

# PHARMACEUTICS

## DETERMINATION OF THE EFFECTIVE DOSE OF DRY EXTRACT SPINACIA OLERACEA L. LEAF ON THE MODEL OF FOOD DEPRIVATION IN RATS

**Nykyforuk A.**

*Uzhgorod National University*

**Fira L.**

*I. Horbachevsky Ternopil National Medical University*

**Lykhatskyi P.**

*I. Horbachevsky Ternopil National Medical University*

## ВСТАНОВЛЕННЯ ЕФЕКТИВНОЇ ДОЗИ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ЗІ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО ЛИСТЯ НА МОДЕЛІ ХАРЧОВОЇ ДЕПРИВАЦІЇ У ЩУРІВ

**Никифоруk А.Я.**

*Ужгородський національний університет, Україна*

**Фіра Л.С.**

*Тернопільський національний медичний університет імені І.Я.Горбачевського*

**Лихацький П.Г.**

*Тернопільський національний медичний університет імені І.Я.Горбачевського*

### **Abstract**

Many diseases, which are accompanied by disorders of protein and aminoacid metabolism, have been reported today. In order to restore their balance, the supply of aminoacids and other biologically active substances, as well as the use of drugs capable of stimulating protein synthesis, that is, have an anabolic effect, is required. It is advisable to use herbal remedies in this regard. The purpose of this work was to determine the effective dose of dry extract from spinach of garden leaves in conditions of complete starvation of rats. The experiments were performed on white rats that were fasted for 2 days but with free access to water. Several groups of animals on the background of starvation received a dry extract of spinach of vegetable leaves at doses of 50 mg / kg, 100 mg / kg and 150 mg / kg body weight. The extract at dose of 100 mg / kg has been found to have a positive effect on the body weight of the animals, and also restores daily diuresis in conditions of food deprivation. At the same dose, this extract increases the protein content in the serum, liver and muscles of animals, and inhibits the activity of oxidation processes in the body and restores the activity of the enzyme link of the antioxidant system. The results of the studies allow us to determine the dose of extract 100 mg / kg as the minimum active dose exhibiting anabolic and antioxidant activity and to propose further study of the pharmacological activity of the extract at this dose

### **Анотація**

На сьогодні зареєстровано багато захворювань, які супроводжуються порушеннями обміну білків та амінокислот. З метою відновлення їх балансу необхідно надходження ззовні амінокислот та інших біологічно активних речовин, а також використання лікарських засобів, здатних стимулювати синтез білка, тобто чинити анаболічну дію. Доцільним в цьому плані є використання рослинних лікарських засобів. Метою даної роботи було визначення ефективної дози сухого екстракту зі шпинату городнього листя в умовах повного голодування щурів. Експерименти проведені на білих щурах, які знаходились на голодуванні протягом 2 діб, але з вільним доступом до води. Декілька груп тварин на тлі голодування отримували сухий екстракт зі шпинату городнього листя в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг та 150 мг/кг маси тіла. Встановлено, що екстракт у дозі 100 мг/кг проявляє позитивний вплив на масу тіла тварин, а також відновлює добовий діурез в умовах харчової депривації. У цій же дозі екстракт призводить до підвищення вмісту білка у сироватці крові, печінці та м'язах тварин, а також пригнічує активність окиснювальних процесів в організмі та відновлює активність ензимної ланки антиоксидантної системи. Результати досліджень дозволяють визначити дозу екстракту 100 мг/кг як мінімально діючу дозу, що проявляє анаболічну та антиоксидантну дію, та запропонувати подальше дослідження фармакологічної активності екстракту в цій дозі.

**Keywords:** *vegetable spinach, dry extract, food deprivation, anabolic action*

**Ключові слова:** *шпинат городній, сухий екстракт, харчова депривація, анаболічна дія*

Відомо, що практично кожне відхилення у функціональному стані організму спричиняє різноманітні зміни в метаболізмі білків. Порушення механізмів біосинтезу білка та різних рівнів регуляції активного метаболізму може бути пусковим факто-

ром у генезі багатьох патологічних процесів і захворювань, а також супровідних симптомів і синдромів [7].

