

УДК 577.152.1

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ *ARONIA MELANOCARPA*.

Д.Л.Маслов, О.М. Ипатова, О.Ю.Абакумова, Т.А.Цветкова,
В.Н. Прозоровский.

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119992, Москва, ул. Погодинская, д.10; факс (095) 245-0857.

Показано, что экстракт из листьев аронии черноплодной обладает способностью снижать уровень глюкозы в крови экспериментальных животных как при внутрибрюшинном введении его, так и при добавлении его к питьевой воде.

Ключевые слова: арония черноплодная, экстракт, глюкоза.

ВВЕДЕНИЕ. Сахарный диабет - тяжелое хроническое заболевание, характеризующееся нарушением всех видов обмена веществ, и, в первую очередь, углеводного. В настоящее время наиболее распространенным средством, применяемым при лечении больных диабетом I типа (инсулинзависимый диабет), а также для многих больных диабетом II типа (инсулиннезависимый диабет) остается сам гормон инсулин. Однако при применении инсулина со временем может возникать резистентность к нему, что делает необходимым повышение дозы этого гормона [1]. Кроме того, подобно многим белкам инсулин не всасывается интактном при приеме внутрь *per os*, так как он подвергается воздействию протеаз. Поэтому его необходимо вводить парентерально. К сожалению, известные и широко применяемые современной медициной оральные гипогликемические препараты небелковой природы имеют большое число ограничений и противопоказаний [2]. Поэтому исследования, направленные на поиск и выявление новых оральных препаратов, обладающих помимо гипогликемического действия и меньшим числом противопоказаний, остаются актуальными и в настоящее время [3].

Еще до открытия инсулина в 1922 году, нетрадиционная медицина многих стран мира применяла различные экстракты и настои из растений для снижения повышенного уровня глюкозы в крови [4]. В 1980 году на одном из заседаний ВОЗ было принято решение о рекомендации более широкого применения в практической деятельности препаратов, созданных на основе растительного материала [5].

Целью данной работы являлось получение экстракта из листьев черноплодной рябины, исследование цитотоксичности экстракта и его гипогликемического действия.

МЕТОДИКА. *Получение экстракта.* Экстракт из листьев Аронии черноплодной (ЭЛАЧ) получен в соответствии с техническими условиями ТУ 9317-009-01897373-99. ("Экстракт аронии сухой", регистрационное удостоверение № 001173.Р.643.12.99.).

К 100 г сырья (порошок листьев черноплодной рябины) добавляли 1 л 96%-ного этилового спирта. Экстракцию проводили при периодическом

перемешивании при температуре 20°C в течение 24 часов. Полученный раствор отфильтровывали. Спирт из спиртового экстракта отгоняли с помощью вакуум-выпарного аппарата (перегонный аппарат с холодильником и водоструйным насосом). После отгонки спирта добавляли 300 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Водный раствор фильтровали на фильтре (фильтрат свободен от хлорофилла).

К 300 мл полученного водного экстракта добавляли 300 мл смеси этилацетат-спирт (9:1). Полученную смесь перемешивали в течение часа, затем загружали в делительную воронку и отстаивали до четкого разделения фаз, собирая этилацетатную фракцию (верхняя фракция). Этилацетат отгоняли с помощью вакуум-выпарного аппарата.

Анализ полученного экстракта. Измерение УФ-спектра спиртового раствора экстракта. УФ-спектр снимали с 0,001% раствора экстракта в 96%-м этаноле в кювете с толщиной поглощаемого слоя 10 мм на регистрирующем спектрофотометре.

Анализ ЭЛАЧ при помощи ВЭЖХ. Анализ ЭЛАЧ выполнен при помощи метода ЖХВД (колонка Ultrasphere-ODS, 5 мкм; 10 мм x 15 см), изократическая система разделения: 15% ацетонитрил - 85% 0.1% ТФУ в дистиллированной воде. Регистрация элюата велась при 280 нм. Скорость элюции 1 мл/мин. Материал каждой из полученных фракций был выделен и лиофильно высушен.

Определение состава ЭЛАЧ. Качественный состав каждого из полученных пиков был определен с помощью качественных колориметрических реакций, как ранее описано в [6].

