

УДК 581.612-06/612.352.122

А.К. Кайынбаева\*, А.Н. Аралбаева, Р.С. Утегалиева,  
Ж.Ж. Турумбетова, Ж.С. Жанабаева

Институт физиологии человека и животных, Казахстан, г. Алматы  
\*e-mail: aray3005@mail.ru

### Исследование влияния растительной композиции на состояние мембран эритроцитов при экспериментальном диабете

В данной статье освещена проблема повышения резистентности клеток организма при экспериментальном сахарном диабете. Исследователями показано, что при развитии сахарного диабета происходит снижение осмотической и перекисной резистентности эритроцитарных мембран, повышается проницаемость, что в результате приводит к повреждению целостности клетки. Применение препарата на основе растений на фоне экспериментального сахарного диабета позволяет снизить уровень гемолиза эритроцитов, тем самым стабилизировать структуру мембраны. Авторами выявлено, что в условиях *in vivo* действие фитопрепарата проявляется независимо от концентрации. В результате исследований определена наиболее оптимальная концентрация, при действии которой у животных с сахарным диабетом отмечается повышение резистентности мембран эритроцитов практически до уровня контроля.

**Ключевые слова:** экспериментальный сахарный диабет, стрептозотоцин, мембраны, эритроциты, флавоноиды, фитопрепарат, осмотическая резистентность, гемолиз

А.К. Қайынбаева, А.Н. Аралбаева, Р.С. Өтегалиева,  
Ж.Ж. Турумбетова, Ж.С. Жаңабасва

### Эксперименталды диабет жағдайында өсімдік композициясының эритроциттер мембранасының күйіне әсерін зерттеу

Мақалада эксперименталды диабет жағдайында клетка резистенттілігін жоғарылату мәселесі қарастырылған. Зерттеу жұмыстарының нәтижесінде организм қант диабетіне душар болған жағдайда клетка тұтастығына зақым келтіретін өзгерістердің етек алып, эритроцит мембраналарының өткізгіштік қабілетінің өзгеретіндігі, осмотық және аскынтотықтық гемолиз дәрежесінің жоғарылайтындығы анықталды. Өсімдік негізіндегі препаратты пайдалану эритроциттер гемолизін төмендетіп, мембрана құрылымының тұрақтануына көмегін тигізеді.

**Түйін сөздер:** эксперименталды қант диабеті, стрептозотоцин, мембрана, эритроцит, флаваноидтар, фитопрепарат, осмотық резистенттілік, гемолиз

A.K. Kayinbayeva A.N. Aralbayeva, R.S. Utegaliyeva,  
Zh.Zh. Turumbetova, Zh.Zh. Zhanabayev

### Study of herbal composition's influence on erythrocyte membrane condition at experimental diabetes mellitus.

The article is devoted to the problem of increase of resistency of cells of an organism at experimental diabetes. It is shown, that at development of a diabetes there is a decrease osmotic and hydroperoxide resistance of erythrocyte membranes, permeability raises, that as a result leads to the injuring of cell integrity. Application of a preparation on the basis of plants on a background of an experimental diabetes allows to lower a level hemolysis.

**Key words:** experimental diabetes mellitus, streptozotocyn, membranes, erythrocytes, flavonoids, phytopreparation, osmotical resistance, hemolysis

Сахарный диабет становится все более серьезной медико-социальной мировой проблемой [1]. Диабет опасен своими осложнения-

ми. Наряду с ростом числа больных сахарным диабетом, увеличивается количество больных, страдающих от осложнений этого заболева-

ния, приводящей к инвалидности. Следует также отметить, что резко возрастает смертность, связанная с диабетом и его осложнениями. Как правило, инсулинозависимый сахарный диабет (диабет 1 типа) поражает детей, подростков и молодых людей (до 40 лет), тогда как диабет 2 типа чаще всего развивается у людей старшего возраста, страдающих ожирением и ведущих малоподвижный образ жизни. В Казахстане, по данным Национального регистра сахарного диабета, число больных СД достигло 207 935 человек. Более того, по неофициальным данным, общее количество людей с диабетом в Казахстане уже превысило 700 тысяч человек.

