

І.В.Геруш

МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ НАСТОЯНКИ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ З МЕМБРАНАМИ ЕРИТРОЦИТІВ ДОНОРІВ

Кафедра медичної хімії (зав. – проф. І.Ф.Мешишен)
Буковинської державної медичної академії

Резюме. Вивчення впливу настоянки ехінацеї пурпурової на проникність мембран еритроцитів дозволило встановити, що досліджуваний препарат у гіпотонічному розчині виявляє двофазовий характер дії на мембрани еритроцитів донорів: при низьких концентраціях, що відповідають $0,206-4,12 D_{202}$, підвищує стабільність еритроцитарних мембран, а при концентрації настоянки ехінацеї пурпурової $7,24 D_{202}$ і вище – виявляє гемолітичний ефект. Таким чином, настоянка ехінацеї пурпурової виявляє виражену мембраностабілізуючу дію у широкому діапазоні концентрацій, а одержані дані підтверджують думку про те, що основним напрямком у механізмі її дії на обмін речовин є клітинні мембрани.

Ключові слова: настоянка ехінацеї пурпурової, еритроцити, мембрани, гемоліз.

Вступ. У зв'язку зі зростанням випадків побічної дії і алергічних реакцій при застосуванні синтетичних препаратів останнім часом намітився чіткий поворот до більш широкого використання в медицині речовин із природної сировини. Рослинний світ є невичерпним джерелом для подальшого поповнення арсеналу лікарських засобів новими ефективними препаратами. У зв'язку з цим постає важливе завдання – всебічно розширити пошукову роботу, направлену на створення та дослідження нових ефективних лікарських препаратів із рослинної сировини [2,5].

Цікавим у цьому плані є вивчення лікарських засобів з ехінацеї пурпурової. Існують численні відомості про біологічну дію та лікувальні властивості препаратів ехінацеї. Вони широко використовуються для лікування різноманітних захворювань як імуномодуючий, протизапальний, ранозагоюючий, антиоксидантний та протиінфекційний засоби [4,6,10,11]. Водночас механізми, які б могли пояснити вплив даного препарату на організм, до цього часу ще недостатньо вивчені.

Як відомо, першим етапом у механізмі дії лікарських препаратів на обмін речовин є їх взаємодія з клітинною мембраною. Характер такої взаємодії значною мірою визначає стан клітинного обміну. Зміну в структурі і функціях мембран сьогодні розглядають, як одну з універсальних ланок у патогенезі різноманітних захворювань. У клінічній практиці найбільш доступним матеріалом для дослідження проникності клітинних мембран є клітини крові, у першу чергу еритроцити.

Мета дослідження. Вивчити вплив настоянки ехінацеї пурпурової на проникність клітинних мембран еритроцитів донорів.

Матеріал і методи. Еритроцити отримували триразовим промиванням буфером (5 мл), який містив 150 мМ NaCl і 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4 (розчин 1). Відмиті еритроцити суспензували цим же буфером у співвідношенні 1:4. Стабілізуючу дію вивчали у розчині, що вміщував 69 мМ NaCl та 4,9 мМ фосфатного буфера, рН 7,4 (розчин 2). Вміст еритроцитів складав 160-170 млн. клітин/мл інкубаційного середовища.

У контрольні проби вносили 3,8 мл розчину 2 і 0,2 мл суспензії еритроцитів, інкубували 30 хв при 37°C. Проби центрифугували (3000 об/хв, 10 хв) і визначали вміст гемоглобіну за оптичною густиною досліджуваного розчину, яку вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 545 нм.

У дослідні проби вносили 3,4 мл розчину 2 та 0,4 мл препарату, розведеного на розчині 2 і 0,2 мл суспензії еритроцитів, інкубували 30 хв при 37°C, центрифугували і визначали вміст гемоглобіну.

Пробу на гемоліз проводили шляхом додавання до 3,8 мл дистильованої води 0,2 мл суспензії еритроцитів, ретельно перемішували, центрифугували і визначали вміст гемоглобіну. Стабілізуючу дію препарату виражали у відсотках гемолізу [12].

Результати дослідження та їх обговорення. Виходячи з того, що настоянка ехінацеї пурпурової вміщує різні хімічні компоненти, молекулярна маса яких невідома чи не може бути визначена, і враховуючи, що в УФ-спектрі поглинання препарат, за нашими даними [3], має лише один чіткий максимум поглинання при довжині хвилі 202 нм, ми використали як критерій концентрації препарату оптичну густину настоянки при даній довжині хвилі. Для досліджуваного засобу вона складає 206 одиниць при D_{202} .