Порушення обміну білків спричинюється різними чинниками: недостатнім харчуванням, порушенням перетравлювання в шлунку, кишківнику

білків, порушенням всмоктування амінокислот, порушенням синтезу в організмі та виділення кінцевих продуктів їх обміну – аміаку, сечовини, креатиніну, сечової кислоти, порушенням обміну між печінкою і кров'ю, порушенням обміну амінокислот у органах і тканинах [7].

Окрім того, стресові ситуації для організму, зокрема гострі (інфаркт міокарду, гепатит В) та хронічні (аутоімунні, ниркова недостатність, цироз печінки) захворювання внутрішніх органів і систем різноманітної етіології призводять до гіпопротеїнемії, і як наслідок – функціональних та органічних порушень [10].

З метою відновлення білкового балансу під час таких станів необхідно по-перше – адекватне надходження до організму ззовні амінокислот та інших біологічно активних речовин та амінокислот-коректорів білкового обміну, а по-друге – використання лікарських засобів, здатних стимулювати синтез білка, тобто чинити анаболічну дію.

Насьогодні накопичено достатній позитивний досвід вивчення й терапевтичного застосування препаратів, які містять амінокислоти. Амінокислотні суміші все ширше застосовують як високоефективні та малотоксичні препарати при захворюваннях людини для корекції гіпопротеїнемії різного походження, стимуляції компенсаторно-адаптаційних процесів, які вимагають активації білкового анаболізму [10]. Використання анаболічних засобів спрямоване на стимуляцію процесів синтезу білка та його регенерацію, тобто на прискорення утворення та оновлення структурних частин клітин і тканин, у першу чергу крові і м'язів.

Тому, пошук нових фармакологічних засобів для корекції білкових порушень є актуальною проблемою сучасної фармакології та медицини.

Однією з патологічних моделей, що використовуються під час доклінічних досліджень із метою оцінки анаболічної активності, є харчова депривація [5]. При повному голодуванні у щурів спостерігаються порушення метаболічних процесів: пригнічення анаболізму та генералізоване підвищення катаболізму білків.

Зважаючи на вищевикладене, привертає увагу комплекс біологічно активних речовин, який міститься в шпинату городнього листі. Рослина широко культивується в Україні, що зумовлює її достатню сировинну базу.

Метою даної роботи було визначення ефективної дози сухого екстракту зі шпинату городнього листя в умовах повного голодування щурів.

Експерименти проведені на 30 білих щурах-самцях масою тіла 180-200 г. Тварини протягом 2 діб знаходилися в умовах абсолютного харчового голодування при достатньому доступі води. Для визначення ефективної дози сухого екстракту зі шпинату городнього листя експериментальних тварин розподілили на 5 груп: 1-ша група – тварини контрольної групи (забір крові, сечі та органів робили до початку експерименту); 2-а група – тварини, які протягом 2 діб були на голоді з вільним доступом до води; 3-я група – щури, які на тлі голодування отримували сухий екстракт зі шпинату

листя (СЕШЛ) в дозі 50 мг/кг маси тіла та вільний доступ до води; 4-а група – щури, які на тлі голодування отримували СЕШЛ в дозі 100 мг/кг маси тіла та вільний доступ до води; 5-а група – щури, які на тлі голодування отримували СЕШЛ в дозі 150 мг/кг маси тіла та вільний доступ до води.

СЕШЛ отриманий у Національному фармацевтичному університеті на кафедрі хімії природних сполук. Технологія його виготовлення та визначення діючих речовин, зокрема вміст білка та вільних амінокислот, були проведені під керівництвом проф. Журавель І.О. Екстракт одержували за методикою: у співвідношенні 1:5 (подрібнена сировина та екстрагент). 10,0 г сировини заливали 0,1 М NaOH та 30 хв інтенсивно перемішували. Отриману витяжку випарювали на ротаторному апараті до сухого залишку. Для запобігання денатурації сполук білкової природи, випарювання проводили при температурі не вище 30°C. В екстракті було визначено вміст вільних та зв'язаних амінокислот, полісахаридів, флавоноїдів та поліфенольних сполук.

Через 2 доби від початку голодування тварин піддавали евтаназії під тіопенталовим наркозом. На дослідження брали сироватку крові та печінку щурів усіх дослідних груп. При проведенні експерименту дотримувались усіх правил Конвенції із захисту хребетних тварин [11].