Известно, что при сахарном диабете страдают все виды обмена веществ: вследствие нарушения проникновения глюкозы в клетку развивается стойкая гипергликемия, резко снижается синтез белка, замедляется тканевое дыхание, нарушается продукция АТФ, повышается образование кетоновых тел и триглицеридов в печени, в результате генерации большого количества свободных радикалов образуются и накапливаются высокотоксичные липоперекисные соединения. Эти метаболические нарушения являются причиной развития таких осложнений, как ангиопатия, ретинопатия, периферическая нейропатия, жировая инфильтрация печени [2-3].

В последние годы традиционная медицина сделала большой шаг к использованию в лечебных целях лекарственных растений, обладающих разносторонним терапевтическим действием и отличающимися отсутствием токсичности [4-5]. Большое число лекарственных растений содержит флавоноиды. Полифенолы или флавоноиды выполняют различные функции и поэтому группа данных соединений широко распространена в растительном мире. Растительные полифенолы оказывают разнообразные биологические эффекты на многочисленные клеточные системы как *in vitro* так и *in vivo*. Флавоноиды снижают риск заболеваемости, а также применяются в лечении таких болезней как рак, диабет и сердечно-сосудистые расстройства [6-7]. Значение природных продуктов в современной медицине обсуждается в ряде обзоров и статей.

Несмотря на постоянное внимание к вопросам повышения эффективности лечения сахарного диабета, эта проблема остается актуальной. В современной фармакотерапии са-

харного диабета применяют инсулин и другие сахаропонижающие средства (производные сульфонилмочевины, бигуаниды, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы, сенситайзеры инсулина и др.) [8]. Данные препараты регулируют утилизацию глюкозы клеткой. В последние годы в дополнение к основным сахаропонижающим препаратам часто применяются различные биологически активные добавки, действие которых направлено на поддержание систем организма в условиях окислительного стресса индуцируемого гипергликемией.

Накопленные клинические и экспериментальные данные о механизмах развития заболевания и его осложнений свидетельствуют о важной роли гипергликемии, способствующей аутоокислению глюкозы с генерацией активных форм кислорода и развитием оксидативного стресса. Так как окислительный стресс вовлекается в патогенез диабета и осложнения при диабете, то разработка методов использования антиоксидантов, предупреждающих или предотвращающих неблагоприятные эффекты, является важным для сохранения здоровья. Было показано, что экстракты лекарственных растений оказывают протекторный эффект на ткань печени животных при стрептозотоцин-индуцированном окислительном стрессе, вероятно, за счет снижения перекисного окисления липидов и повышения образования инсулина и эндогенных антиоксидантов [9,3]. В связи с этим, представляет интерес исследование протекторного влияния экстрактов фитокомпозиции из лекарственных растений Казахстана для уменьшения выраженности патологического воздействия на организм конечных продуктов гликирования при диабете и возможного предотвращения, обусловленных им осложнений.

Целью настоящей работы было: оценить мембранопротекторные свойства комплексного растительного препарата из лекарственных растений Казахстана при экспериментальном диабете.

#### **Материалы и методы**

В соответствии с целью и задачами Программы эксперименты проведены в условиях *in vivo*. Эксперименты выполнены на 90 взрослых (12-месячных) белых лабораторных крысах-самцах массой  $300 \pm 50$  г. В серии опытов животных разделили на 5 групп: 1-контроль, у животных 2-5 групп диабет вызывали внутривенной

инъекцией стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг массы, Через 7 дней группам 3,4 и 5 в течение 14 дней вводили перорально фитопрепарат в дозах 100, 200 и 400 мг/кг массы.

Уровень глюкозы в начале и в конце эксперимента была измерена глюкометром Accu-check Aktive. Диапазон измеряемого уровня глюкозы от 0,6 ммоль/л до 33,3 ммоль/л.

Для получения фитопрепаратов растительное сырье после измельчения подвергнута экстракции 50% этанолом.

Выделение эритроцитов. Эритроциты получали, центрифугируя кровь 10 мин при 1000g. Плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали средой, содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH-7,4).

Осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) определяли, инкубируя в течение 20 мин при 37°C, в гипотонических растворах хлористого натрия (0,35-0,5 г/100мл). Эритроциты осаждали центрифугированием и в супернатанте измеряли концентрацию гемоглобина. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 540 нм. Уровень гемолиза клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу, вызванному раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в концентрации 0,1г/100мл.