Вивчення впливу настоянки ехінацеї пурпурової на проникність мембран еритроцитів дозволило встановити, що досліджуваний препарат у гіпотонічному розчині виявляє двофазовий характер дії на мембрани еритроцитів (рис. 1.) При низьких концентраціях препарату спостерігалася протекторна дія проти гіпотонічного гемолізу, а при високих - літична активність. Так, при кінцевій концентрації препарату, що відповідає 0,206 - 4,12 одиниць при D_{202} спостерігали стабілізуювальну дію препарату проти гіпотонічного гемолізу, а при 7,24 D_{202} і вище - гемолітичний ефект.

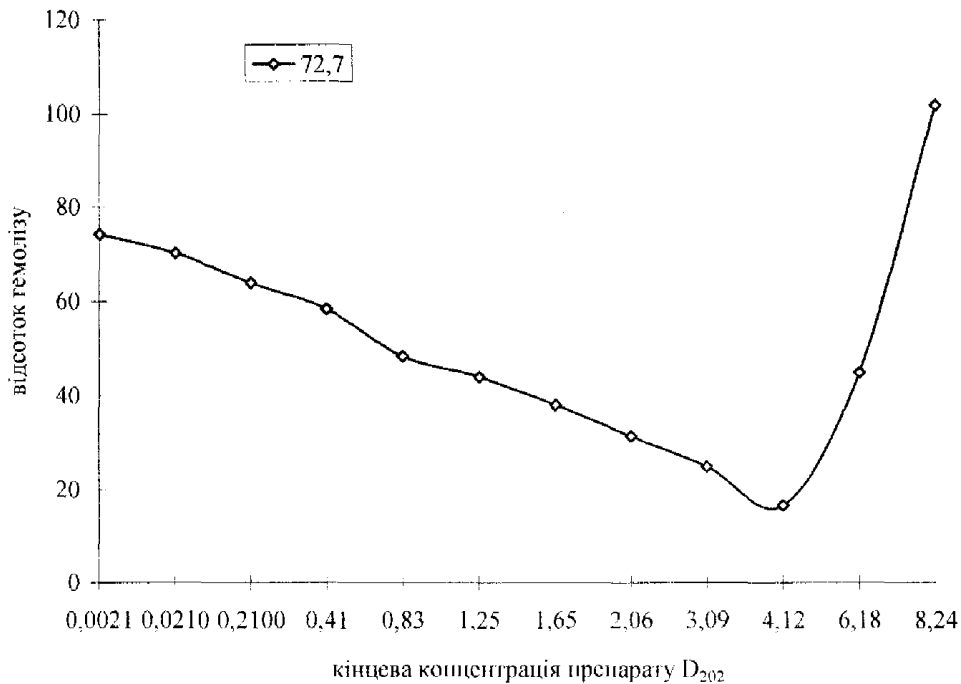


Рис. 1. Вплив настоянки ехінацеї пурпурової на проникність мембран еритроцитів (за відсутності препарату величина гемолізу дорівнювала 72,7 %).

Отже, настоянка ехінацеї пурпурової виявляє виражену мембраностабілізуювальну дію у широкому діапазоні концентрацій.

Настоянка ехінацеї містить велику кількість різноманітних біологічно активних речовин, які обумовлюють її фармако-терапевтичну активність. До складу препарату входять ненасичені жирні кислоти (олеїнова, лінолева та ліноленова), каротиноїди, поліфенольні сполуки, флавоноїди, алкалоїди, макро- і мікроелементи, дубильні речовини, вітаміни тощо [3,8,10]. Флавоноїди володіють високою біологічною активністю завдяки наявності в їх молекулі активних фенольних, гідроксильних та карбоксильних груп [7]. Вони піддаються різним біохімічним змінам і беруть участь у ряді фізіологічних процесів. Можна припустити, що між молекулою флавоноїду, білками та сіалоглікопротеїнами мембран виникають електростатичні взаємодії. Оскільки в настоянці ехінацеї містяться і жирні кислоти, то разом із електростатичною взаємодією флавоноїдів з еритроцитарною мембраною, важливим фактором біологічної активності настоянки ехінацеї пурпурової є ступінь гідрофобної взаємодії жирних кислот з фосфоліпідами і радикалами амінокислотних залишків білків клітинної мембрани.

Одержані нами експериментальні дані, а також відомості з літератури дають можливість зробити припущення щодо механізму дії настоянки ехінацеї пурпурової на проникність клітинних мембран.