У експериментальних тварин усіх груп перед початком дослідження і через 2 дні голодування визначали такі показники: масу тіла та добовий спонтанний діурез.

Для досліджень використовували сироватку крові та печінку дослідних щурів. Кров забирали із серця тварин, яку центрифугували при частоті обертання 1100 г впродовж 30 хв. Отриману сироватку крові (надосадову рідину) використовували для проведення досліджень. Відібрану печінку (250 мг), використовували для отримання гомогенату за допомогою гомогенізатора магнітного Silent Crusher S після попередньої перфузії з 2,5 мл фізіологічного розчину. Активність окиснювальних процесів та стан антиоксидантної системи оцінювали за вмістом ТБК – активних продуктів (ТБК-АП) [4] та активністю каталази (КТ) [3] у сироватці крові, м'язах та печінці щурів. Окрім того, у сироватці крові визначали вміст загального білка [1] та сечовини [1], у гомогенаті печінки та м'язах – вміст білка.

Для статистичної обробки даних використовували параметричні (за Стьюдентом) та непараметричні (Віллкосоном) методи дослідження. Вірогідні зміни вважали при  $p \leq 0,05$  [12].

Результати впливу СЕШЛ на масу тіла щурів на тлі харчової депривації наведено у табл. 1. Їх аналіз свідчить про те, що дефіцит маси тварин в умовах повного голодування протягом 2-ох днів становив (12,2) г, отже, голодування призводить до генералізованого катаболізму. При цьому, очевидно, зниження загальної маси тіла здійснюється, в першу чергу, за рахунок жирової тканини та розпаду білків скелетної мускулатури [9].

Таблиця 1

**Динаміка маси тіла та добовий діурез у щурів, які отримували сухий екстракт зі шпинату листя на тлі дводенного голодування ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )**

Групи тварин	Маса тіла, г	Добовий діурез, мл
Контрольна група (до голодування)	190,6±4,2	4,2±0,2
Тварини, які голодували 2 дні	178,4±4,1	2,8±0,2*
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 50 мг/кг	180,0±3,3	3,0±0,2
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 100 мг/кг	186,7±4,2	3,8±0,1**
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 150 мг/кг	188,8±2,1	4,0±0,2**

Примітка: \*- вірогідні зміни між тваринами контрольними та тими, які знаходилися на голодуванні; \*\* - вірогідні зміни між тваринами, що голодували та тваринами, які отримували на тлі голодування СЕШЛ

Експериментально встановлено, що в умовах голоду в групах тварин, які отримували СЕШЛ відбувалося збільшення загальної маси тіла по відношенню до групи тварин, які його не отримували. Досліджуваний нами екстракт призвів до більш вираженого збільшення маси тіла тварин в дозах 100 та 150 мг/кг маси тіла.

В умовах харчової депривації СЕШЛ сприяє збереженню діуретичної функції, про що свідчить збільшення добового діурезу у щурів після застосування його в дозах 100 та 150 мг/кг. У тварин, що

знаходились на повному голоді добовий діурез через 2 дні знизився в 1,5 раза. Після застосування СЕШЛ у дозі 100 мг/кг даний показник підвищився в 1,36 раза, а після застосування екстракту в дозі 150 мг/кг – в 1,43 раза.

Результати, одержані при визначенні загального білка в сироватці крові, м'язах та печінці (табл. 2), також свідчать, що дослідний екстракт стимулює анаболічні процеси.

Таблиця 2

**Вміст загального білка у сироватці крові (г/л), печінці та м'язах (г/кг) щурів, які отримували сухий екстракт зі шпинату листя на тлі дводенного голодування ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )**

Групи тварин	Сироватка крові	Печінка	М'язи
Контрольна група (до голодування)	58,75±2,03	23,88±0,67	24,31±0,28
Тварини, які голодували 2 дні	51,28±1,40*	19,65±0,55*	18,90±0,26*
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 50 мг/кг	51,86±0,71	19,70±0,40	19,50±0,24
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 100 мг/кг	56,32±0,45**	22,88±0,55**	22,24±0,23**
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 150 мг/кг	57,05±0,37**	24,13±0,40**	22,50±0,38**

