

© ЕРЕМЕНКО Р.Ф., МАЛОШТАН Л.Н., 2014

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ (MEDICAGO SATIVA L.) НА УРОВЕНЬ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ У КРЫС-САМОК

ЕРЕМЕНКО Р.Ф., МАЛОШТАН Л.Н.

Национальный фармацевтический университет, Украина

Резюме.

В эксперименте изучено влияние 4 – недельного введения половозрелым самкам фитоэстрогенсодержащих препаратов ЭТЛП и референсного климадинона на уровень половых гормонов. Установлено, что ЭТЛП и климадинон не оказывали существенного влияния на трофические процессы и на общее состояние яичников крыс самок по сравнению с животными группы интактного контроля. Не установлено влияние ЭТЛП и препарата сравнения «Климадинон» на длительность цикла и функциональное состояние яичников. Но климадинон достоверно по отношению к группе интактного контроля в 1,2 раза, а по отношению к группе ЭТЛП – в 1,15 раза увеличивает значение массового коэффициента яичников, что говорит о том, что в отличие от ЭТЛП фитоэстрогены климадинона возможно могут усиливать пролиферацию яичников. Показано, что длительное поступление в организм фитоэстрогенов приводит к сдвигам в содержании половых гормонов эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови опытных крыс-самок. ЭТЛП достоверно относительно группы интактного контроля на 10% а группы климадинона – на 7% повышает уровень эстрадиола. ЭТЛП и препарат сравнения «Климадинон» достоверно относительно группы интактного контроля снижают на 10% уровень тестостерона у здоровых крыс-самок. Учитывая то, что опыты проводились на здоровых животных, которые обладают хорошей резистентностью, такой эффект ЭТЛП можно объяснить тем, что он может стимулировать процесс образования эстрадиола из тестостерона за счет фитоэстрогенного действия имеющихся в нем изофлавоноидов: генистеина, дайдзеина и куместрола.

Ключевые слова: фитоэстрогены, экстракт люцерны посевной, климадинон, эстральный цикл, половые гормоны.

Abstract.

The influence of four - week introduction of extract of alfalfa (*Medicago sativa* L.) grass (EGMS) to the sexually mature female rats on the sex hormones level was studied in the experiment. It has been shown that the prolonged intake of phytoestrogens leads to the insignificant shifts in the content of sex hormones. Females have leveled the differences between estradiol content in the estrus-diestrus cycles. It has been found out that EGMS and «Klimadynon» hadn't exerted any significant influence on the trophic processes and the general condition of the ovaries of the female rats in comparison with the animals of the intact control group. The influence of EGMS and «Klimadynon» on the content of estradiol and testosterone in the blood serum of the experimental female rats has been established. EGMS in contrast to «Klimadynon» increases the level of estradiol by 10% tendenciously with regard to the intact control group. EGMS as well as a comparison drug «Klimadynon» reliably decrease the level of testosterone in healthy female rats by 10% with regard to the intact control group. Taking into account that the experiments were carried out on the healthy animals with good resistance, such effect of EGMS may be explained by the fact that it can stimulate the formation of estradiol from testosterone at the expense of phytoestrogen action of the existing in it isoflavonoids: genistein, daidzein and coumestrol.

Key words: phytoestrogens, alfalfa (*Medicago sativa* L.) extract, «Klimadynon», estrous cycle, sex hormones.

В настоящее время особый интерес вызывают некоторые представители класса биофлавоноидов, проявляющие гормоноподобные, а именно – эстрогеноподобные свойства

и названные поэтому фитоэстрогенами [1]. Известна высокая биологическая активность лекарственных средств из растений, применяемых для коррекции расстройств полового

цикла и репродуктивной функции. В организме животных и людей фитоэстрогены впервые обнаружены в конце 60-х годов [1, 2]. Биохимический анализ показал, что фитоэстрогены по структуре обладают определенным сходством с эндогенными эстрогенами животных и имеют близкую с ними молекулярную массу. Фитоэстрогены могут выступать в качестве антиэстрогенных агентов. Следовательно, фитоэстрогены обладают потенциальной способностью модифицировать механизмы, регулирующие половой цикл и репродуктивный процесс у человека и животных.