Біологічна мембрана – багатокомпонентна система, до складу якої входять ліпо- і глікопротеїнові комплекси, холестерин, вода, макро- і мікроелементи. Ліпіди інтактних мембран складаються, в основному, із фосфо- та гліколіпідів, що мають гідрофільні (частіше всього заряджені) та гідрофобні групи і утворюють бімолекулярні шари. Останні являють собою каркас, ліпідну матрицю, в яку вміщені білки мембран. Білки та ліпіди мембран утримуються разом завдяки виникненню чисельних нековалентних взаємодій [1]. Мембранні ліпіди створюють бар'єри проникності і тим самим відмежовують окремі ділянки (компартаменти), тоді як специфічні білки опосередковують окремі функції мембран, такі, як транспорт, передачу інформації та перетворення енергії [1]. При цьому мембранні ліпіди

створюють середовище, необхідне для дії цих білків. По міцності зв'язку з мембраною відповідні білки поділяють на периферичні та інтегральні. Інтегральні білки утворюють чисельні зв'язки з вуглеводневими ланцюгами мембранних ліпідів, тоді як периферичні – зв'язані з мембранами електростатичними силами, і водневими зв'язками. Клітинні мембрани еукаріот містять від 2 до 10 % вуглеводів у формі гліколіпідів і глікопротеїнів. Гліколіпіди вищих організмів представлені похідними сфінгозину з одним чи більше залишками цукру. У мембранних глікопротеїнах один чи кілька вуглеводних ланцюгів приєднані до бокових ланцюгів серину, треоніну чи аспарагіну. Залишки цукрів як у гліколіпідів, так і в глікопротеїнів локалізовані винятково на зовнішній поверхні і разом з іншими її компонентами утворюють негативний заряд [9,13].

При взаємодії еритроцита з низькими концентраціями настоянки ехінацеї пурпурової відбувається адсорбція її компонентів на клітинній мембрані. Вона здійснюється за рахунок нековалентної взаємодії біологічно активних сполук з молекулярними компонентами мембрани. Насамперед, це гідрофобна взаємодія радикалів вільних жирних кислот препарату і зовнішнього ліпідного шару мембрани за рахунок вандерваальсових зв'язків. Відомо, що ланцюги жирних кислот у фосфоліпідах є нерозгалуженими і можуть бути насиченими і ненасиченими. Подвійні зв'язки в ненасичених жирних кислотах майже завжди мають цис-конфігурацію і призводять до згину вуглеводневого ланцюга. Спряжені подвійні зв'язки радикалів жирних кислот завдяки наявності р-електронної хмари можуть брати участь у додаткових взаємодіях з надлишковим позитивним зарядом молекулярних компонентів мембран, утворюючи електростатичну взаємодію.

Оскільки алкалоїди, що входять до складу настоянки, є складними похідними аміаку (третинними амінами), то електростатичні зв'язки утворюються і при взаємодії позитивно зарядженого атома азоту алкалоїду з аніонами цукрів гліколіпідів і глікопротеїнів, білків (насамперед інтегральних) та фосфоліпідів. Занурюючись у ліпідний шар мембрани, позитивно заряджений кінець алкалоїду її розширює і збільшує ступінь щільності поверхневого ліпідного шару і кількість місць гідрофобних зв'язків з інтегральними білками. Тут ми не виключаємо і ролі водневих зв'язків між головками ліпідів, гідроксильними і карбоксильними групами флавоноїдів та молекулами води. При низькій концентрації спиртової настоянки ехінацеї пурпурової не виникають конформаційні зміни білкових молекул клітинної мембрани. Результатом підсилення білок-ліпідної та білок-білкової взаємодії є підвищення стійкості еритроцитарної мембрани до гіпотонічного гемолізу (мембраностабілізуюча дія).

Підвищення концентрації спиртової настоянки ехінацеї пурпурової в інкубаційному середовищі після повного насичення ділянок мембрани, які потребували цього, призводить до зв'язування біологічно активних речовин ехінацеї з іншими ділянками, що супроводжується конформаційними змінами мембранних білків. При цьому багато гідрофобних радикалів, які були занурені в ліпідний бішар, стають зовнішніми. Це зумовлює порушення молекулярної структури клітинної мембрани за рахунок послаблення гідрофобної взаємодії білок-білкових, білок-ліпідних, холестерин-білкових і холестерин-фосфо-ліпідних комплексів. На цій стадії велике значення відіграє порушення холестерин - білкових взаємодій, оскільки холестерин є ключовим регулятором мінливості мембран, стаючи на заваді кристалізації і переміщенню ацильних ланцюгів фосфоліпідів [14]. Спостерігається своєрідне "розрідження" мембрани, втрата осмотичної рівноваги між клітиною і середовищем і, в решті-решт, настає гемоліз еритроцита.