Примітка: \*- вірогідні зміни між тваринами контрольними та тими, які знаходилися на голодуванні; \*\* - вірогідні зміни між тваринами, що голодували та тваринами, які отримували на тлі голодування СЕШЛ

Після 2-денного голодування у сироватці крові щурів вміст загального білка знизився на 13 %, у печінці на 18 % та у м'язах – на 22 %. Застосування СЕШЛ сприяло відновленню вмісту білка у всіх досліджуваних тканинах, проте доза 50 мг/кг маси тіла виявилась неефективною щодо даного показника. Екстракт у дозах 100 та 150 мг/кг призвів до вірогідного ( $p \leq 0,05$ ) підвищення вмісту загального білка у сироватці крові, печінці та м'язах дослідних щурів.

Наприкінці експерименту (2-га доба) у тварин контрольної групи було зафіксовано вірогідне збільшення ( $p \leq 0,05$ ) вмісту сечовини у сироватці крові та сечі, що свідчить про підвищення білкової дисиміляції в період харчової депривації (табл.3).

Через 2 доби голодування вміст сечовини у сироватці крові щурів збільшився в 1,6 раза, в сечі – в 2 рази. Під впливом СЕШЛ у сечі та крові дослідних тварин спостерігається зниження рівня сечовини порівняно з тваринами, які голодували (табл. 3).

Дослідний екстракт в дозі 50 мг/кг маси тіла не вплинув на вміст сечовини як у сироватці, так і в сечі тварин, що його отримували і перебували на голоді. У щурів, які отримували екстракт в дозах 100 та 150 мг/кг даний показник вірогідно відрізнявся від такого у щурів, які його не отримували. Так, доза екстракту 100 мг/кг маси тіла призвела до зниження вмісту сечовини у сироватці крові на 28 %, доза 150 мг/кг – на 46 % ( $p \leq 0,05$ ). У сечі спостерігалось аналогічне зниження вмісту сечовини у щурів, які отримували вищевказані дози екстракту.

Враховуючи те, що зміни у харчовому статусі потребують відносно швидкої адаптації метаболізму, важливим є дослідження регуляторних механізмів. При цьому печінка відіграє основну роль у регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу. У літературі є лише окремі дані щодо розвитку оксидативного дисбалансу за умов повного харчового голодування при достатньому доступі до води [2].

**Вміст сечовини в сироватці крові та сечі (ммоль/л) щурів, які отримували сухий екстракт зі шпинату листя на тлі дводенного голодування (M±m; n=6)**

Групи тварин	Сироватка крові	Сеча
Контрольна група (до голодування)	6,47±0,17	340,5±9,2
Тварини, які голодували 2 дні	10,30±0,28*	670,2±9,8*
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 50 мг/кг	9,87±0,17	635,4±12,1
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 100 мг/кг	8,47±0,23**	540,8±12,6**
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 150 мг/кг	7,30±0,15**	462,5±14,4**

Примітка: \*- вірогідні зміни між тваринами контрольними та тими, які знаходилися на голодуванні; \*\* - вірогідні зміни між тваринами, що голодували та тваринами, які отримували на тлі голодування СЕШЛ

Виходячи з цього, ми дослідили активність вільнорадикальних процесів, а зокрема ліпопероксидації, та стан ензимної ланки антиоксидантної системи в організмі щурів за умов експериментального голодування та вплив на них СЕШЛ.

Одним із проміжних продуктів ліпопероксидації є ТБК-АП, підвищення яких в організмі супроводжується розвитком оксидативного стресу. Ми визначили даний показник у сироватці крові, печінці та м'язах дослідних тварин (табл.4).