Как выяснилось, биологическая активность фитоэстрогенов в сотни и тысячи раз ниже активности эндогенных эстрогенов, однако постоянное потребление человеком растительной пищи, а также таких продуктов, как молоко и мясо травоядных животных, может приводить к значительной концентрации фитоэстрогенов в организме [3]. Хотя влияние фитоэстрогенов оказывается, как правило, минимальным, при определенных условиях оно может вызывать нарушения полового цикла и репродуктивной функции [4, 5].

Экстракт из травы люцерны посевной (ЭТЛП) является объектом наших исследований как корректор белкового обмена, что обусловлено содержанием в нем большого количества белка, аминокислот, в том числе незаменимых, ферментов, витаминов, макро- и микроэлементов. Предварительно проведенные фармакологические доклинические исследования экстракта люцерны посевной выявили для него свойства корректора белкового обмена [4,5].

Технология получения экстракта из травы люцерны посевной была разработана и стандартизирована на базе НФаУ доцентом кафедры нутрициологии и фармацевтической броматологии д.ф.н. Ковалевым С.В. [6, 7]. Последним установлено, что экстракт из трав люцерны посевной (ЭТЛП) представляет собой порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета с приятным специфическим запахом, горьким вкусом, хорошо растворим в воде, водных растворах спирта, плохо растворим в этаноле, не растворим в органических растворителях эфире, хлороформе, бензоле. Хроматографические и химические исследования экстракта из травы люцерны посевной позволили Ковалеву С.В. устано-

вить наличие в нем таких групп фенольных соединений, как гидроксикоричные кислоты, кумарины, эуфлавоноиды, изофлавоноиды и дубильные вещества конденсированной природы. При разделении продуктов кислотного гидролиза фенольного комплекса на колонке полиамидного сорбента с использованием в качестве растворителя хлороформа и его смеси со спиртом были выделены такие вещества фенольной природы, как гидроксикоричные кислоты: п-кумаровая, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая; эуфлавоноиды: кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, хризозеин; изофлавоноиды: даидзеин, формонетин, генистеин и биоханин А [6]. Суммарное содержание фенольных соединений в траве люцерны посевной составляет 3,49%, из них гидроксикоричных кислот – $1,37 \pm 0,03\%$, флавоноидов – $0,71 \pm 0,03\%$ и полифенолов - $1,41 \pm 0,05\%$. Содержание фенольных соединений в сухом экстракте (ЭТЛП) составляет $10,41 \pm 0,43\%$ [6, 7].

Экстракт из травы люцерны посевной, будучи донором белковых молекул и их составляющих – аминокислот, способен пополнять запасы эндогенных протеинов, и способствует повышению уровня белка в организме и таким образом восстановлению его пластических, структурных, энергетических и других функций, что позволит при его использовании предотвратить развитие или вылечить нарушения белкового обмена [6, 7].

Известно, что в регуляции белкового обмена в организме принимают непосредственное участие также половые гормоны. Так, эстрогены способствуют увеличению общего количества белка в организме за счет смещения азотистого баланса в положительную сторону вследствие роста половых органов, костей, мышц и некоторых мягких тканей организма. Тестостерон вызывает задержку белка в организме и стимулирует его синтез, то есть оказывает анаболическое действие, способствует увеличению мышечной массы, ускорению образования белковой матрицы кости, процессов роста и физического развития. Мужские и женские гормоны синтезируются как семенниками, так и яичниками, но у мужчин значительно преобладают андрогены, а у женщин соответственно - эстрогены, обеспечивая эмбриональную дифференцировку и в дальнейшем развитие половых органов, вторичных половых признаков и полового пове-

дения. К эстрогенам относятся эстриол, эстрон и эстрадиол, но наибольшей физиологической активностью из них обладает эстрадиол, который и обеспечивает формирование организма и психофизиологию по женскому типу. Для проявления эффектов эстрадиола существенным является его соотношение с тестостероном, потому что эстрадиол образуется из тестостерона у женщин - в коре надпочечников, фолликулах яичников и плаценте, а у мужчин - в семенных пузырьках, коре надпочечников и тканях организма.