Количественное определение суммарного содержания фенольных соединений по методу Фолина-Чикальтеу. 0,05 г экстракта растворяли в 50 мл 70% этанола. В три пробирки помещали по 1 мл полученного раствора, добавляли по 4 мл специально приготовленного раствора (смешивали 50 мл 2% Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH и 1 мл 0,5% раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 0,1%-м цитрате натрия) и выдерживали в течении 10 минут при комнатной температуре. При постоянном перемешивании добавляли 0,5 мл реактива Фолина-Чикальтеу. Выдерживали 30 минут и спектрофотометрически определяли поглощение при 750 нм, рассчитывая среднее значение трех измерений.

Общее содержание фенольных соединений (X) в процентах в пересчете на катехин и на сухой порошок вычисляли по формуле:

$$X(\%) = \frac{C_x 100 \times 50 \times 100 \times 100}{M_x 10 \times 1 \times 10^6 \times (100 - W)} = \frac{C_x 5}{M_x (100 - W)}, \quad \text{где}$$

C-содержание катехина по калибровочной кривой (мкг);

M-навеска исследуемого вещества (г); W-потеря в массе при высушивании (%)

Для построения калибровочной кривой использовали чистый препарат катехин.

Определение содержания лейкоантоцианидинов. 0,02 г полученного экстракта растворяли в 100 мл 70%-ого этанола. В 4 пробирки с притертой пробкой помещали по 0,5 мл приготовленного раствора и добавляли 4,5 мл кислого спирта (5% концентрированная HCl , 12 мг/л Fe^{2+} ; 4,7 % H_2O в этиловом или *n*-бутиловом спирте).

Одну пробирку оставляли в темноте (контроль), а остальные три нагревали (с обратным холодильником) на водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения пробирок измеряли поглощение при длине волны 535 нм. Из трех измерений брали среднее значение и определяли содержание антоцианидинов (X, %) в опытном образце по формуле:

$$X(\%) = \frac{C_x 100 \times 100 \times 100}{M_x 0,5 \times 10^6 \times (100 - W)} = \frac{C_x 5}{M \times 0,5 \times (100 - W)}, \quad \text{где}$$

М- точная навеска вещества (г); w- потеря массы при высушивании;
С- содержание антоцианидина по калибровочной кривой (мкг).

Количественное определение суммы свободных и конденсированных катехинов.

В 4 пробирки с притертой пробкой (3-опытные, 1-контрольная) помещали по 1 мл приготовленного раствора образца. В 3 опытных пробирки добавляли по 5 мл ванилинового реактива (1%-й раствор ванилина в концентрированной соляной кислоте), в контрольную пробирку - 5 мл соляной кислоты) перемешивали и через три минуты измеряли поглощение на длине волны 500 нм против контроля. Из трех измерений брали среднее значение и производили расчеты общего содержания катехина (X,%) по формуле:

$$X(\%) = \frac{C \times 100 \times 100 \times 100}{a \times 1 \times 10^6 \times (100 - W)} = \frac{C}{a \times (100 - w)}, \quad \text{где}$$

a- навеска исследуемого вещества (г); w- потеря в массе при высушивании.

C- содержание катехина по калибровочной кривой (мкг).

При построении калибровочной кривой в качестве стандарта использовали катехин.

Изучение токсичности ЭЛАЧ на клеточной культуре.

Клетки L 929 (фибробластоподобные клетки саркомы мышей) культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), гентамицина (50 мкг/мл) до состояния плотного монослоя [7]. К клеткам добавляли 50 мкл раствора, содержащего 25 мг ЭЛАЧ /мл. В контрольные лунки было добавлено по 50 мкл раствора Хенкса. После этого клетки инкубировали еще сутки. Подсчет количества клеток проводили после их окраски кристалл-виолетом на приборе Dombi Plate (Россия) при длине волны 540 нм. [8].

Для подсчета клеток использовали экспериментально полученный коэффициент (0,1 единица поглощения при 540 нм соответствует 32.5 x 10³ клеток).

Опыты на животных.

В опытах *in vivo* использовали самцов крыс линии Wistar (питомник РАМН) весом 180-200 грамм. Все опыты проводились через 16 часов после последнего приема пищи. Диабет, вызванный внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе 70 мг/кг веса, развивался в течение 5 дней с момента введения [4].