Таблиця 4

**Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові (мкмоль/л), печінці та м'язах (мкмоль/кг) щурів, які отримували сухий екстракт зі шпинату листя на тлі дводенного голодування (M±m; n=6)**

Групи тварин	Сироватка крові	Печінка	М'язи
Контрольна група (до голодування)	1,29±0,03	19,00±0,65	18,20±0,30
Тварини, які голодували 2 дні	1,65±0,03*	33,08±1,23*	24,03±0,60*
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 50 мг/кг	1,62±0,01	30,83±0,97	23,23±0,55
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 100 мг/кг	1,37±0,02**	27,25±0,58**	20,90±0,38**
Тварини, які голодували 2 дні+СЕШЛ у дозі 150 мг/кг	1,32±0,01**	23,60±0,80**	19,51±0,50**

Примітка: \*- вірогідні зміни між тваринами контрольними та тими, які знаходилися на голодуванні; \*\* - вірогідні зміни між тваринами, що голодували та тваринами, які отримували на тлі голодування СЕШЛ

Проведені дослідження показали, що у всіх досліджуваних тканинах щурів вміст ТБК-АП вірогідно ( $p \leq 0,05$ ) підвищувався після 2-денного голодування (у сироватці крові на 28 %, у печінці на 74 %, у м'язах на 32 %). Отримані результати вказують на те, що найбільша активація окиснювальних процесів за голодування відбувається у печінці. На нашу думку, це може бути зумовлено розвитком стресорної реакції. Стрес є відображенням усіх адаптаційних реакцій організму, що виникають у відповідь на певний подразник (у нашому дослідженні це харчова депривація), та направлений на реалізацію пристосувальних механізмів. При цьому стресорна реакція проявляється зростанням рівня катехоламінів, які активують ПОЛ. З іншого боку, зменшення доставки кисню до органів шлунково-кишкового тракту, в тому числі й до печінки, зумовлює розвиток гіпоксії, при якій теж відбувається активація ПОЛ [8].

Доцільним було визначити вміст продуктів ліпопероксидації у щурів, які на тлі голодування отримували СЕШЛ. Ми відмітили, що екстракт у дозах 100 мг/кг та 150 мг/кг маси тіла призвів до зниження активності окиснювальних процесів, на що

вказує вірогідне ( $p \leq 0,05$ ) зниження вмісту ТБК-АП у сироватці крові, печінці та м'язах дослідних тварин. Застосування екстракту в дозі 50 мг/кг маси тіла не проявило ефективного впливу на даний показник.

Активация ПОЛ на фоні харчової депривації може зумовлювати зміну активності ензимної ланки системи антиоксидантного захисту, що було наступним етапом нашого дослідження.

Одним із могутніх антиоксидантних ензимів, який бере участь у знешкодженні токсичного для організму гідрогену пероксиду, є каталаза. Даний ензим включається у реакції знешкодження активних форм кисню на термінальних етапах цього процесу [6].

Голодування щурів протягом 2-ох днів призвело до підвищення активності каталази у сироватці крові на 11 %, у печінці на 17 % (рис.1) і найвищим даний показник виявився у м'язах тварин (на 24 % перевищував рівень норми). Очевидно, таке підвищення активності даного ензиму є захисною реакцією організму на пригнічення активованих окиснювальних процесів при голодуванні.

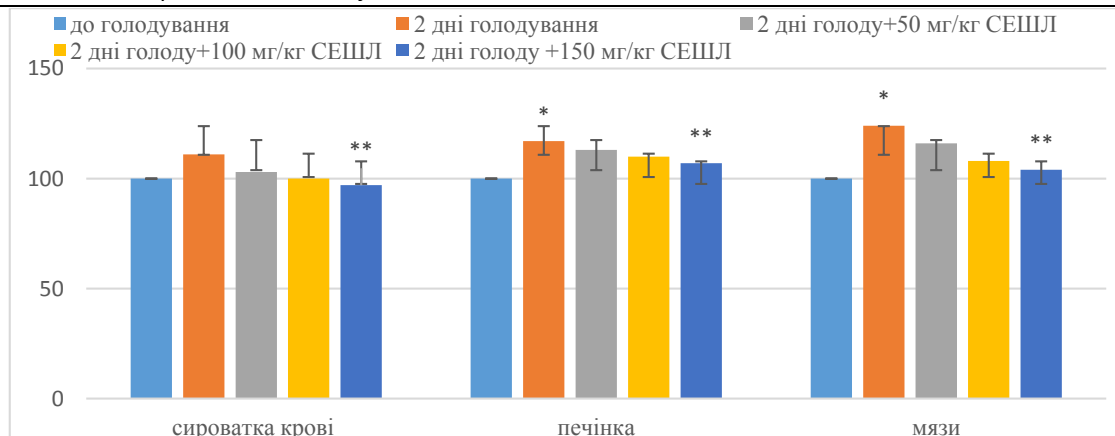


Рис. 1 Активність каталази у сироватці крові, печінці та м'язах щурів, які отримували сухий екстракт зі шпинату листя на тлі дводенного голодування, %