Проницаемость эритроцитарных мембран (ПЭМ) определяли по методу [80] с использованием растворов мочевины и NaCl.

Переокисную резистентность эритроцитов (ПГЭ) определяли по методу А.А.Покровского, А.А.Абраровой [81] в нашей модификации [82] с использованием 1М раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Результаты и обсуждение

В условиях *in vivo* было изучено влияние разных концентраций фитоконпозиции, состоящей из травы тимьяна ползучего, листьев грецкого ореха и цветков липы, на состояние клеточных мембран эритроцитов при экспериментальном диабете. В предварительных опытах повышение уровня глюкозы в крови до 16 ммоль/л через 5 дней позволило установить у экспериментальных животных диабет.

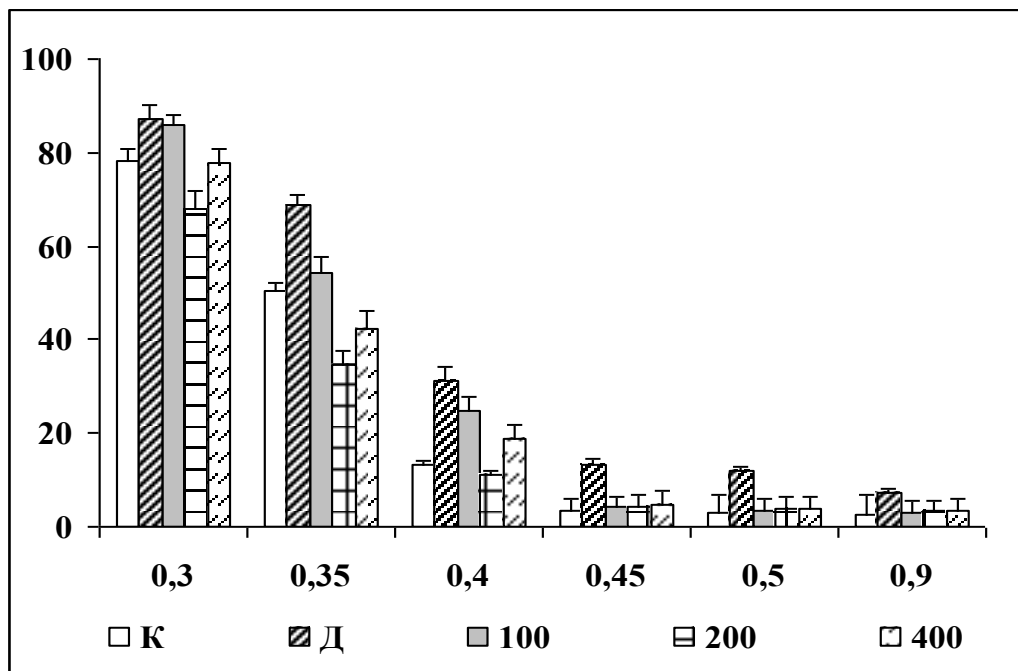
Результаты опытов, посвященные изучению влияния фитопрепарата на осмотическую резистентность мембран эритроцитов при СД 1 типа, представлены на рисунке 1. Как видно из рисунка, у животных, подвергнутых экспериментальному сахарному диабету, снижается осмотическая резистентность мембран эритроцитов. У

крыс, получавших фитопрепарат в дозах 100, 200 и 400 мг/кг уровень гемолиза ниже при всех исследованных концентрациях NaCl по сравнению с эритроцитами диабетических крыс. Выявлено что, эритроциты животных с сахарным диабетом менее резистентны в гипотонических растворах NaCl, о чем свидетельствует высокий уровень гемолиза по сравнению с другими группами животных.

Применение разных концентраций фитопрепаратов выявило, что у крыс, получавших фитопрепарат в дозе 200 мг/кг, степень гемолиза была ниже при всех исследованных концентрациях NaCl по сравнению с эффектами фитопрепаратов в дозах 100 и 400 мг/кг веса. Существенные изменения уровня гемолиза эритроцитов наблюдаются в 0,3, 0,35 и 0,4% растворах NaCl: применение фитопрепарата в дозе 100 мг/кг снизило уровень гемолиза на 2,14 и 6%, 200 мг/кг – на 19, 34 и 20%, 400 мг/кг на – 10, 27 и 13% соответственно относительно животных подвергнутых действию стрептозотоцина. Следовательно, применение фитопрепарата в дозе 200 мг/кг веса повышает резистентность эритроцитов и улучшает состояние клеточных мембран при диабете.