Образцы полученного экстракта (120 и 200 мг экстракта/кг веса) и инсулин Actrapid HM (0,5 мг/кг веса) были растворены в 100 мкл раствора, содержащего 70 мкл 0.9% NaCl и 30 мкл этилового спирта. Затем к раствору было добавлено 400 мкл 0.9% NaCl. Таким образом, объем полученного раствора составлял 500 мкл. Полученный раствор вводили внутрибрюшинно животным с экспериментальным диабетом. Контрольной группе животных было введено 500 мкл 0,9% NaCl, содержащего 30 мкл этилового спирта. Кровь брали из хвостовой вены. Уровень глюкозы измеряли орто-толуидиновым методом [9]. Через 2 дня опыты были повторены еще раз.

Статистическая достоверность результатов рассчитана с использованием t-теста по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В ходе работы разработана методика получения экстракта. Полученный нами ЭЛАЧ представляет собой светло-бурый порошок, не имеющий резко выраженного запаха. Экстракт легко растворим в спирте и водно-спиртовых растворах. Обнаружено, что спектр поглощения спиртового раствора полученного экстракта в ультрафиолетовой области (рис. 1) идентичен спектру поглощения флавоноидов (максимальное поглощение в интервале 290-325 нм) [6]. В качестве сравнения приведены УФ-спектры поглощения спиртовых растворов камферола, кверцетина и медикарпина (рис. 2), ранее опубликованные в [10].

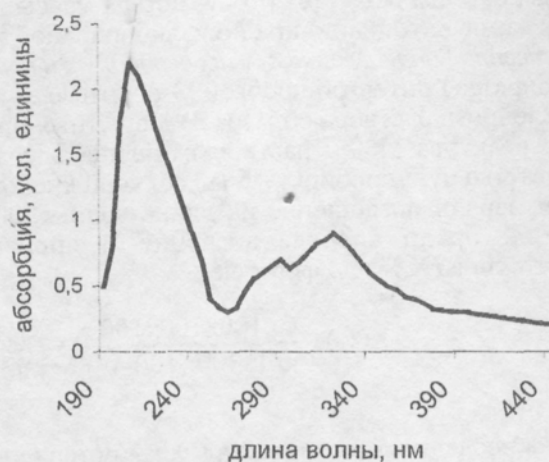


Рисунок 1.
УФ-спектр спиртового раствора экстракта.

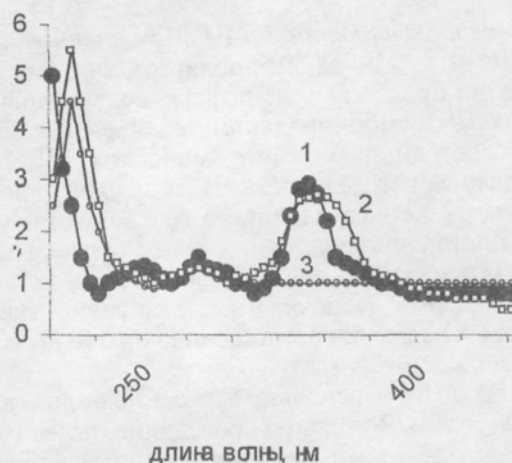


Рисунок 2.
УФ-спектр спиртовых растворов некоторых флавоноидов: камферол (1), кверцетин (2), медикарпин (3).

С помощью ВЭЖХ экстракт был разделен на 6 основных пиков (рис. 3). Анализ состава каждого пика, выполненный с помощью колориметрических реакций показал, что материал всех пиков содержит лейкоантоцианидины, дающие положительную реакцию с бутанол/НСI-реагентом. В пятой и шестой фракциях обнаружены так же гликозилированные флавонолы кверцетинового ряда.

ЭЛАЧ не обладает выраженным токсическим действием на культуру клеток даже при сравнительно высокой концентрации. Инкубация раствора экстракта с клеткам L929 в течение суток не привело к заметному изменению числа клеток по сравнению с контрольной группой, куда был добавлен раствор Хенкса (среднее количество клеток/лунка при добавлении к ним растворов ЭЛАЧ и Хенкса составляло $1,2 \pm 0,1 \times 10^5$ и $1,1 \pm 0,1 \times 10^5$ соответственно).

Данные, полученные при измерении уровня глюкозы в крови подопытных животных, показали, что по гипогликемическому действию ЭЛАЧ уступает действию инсулина Астарипд приблизительно в 200 раз, но превосходит последний приблизительно в 4 раза по времени действия (рис. 4 и 5).

Добавление раствора ЭЛАЧ к питьевой воде (а среднесуточное потребление воды крысами с экспериментальным сахарным диабетом составляло 90 ± 15 мл в сутки) так же приводило к стойкому дозозависимому снижению уровня глюкозы в крови (рис. 6).