Экстракт из трав люцерны посевной содержит фитоэстрогены изофлавоноиды генистеин, дайдзеин, куместрол, которые, воздействуя на уровень эндогенных половых гормонов, могут вмешиваться в протекание процессов белкового обмена в организме [1-5].

Исходя из вышеизложенного целью работы стало изучение влияния экстракта из травы люцерны посевной в сравнении с фитоэстрогенсодержащим препаратом «Климадинон» на уровень половых гормонов эстрадиола и тестостерона в организме половозрелых здоровых крыс-самок.

Методы

Для достижения цели было проведено сравнительное исследование влияния введения в течение 1 месяца экстракта из травы люцерны посевной и препарата сравнения «Климадинон» на функциональное состояние репродуктивной функции крыс-самок с помощью оценки трофических процессов в организме, эстрального цикла, макроскопического состояния яичников и уровня половых гормонов.

Выбор климадинона в качестве препарата сравнения обусловлен тем, что действующее вещество – экстракт корневищ цимицифуги является аналогом экстракта из травы люцерны посевной по составу, так как содержит фитоэстрогены, фитостерин, органические кислоты, крахмал, танины, дубильные вещества, алкалоиды, тритерпеновые гликозиды, фенольные соединения, камедь, ароматические кислоты, сапонины, флавоноиды, немного эфирного масла. Экстракт корневищ цимицифуги оказывает эстрогеноподобный эффект путем связывания с рецепторами эстрогенов. Кроме того, отмечают уменьшение выделения лютеинизирующего гормона передней доли

гипофиза, что может быть связано с влиянием на эстрогеночувствительные клетки гипоталамуса и регуляцией высвобождения им соответствующего рилизинг-гормона. Эстрогеноподобное влияние на организм и уменьшение выделения лютеинизирующего гормона — основной механизм действия препарата.

В исследовании использовали 30 белых крыс-самок массой 200-240 г, которые были распределены по группам следующим образом:

1 – интактный контроль, группа крыс-самок, не подвергавшихся какому-либо воздействию;

2 – группа крыс-самок, которым внутрижелудочно вводили экстракт из травы люцерны посевной в дозе 25 мг/кг;

3 – группа крыс-самок, которым внутрижелудочно вводили климадинон в дозе 30 мг/кг.

Значение дозы препарата сравнения растительного фитоэстрогенсодержащего «Климадинон» 30 мг/кг, соответствующей суточной дозе для человека, было получено с помощью коэффициента пересчета по площади тела [8].

На первом этапе крысам-самкам экспериментальных групп внутрижелудочно вводили экстракт из травы люцерны посевной в дозе 25 мг/кг и препарат сравнения «Климадинон» в дозе 30 мг/кг в течение двух недель. Затем в течение следующих двух недель исследовали эстральный цикл самок с помощью вагинальных смывов, которые изучали ежедневно утром. Исследуемые препараты не прекращали вводить в течение данного периода, таким образом, общий период введения составил 1 месяц. После этого животных выводили из исследования. Все животные при этом находились в стадии покоя (диэструс). У крыс-самок период эстрального цикла в норме составляет 4-6 суток, включает стадию диэструс (2 суток), проэструс (12:00 - 1 сутки), эструс (1 сутки) и метаэструс (1 сутки). По окончании эксперимента животных под эфирным наркозом выводили из опыта, собирали кровь для получения сыворотки и определяли массу яичников (МК). В сыворотке крови самок определяли уровень половых гормонов эстрадиол и тестостерон с помощью тест-наборов для иммуноферментного анализа: «Гранум», Украина [8].

Исследование проведено с соблюдением требований комиссии по биоэтике НФаУ и «Общих этических принципов эксперимен-

тов на животных» (Киев, 2001), которые согласовываются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) [8].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica 6,0». Результаты исследования представлены в виде средней и ее стандартного отклонения. Нормальность распределения была подтверждена с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Однородность дисперсий подтверждена с помощью критерия Левена. Так как выборки анализируемых параметров характеризовались нормальным распределением и однородной дисперсией, для получения статистических данных проведен дисперсионный анализ, для множественных сравнений применяли критерии Шеффе, Стьюдента с поправкой Бонферони и Ньюмена-Кейлса с уровнем значимости $p < 0,05$ [9]. Результаты исследования предоставлены в таблицах 1 и 2.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было установлено, что ЭТЛП и климадинон не оказывали влияния на трофические процессы и на общее состояние яичников крыс самок по сравнению с животными группы интактного контроля (табл. 1).