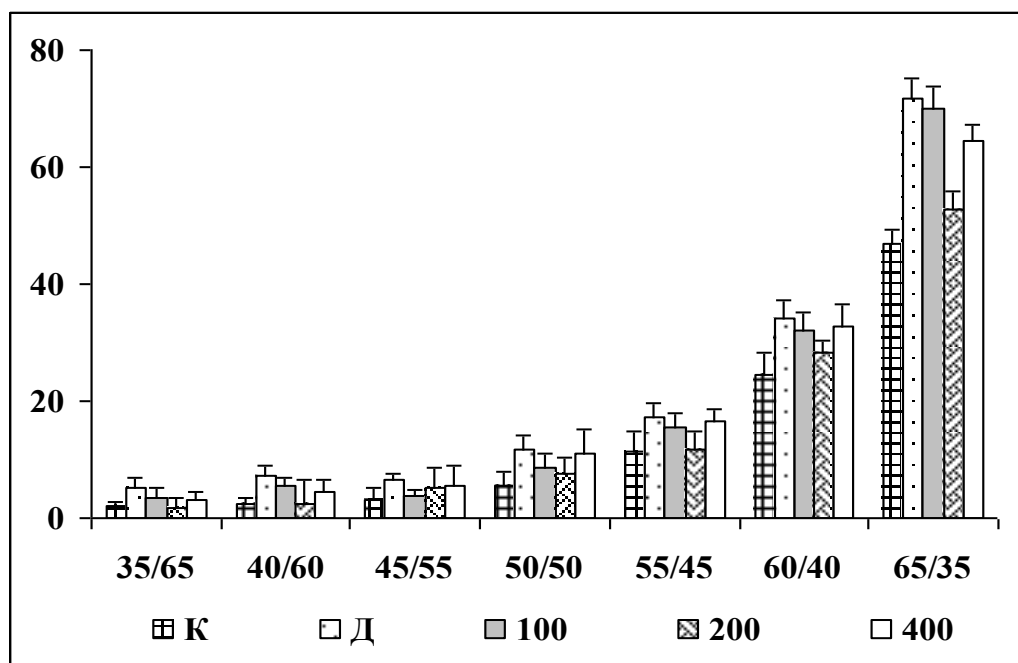
Всем биомембранам присуще свойство избирательной проницаемости. Это качество позволяет сохранять постоянство внутренней среды клетки. Повреждение мембраны и как следствие нарушение ее избирательности неминуемо приводит к функциональному сбою в работе внутриклеточных органоидов и клетки в целом. Известно, что осмотический гемолиз эритроцитов наступает в изотонических растворах веществ, легко проникающих через их мембраны (например, в растворе мочевины). Мочевина равномерно распределяется между мембраной эритроцитов и внешней средой. Поскольку клеточная мембрана задерживает крупные молекулы внутри эритроцита, осмотическое давление в нем становится больше, чем во внешней среде; разница между внеклеточным и внутриклеточным осмотическим давлением в этом случае будет пропорциональна количеству поглощенной мочевины. Эритроциты набухают в результате поступления воды, что приводит к разрыву мембраны.

На рисунке 2 представлены результаты исследования воздействия фитоконпозиции на проницаемость эритроцитарных мембран крыс при