Примітка: \* - вірогідні зміни між тваринами контрольними та тими, які знаходилися на голодуванні; \*\* - вірогідні зміни між тваринами, що голодували та тваринами, які отримували на тлі голодування СЕШЛ

Такі зміни у активності ензиму антиоксидантного захисту можуть сприяти адаптації та виживанню клітин у несприятливих умовах протягом перших двох діб, що сприятливо впливатиме на функціональний стан печінки завдяки збереженню киснево-транспортної функції крові, зменшенню ступеню мікроциркуляторних порушень та рівня тканинної гіпоксії.

Після застосування нами всіх доз СЕШЛ у досліджуваних тканинах з щурів спостерігалась тенденція до зниження даного показника, але вірогідних змін отримано не було. На нашу думку, це пов'язано з невеликим терміном дослідження (2 доби).

**Висновок.** На моделі харчової депривації щурів встановлена мінімально діюча доза сухого екстракту зі шпинату городнього листя, яка виявилась на рівні 100 мг/кг маси тіла. У даній дозі екстракт призвів до збільшення маси тіла тварин, відновлення їх добового діурезу. Встановлено, що екстракт сприяє активації процесів анаболізму. На це вказує підвищення вмісту білка у сироватці крові, печінці та м'язах тварин, які голодували протягом 2 діб.

Виявлено, що на тлі харчової депривації відбувається активація процесів ліпопероксидації, а також незначне підвищення каталазної активності. Це може бути адаптивною реакцією організму на стресовий стан при голодуванні. Екстракт зі шпинату городнього листя викликав пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що призвело до збереження захисних сил організму за умов нетривалого голодування. Результати наших досліджень вказують на доцільність подальшого дослідження та використання екстракту при патологіях, які супроводжуються підвищенням процесів катаболізму білків та активацією окиснювальних процесів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Влізлю В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: СПОЛОМ, 2012. с.764.

2. Гембаровський М.В., Кліщ І.М., Марущак М.І. Вплив харчової депривації на показники пероксидного окиснення ліпідів та системи антиоксидантного захисту печінки щурів. Мед.хімія, 2013, №15 (1). с. 25-29.

3. Королюк М. А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело, 1988, № 1. с. 16-19.

4. Лушак В. І., Багнюкова Т.В., Лушак О.В. Показники оксидативного стресу. Тіобарбітуративні продукти і карбонільні групи білків. Укр. біохім. журн., 2004, 76(6). с.136-141.

5. Патент на корисну модель № 20253, Україна, МПК А61К 36/48 (2006.01). Спосіб одержання поліфенольного комплексу з анаболічною дією. З. № у 2006 08046. Заявл. 17.07.2006. Опубл. 15.01.2007. Бюл. № 1.

6. Резніков О. Г. Про- та антиоксидантна системи і патологічні процеси в організмі людини. Вісник НАН України, 2014, №10. с.17-28.

7. Фаллер Д. М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки: Рук. для врачей / Пер с англ. — М.: БИНОМПресс, 2003. с. 164-170.

8. Чумакова А.С., Теплый Д.Л., Нестерова Ю.В. Изменение свободнорадикальных процессов в различных органах крыс разного возраста при остром стрессе. Биологические исследования, 2009. №4. С.34-37.

9. Шаталова О.М., Малоштан Л.М. Гідрофільний екстракт сої у фармакологічній корекції порушень білкового обміну на моделі харчової депривації. Одеський мед. журнал, 2007, №3(101). с. 35-37.

10. Яковлева Л. В., Марчишин С. М. Дослідження анаболічної дії екстракту пирію повзучого на моделі харчової депривації. Мед, хімія, 2005, № 4. с. 85-87.

11. Gross D. Ethics in Animal-Based Research / D. Gross, R. Tolba. Eur. Surg. Res, 2015. Vol. 55, Issue 1-2. с. 43 – 57.

12. Okeh U. Statistical problems in medical research. East. Afr. J. Public. Health, 2009, 6(1). с. 1-7.