Анализируя массовые коэффициенты (МК) яичников, приведенные в таблице

1, можно заключить, что ЭТЛП не влияет на МК яичников, а климадинон достоверно по отношению к группе интактного контроля в 1,2 раза увеличивает значение данного показателя. Проведение множественных сравнений показателей групп ЭТЛП и климадинона показывают, что МК яичников в группе климадинона достоверно на 15% выше, чем в группе ЭТЛП, что говорит о том, что в отличие от ЭТЛП фитоэстрогены Климадинона возможно могут усиливать пролиферацию яичников. Оценка показателей таблицы 1, характеризующих длительность течения цикла у крыс-самок, показала отсутствие влияния ЭТЛП и препарата сравнения «Климадинон» на длительность цикла и соответственно на функциональное состояние яичников.

Анализ уровня эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови опытных крыс самок позволил сделать вывод о том, что ЭТЛП и климадинон влияют на содержание этих половых гормонов (табл. 2).

Так, установлено, что ЭТЛП, в отличие от климадинона, достоверно относительно группы интактного контроля на 10 %, а относительно группы климадинона – на 7%, повышает уровень эстрадиола. Экстракт из травы люцерны посевной, как и препарат сравнения «Климадинон», достоверно относительно группы интактного контроля снижают на 10 % уровень тестостерона у здоровых крыс - самок. Эти данные говорят о том, что только под влиянием ЭТЛП происходит усиление процесса образования эстрадиола из тестостерона. В то же время препарат сравнения «Климадинон»

Таблица 1 – Показатели состояния репродуктивной функции крыс-самок, получавших ЭТЛП в дозе 25 мг/кг и климадинон в дозе 30 мг/кг в течение 1 месяца

Показатели \ Условия опыта	Интактный контроль	ЭТЛП, 25 мг/кг	Климадинон, 30 мг/кг
МК яичников, г/100г	0,044±0,009	0,046±0,06**	0,053±0,006*/* (p<
Длительность цикла до введения	5 (4,5; 5,5)	6 (5,0; 6,0)	5 (5,0; 6,0)
Длительность цикла после введения	5 (4,5; 5,0)	4,5 (5,0; 5,5)	5 (4,5; 5,0)

Примечание: * - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, $p < 0,05$ (Множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса); & - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, $p < 0,05$ (Множественные сравнения по критерию Стьюдента с поправкой Бонферони); ** - отклонение показателя достоверно по отношению к группе препарата сравнения «Климадинон», $p < 0,05$ (Множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса).

Таблица 2 – Уровень половых гормонов в сыворотке крови крыс-самок, получавших ЭТЛП и климадион

Условия опыта \ Показатели	Эстрадиол, нмоль/л	Тестостерон, нмоль/л	Тестостерон/эстрадиол
Интактный контроль	1,71±0,13	4,93±0,47	2,88
ЭТЛП, 25 мг/кг	1,89±0,13*#/** (p< 0,05)	4,40±0,54*#/& (p< 0,05)	2,32#/& (p< 0,05)
Климадион, 30 мг/кг	1,76±0,16	4,21±0,51*#/& (p<0,05)	2,39#/& (p<0,05)

Примечание: * - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, p<0,05 (Множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса); # - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, p<0,05 (Множественные сравнения по критерию Шеффе); & - отклонение показателя достоверно по отношению к группе интактного контроля, p<0,05 (Множественные сравнения по критерию Стьюдента с поправкой Бонферони); ** - отклонение показателя достоверно по отношению к группе препарата сравнения «Климадион», p<0,05 (Множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса).

снижает уровень тестостерона за счет других механизмов, а именно за счет способности фитоэстрогенов стимулировать образование в печени глобулинов, связывающих половые стероиды, и таким путем модулировать биологическую активность эндогенных половых гормонов [2].

