). — Р. 151–154. 7. *Кравец Е.Б., Яковлева Н.М., Рязанцева Н.В.* Особенности микрореологических свойств эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 1 // Сах. диабет. — 2005. — № 1. — Р. 14–17. 8. *Сибірна Н.О., Буслик Т.В.* Глікопротеїни мембран еритроцитів та будова їхніх вуглеводних детермінант // Біол. студії. — 2009. — № 3(1). — Р. 79–94. 9. *Спасов А.А., Островський О.В, Дегтярев А.Н., Кучерявенко А.Ф.* Изучение агрегации эритроцитов на лазерном агрегометре // Клин. лаб. диагностика. — 2000. — № 5. — Р. 21–23. 10. *Хохла М.Р., Клевета Г.Я., Чайка Я.П. та ін.* Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської // Біол. студії / Studia Biologica. — 2012. — № 6(1). — Р. 37–46. 11. *Якимова Т.В., Булкова В.Н., Ухова Т.М.* Влияние галеги лекарственной на течение экспериментального сахарного диабета // Бюлл. сиб. мед. — 2006. — Р. 146–147. 12. *Lemus I., Garc'a R., Delvillar E., Knop G.* Hypoglycaemic Activity of Four Plants Used in Chilean Popular Medicine // Phytotherapy research. — 1999. — № 13. — Р. 91–94. 13. *Venerando B., Fiorilli A., Croci G. et al.* Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients // Blood. — 2002. № 99. — Р. 1064–1070. 14. *Warren L.* The thiobarbituric acid assay of sialic acids // J. Biol. Chem. — 1959. — 234. — P. 1971–1975.

Стаття надійшла до редколегії 21.06.12

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

М.Р. ХОХЛА, Г.Я. КЛЕВЕТА, Я.П. ЧАЙКА, М.И. СКИБИЦКАЯ, Н.А. СИБИРНАЯ

В статье приведены данные о влиянии галеги лекарственной на структурно-функциональную организацию мембран эритроцитов крыс в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭСД) 1-го типа. На основании полученных данных можно сделать вывод, что применение галеги лекарственной нормализирует процесс агрегации эритроцитов в условиях данной патологии.

Ключевые слова: сахарный диабет, галега лекарственная, эритроциты, агрегация.

INFLUENCE OF GALEGA OFFICINALIS L. EXTRACT ON RATS ERYTHROCYTE MEMBRANES STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

M. KHOKHLA, G. KLEVETA , Ya. CHAJKA , M. SKYBITSKA, N. SYBIRNA

The article contains data on the influence of *Galega officinalis L.* on structural and functional organization of rats' erythrocyte membranes under the experimental diabetes mellitus (DM) type 1. Based on the obtained data we can conclude that the Galega officinalis normalizes aggregation ability of erythrocytes under DM.

Key words: diabetes mellitus, Galega officinalis L., erythrocytes, aggregation.