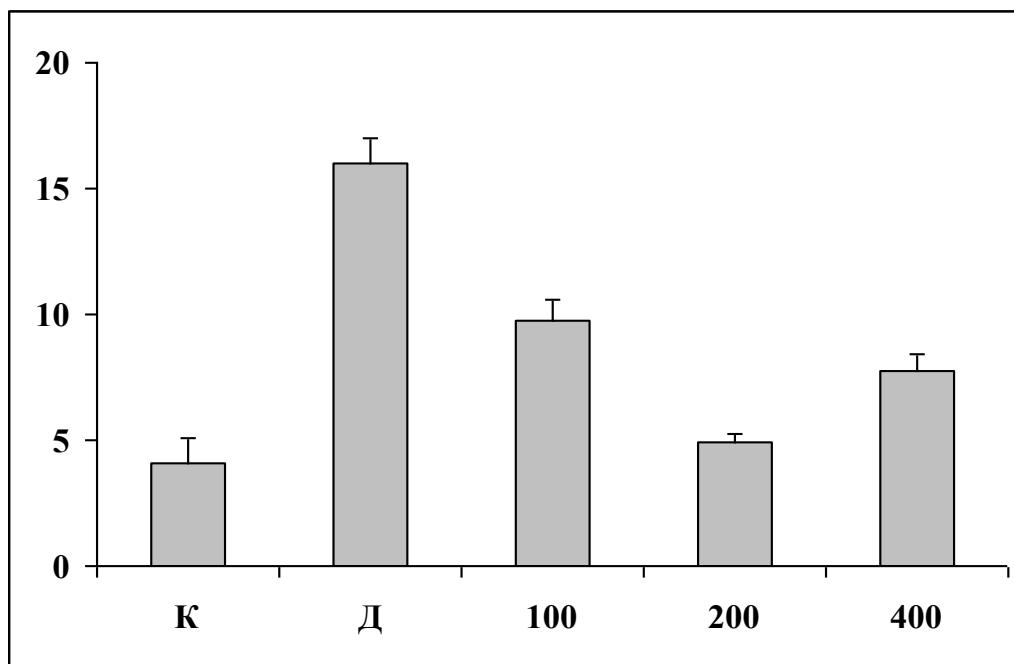
По оси абсцисс: концентрация раствора NaCl, %; по оси ординат: степень гемолиза, %.  
К – контроль, Д – диабет, 100, 200, 400 – дозы фитопрепарата, мг/кг веса.

**Рисунок 1** - Осмотическая резистентность эритроцитов крыс при применении фитопрепарата на фоне ЭСД.



По оси абсцисс: концентрации растворов мочевины/NaCl; по оси ординат: величина гемолиза, %. К – контроль, Д – диабет, 100, 200, 400 – дозы фитопрепарата, мг/кг веса.

**Рисунок 2** - Влияние фитопрепарата на проницаемость эритроцитарных мембран крыс при экспериментальном диабете



По оси абсцисс: К – контроль, Д – диабет, 100, 200, 400 – дозы фитопрепарата, мг/кг веса. по оси ординат: величина гемолиза, % ( $p \leq 0,001$ ).

**Рисунок 3** - Уровень перекисного гемолиза эритроцитов у животных с ЭСД при применении фитопрепарата.

диабете. Исследование проницаемости эритроцитарных мембран выявило, что уровень гемолиза эритроцитов возрастает во всех опытных группах при увеличении концентрации мочевины.

У животных с ЭСД степень гемолиза красных кровяных клеток выше таковой интактных крыс при всех исследованных соотношениях мочевины/NaCl. Анализ результатов влияния различных доз фитоконпозиции при сахарном диабете на проницаемость эритроцитарных мембран выявил снижение уровня гемолиза эритроцитов по сравнению с животными, не получавшими фитопрепарат. Следует обратить внимание, что существенный мембраностабилизирующий эффект фитопрепарата проявился в дозе равной 200 мг/кг веса, тогда как действие растительной фитоконпозиции в дозах 100 и 400 мг/кг веса было менее выражено.

Перекисное окисление биомолекул мембран является основным процессом влияющим на структуру и свойства мембраны, соответственно повреждение мембранных компонентов свободными радикалами неизбежно приведет к нарушению жизнедеятельности клетки. Резистент-

ность эритроцитарных мембран к перекисному гемолизу отображает состояние мембранных структур. В наших экспериментах у животных с экспериментальным сахарным диабетом уровень перекисного гемолиза повышался по сравнению с контролем в 4 раза (рисунок 3), тогда как использование фитопрепарата на фоне СД в дозе 100 мг/кг снизило данный показатель на 39%, в дозе 200 мг на 69% и в дозе 400 мг на 52% относительно животных подверженных диабету.