Учитывая то, что опыты проводились на здоровых животных, которые обладают хорошей резистентностью, и вызвать у них изменения, особенно гормонального фона, очень трудно, такой эффект ЭТЛП можно объяснить тем, что он может стимулировать процесс образования эстрадиола из тестостерона за счет фитоэстрогенного действия имеющихся в нем изофлавоноидов генистеина, дайдзеина и куместрола.

Заключение

Установлено, что введение крысам-самкам в течение 4-х недель экстракта из травы люцерны посевной (ЭТЛП) (*Medicago sativa* L.) в дозе 25 мг/кг и препарата сравнения «Климадион» в дозе 30 мг/кг не оказывало влияния на трофические процессы и на общее функциональное состояние яичников крыс-самок по сравнению с животными группы интактного контроля. Не установлено влияние ЭТЛП и препарата сравнения «Климадион» на длительность цикла и функциональное состояние яичников. Но климадион достоверно по отношению к группе интактного контроля

в 1,2 раза, а по отношению к группе ЭТЛП – в 1,15 раза увеличивает значение массового коэффициента яичников, что говорит о том, что в отличие от ЭТЛП фитоэстрогены климадинона, возможно, могут усиливать пролиферацию яичников. ЭТЛП достоверно относительно группы интактного контроля на 10 %, а группы климадинона – на 7% повышает уровень эстрадиола. Экстракт из травы люцерны посевной, как и препарат сравнения «Климадион», достоверно относительно группы интактного контроля снижают на 10 % уровень тестостерона у здоровых крыс - самок.

Только под влиянием ЭТЛП происходит усиление процесса образования эстрадиола из тестостерона. А препарат сравнения «Климадион» снижает уровень тестостерона за счет других механизмов, а именно, возможно, за счет способности фитоэстрогенов стимулировать образование в печени глобулинов, связывающих половые стероиды.

Эффект влияния ЭТЛП на уровень половых гормонов также можно объяснить тем, что данный экстракт может стимулировать процесс образования эстрадиола из тестостерона за счет фитоэстрогенного действия имеющихся в нем изофлавоноидов – генистеина, дайдзеина и куместрола.

Литература

1. Никитин, А. И. Фитоэстрогены : (лекция) [Электронный ресурс] / А. И. Никитин // Проблемы

- репродукции. – 2000. – № 3. – Режим доступа: http://www.rusmedserv.com/problreprod/2000g/3/article_698.html.
2. Влияние фитоэстрогенов на уровень половых гормонов и фертильность крыс / Е. В. Сомова [и др.] // Проблемы эндокринной патологии. – 2010. – № 1. – С. 82-89.
 3. Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant mixture of phytoestrogens / J. Boberg [et al.] // *Reprod Toxicol*. – 2013 Sep. – Vol. 40. – P. 41-51.
 4. Barlas, N. The estrogenic effects of apigenin, phloretin and myricetin based on uterotrophic assay in immature Wistar albin rats / N. Barlas, S. Ozer, G. Karabulut // *Toxicol. Lett.* – 2014 Apr. – Vol. 226, N 1. – P. 35-42.
 5. The effects of dietary treatment with S-equol on learning and memory processes in middle-aged ovariectomized rats / S. L. Neese [et al.] // *Neurotoxicol Teratol.* – 2014 Jan-Feb. – Vol. 41. – P. 80-88.
 6. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов [та ін.] // *Фармацевтичний часопис*. – 2008. – № 2. – С. 27–30.
 7. Ковальов, С. В. Кількісне визначення фенольних сполук у траві люцерни посівної / С. В. Ковальов, Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан // *Фармаком*. – 2008. – № 4. – С. 35–38.
 8. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіценна, 2001. – 528 с.
 9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

Поступила 19.06.2014 г.

Принята в печать 05.12.2014 г.

Сведения об авторах:

Еременко Римма Фуатовна – к.б.н., доцент кафедры физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета, докторант, Украина;

Малоштан Л.Н. – д.б.н, профессор, заведующая кафедрой физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета, Украина.

Адрес для корреспонденции: Украина, 61002, г. Харьков, ул. Мельникова, 12, Национальный фармацевтический университет, кафедра физиологии и анатомии человека. Тел./факс: (057) 706-30-73, (067) 788-53-19, e-mail: fuatovna@rambler.ru – Еременко Римма Фуатовна.