Висновок. В умовах гіпотонічного гемолізу настоянка ехінацеї пурпурової виявляє двофазовий характер дії на мембрани еритроцитів донорів: при кінцевій концентрації препарату, що відповідає 0,206 - 4,12 D₂₀₂, спостерігається стабілізуюча дія препарату, а при 7,24 D₂₀₂ і вище – гемолітичний ефект. Таким чином, встановлено, що настоянка ехінацеї пурпурової виявляє виражену мембраностабілізуючу дію у широкому діапазоні концентрацій, і одержані експериментальні дані підтверджують думку про те, що основним напрямком у механізмі її дії на обмін речовин є клітинні мембрани.

Література. 1. Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е. и др. Структура и функции биологических мембран. - К.: Вища школа, 1981.-336с. 2. Георгиевский В.П., Дихтярев С.И., Губин Ю.И. и др. Фитомедицинская отрасль в Украине. Состояние и перспективы развития // Фітотерапія в Україні.-2000.-№1.-С.3-6. 3. Геруш І.В., Мецишен І.Ф. Отримання та вивчення фізико-хімічних властивостей спиртової настойки ехінацеї пурпурової // Тези доп. Першого національного з'їзду фармакологів України "Сучасні проблеми фармакології".-К.-1995.-С.37. 4. Геруш І.В., Мецишен І.Ф. Вплив спиртової настоянки ехінацеї пур-

пурової на стан антиоксидантної системи печінки при експериментальному ерозивно-виразковому ураженні гастродуоденальної зони // Фармакол. вісн.-1998.-№5.-С.34-37. 5. Костинская Н.Е., Войтенко Г.Н. Иммуномодулирующее действие лекарственных растений // Тез. докл. Третьей респ. конф. по мед. ботанике.- Ч.1.-К.-1992.-С.79. 6. Литвинець Є.Я. Ехінацея: фармакологічні та лікувальні властивості // Гал. лікар. вісник.-2000.-Т.7, №4.-С.150-152. 7. Максютин Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П. и др. Растительные лекарственные средства / Под ред. Н.П. Максютиной. - К.: Здоров'я, 1985.-280с. 8. Саломордов В.Н., Поспелов С.В., Моисеева Г.Ф. и др. Фитохимический состав представителей рода эхинацея и его фармакологические свойства // Хим.-фармац. ж.-1996.-Т.30, №4.-С.32-37. 9. Самбуева З.Г., Лонишкова К.С., Николаев С.М., Найдикова Ц.А. Влияние растительных экстрактов на течение экспериментального гепатита // Фармация.-1987.-№2.-С.40-43. 10. Чекман І.С. Клініко-фармакологічні властивості ехінацеї // Ліки України.-2001.-№3.-С.25-26. 11. Яковлева Н.Ю., Войтенко Г.М., Ласица О.І., Наумова М.І. Фармакологічні властивості препаратів ехінацеї в експерименті та клініці // Ліки.-1996.-№2.-С.118-123. 12. Isomaa B. Interaction of surface-active alkyltrimethylammonium salt with the erythrocyte membrane // Biochem. Pharmacol.-1979.-V.28, №4.-P.975-980. 13. Ossipov N.N., Zaslavsky B.Y., Rogozhin S.V. Action of surface-active substances on biological membranes. I. Effect of chemical modification of membranes on hemolysis of erythrocytes by sodium alkyl sulfates // Colloid and Polym. Sci.-1978.-V.258, №1.-P.1105-1109. 14. Zaslavsky B.Yu., Ossipov N.N., Rogozhin S.V. Action of surface-active substances on biological membranes. III. Comparison of hemolytic activity of ionic and nonionic surfactants // Biochim. Biophys. Acta.-1978.-V.510, №1.-P.151-159.

MECHANISMS OF INTERACTION OF ECHINACEA PURPUREA TINCTURE WITH DONORS' ERYTHROCYTIC MEMBRANES

I.V.Gerush

Abstract. A study of the influence of the Echinacea Purpurea tincture on the erythrocyte membrane permeability has made it possible to establish that the agent under study manifests a two-phase character of action on the donors' erythrocytic membrane in the hypotonic solution. It elevates the stability of the erythrocyte membranes under low concentrations to the tune of 0.206 – 4.12 D_{202} , whereas it manifests the hemolytic effect with the concentration of 7.24 D_{202} and higher. Thus, the Echinacea Purpurea tincture displays a marked membrane stabilizing effect in a wide range of concentration. The obtained findings support the view that cellular membrane is the basic direction of its mechanism of action on metabolism.

Key words: Echinacea Purpurea tincture, erythrocyte, membrane, hemolysis.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла до редакції 15.07.2002 року