Таким образом, как показали наши исследования, при использовании фитопрепарата, в условиях *in vivo* его действие проявляется независимо от концентрации. Наиболее оптимальной оказалась концентрация равная 200 мг/кг веса животного, об этом свидетельствует низкий уровень гемолиза эритроцитов крыс с ЭСД относительно животных не получавших фитопрепарат. Несмотря на то, что концентрации фитопрепарата 100 и 400 мг/кг массы тела оказывали некоторое мембранопротективное действие на мембраны клеток опытных животных, уровень гемолиза превышал степень гемолиза эритроцитов у контрольной группы.

### Литература

- 1 Сабирова Н. Уровень и структура сахарного диабета в Казахстане и зарубежных странах // Вестник КазНМУ. – 2013. – №. – С. 228-231.
- 2 Rosen P., Nawroth P.P., King G., Moller W., Tritschler H.-J., Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2001. – Vol.17. – P.189–212.
- 3 Mokini Z., Marcovecchio M.L., Chiarelli F. Molecular pathology of oxidative stress in diabetic angiopathy: role of mitochondrial and cellular pathways // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2010. – Vol.87. – N 3. – P. 313-321.
- 4 Адекенов С.М. Биологически активные вещества растений и перспективы создания новых лекарственных препаратов // Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов, Алматы, – Издательство «Гылым» – 2004. – С.7-17.
- 5 Ахмедьярова Э.А., Зуева О.М., Сейтеметова А.Ж. Влияние экстрактов березы на неспецифическую резистентность при экспериментальных иммунодефицитах // Астана мед. журнал. – 2005. – N 2. – С.187-188.
- 6 Adewole S. and Ojewole J. Protective Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats // *Afr J Tradit Complement. Altern. Med.* -2009.- Vol.6. – N 1. – P. 30–41.
- 7 Pandey K.B. and Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* - 2009. – Vol.. – N 5. – P.270-278.
- 8 Майоров А.Ю., Науменкова И.В. Современные сахаросодержащие средства в лечении сахарного диабета 2 типа // Рус. мед. журн. – 2001. – №24.- С.1105-1111
- 9 Lucchesi A.N., Freitas N.T., Cassettari L.L., Marques S.F., Spadella C.T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease // *Acta Cir. Bras.* – 2013. – Jul – Vol.28. – N 7. – P.502-8.

### References

- 1 Sabirova N. Uroven I struktura saharnogo diabrtu v Kazakhstane I zarubezhnih stran // *Vestnik KazNMU.* – 2013. – №. – S.228-231.
- 2 Rosen P., Nawroth P.P., King G., Moller W., Tritschler H.-J., Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2001. – Vol.17. – P.189–212.
- 3 Mokini Z., Marcovecchio M.L., Chiarelli F. Molecular pathology of oxidative stress in diabetic angiopathy: role of mitochondrial and cellular pathways // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2010. – Vol.87. – N 3. – P. 313-321.
- 4 Adekenov S.M. Biologicheskii aktivnye veshchestva rastenii i perspektivy sozdaniya novyh lekarstvennyh preparatov // *Razvitie fitohimii i perspektivy sozdaniya novyh lekarstvennyh preparatov*, Almaty, – Izdatelstvo “Gylm” – 2004. – S.7-17.
- 5 Ahmediyarova E.A., Zueva O.M., Setenbetova A.Zh. Vliyanie ekstraktov breezy na nespeceficheskuyu rezistentnost pri eksperimentalnyh immunodeficitah // *Astana med. Jurnal.* – 2005. – №2. – S.187-188.
- 6 Adewole S. and Ojewole J. Protective Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats // *Afr J Tradit Complement. Altern. Med.* -2009.- Vol.6. – N 1. – P. 30–41.
- 7 Pandey K.B. and Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* - 2009. – Vol.. – N 5. – P.270-278.
- 8 Maiorov A. U., Naumenkova I.V. Sovremennyye saharosoderjayushie sredstva v lechenii saharnogo diabeta 2 tipa // *rus. Med. Journ.* – 2001. – №24. – S.1105-1111.
- 9 Lucchesi A.N., Freitas N.T., Cassettari L.L., Marques S.F., Spadella C.T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease // *Acta Cir. Bras.* – 2013. – Jul – Vol.28. – N 7. – P.502-8.