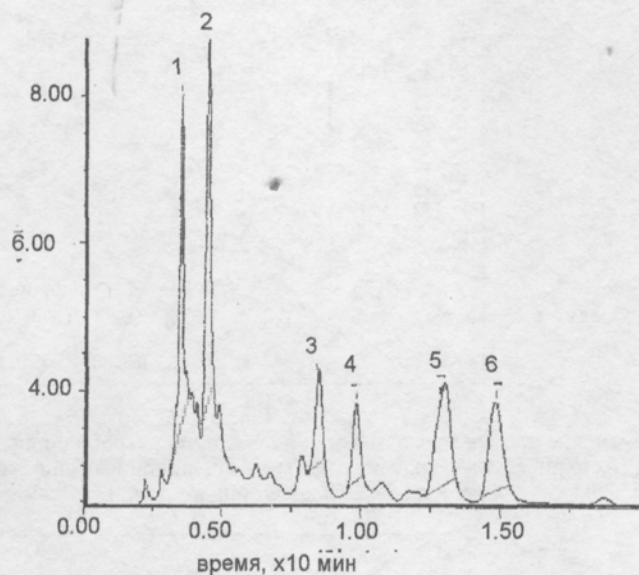


Рисунок 3.
Профиль ВЭЖХ элюции ЭЛАЧ.

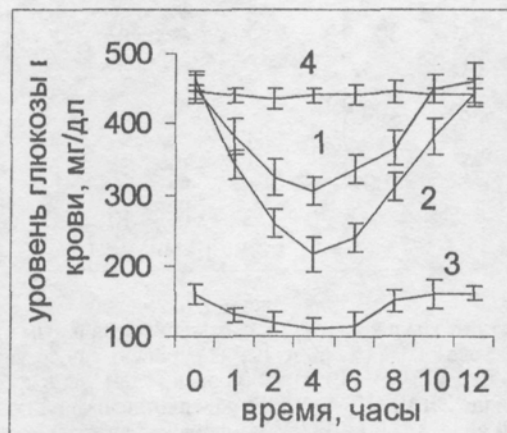


Рисунок 4.

Изменение уровня глюкозы в крови крыс при внутривенном введении раствора ЭЛАЧ ($\bar{X} \pm m$, $n=12$): (1) уровень глюкозы в крови при введении крысам с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД) раствора ЭЛАЧ (120 мг/кг); (2) уровень глюкозы в крови при введении крысам с ЭСД раствора ЭЛАЧ (200 мг/кг); (3) уровень глюкозы в крови при введении здоровым крысам раствора ЭЛАЧ (200 мг/кг); (4) уровень глюкозы в крови при введении крысам с ЭСД 0,9% раствора NaCl.

Сахарный диабет определен Всемирной организацией здравоохранения как эпидемия особого неинфекционного заболевания и борьба с ним является приоритетом для национальных систем здравоохранения. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что полученный экстракт из листьев Аронии черноплодной обладает способностью снижать уровень глюкозы в крови как при внутривенном введении, так и при введении *per os*. Это свойство ЭЛАЧ в сочетании с низкой токсичностью позволяет предположить возможность создания на его основе нового гипогликемического препарата. Перспективным может оказаться применение такого препарата в качестве дополнительного гипогликемического лицами, страдающими обеими формами сахарного диабета

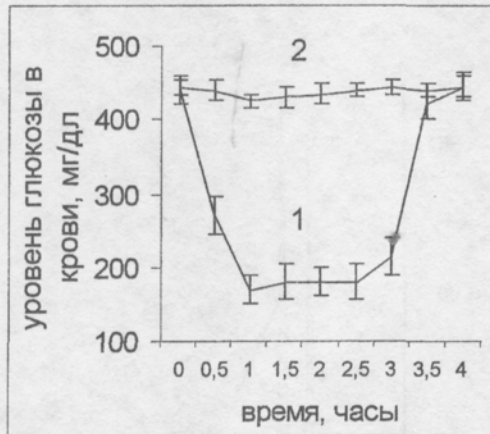


Рисунок 5.

Изменение уровня глюкозы в крови крыс при внутрибрюшинном введении раствора инсулина (Actrapid НМ). 1. уровень глюкозы в крови при введении крысам с ЭСД раствора инсулина (0,5 мг/кг); 2. уровень глюкозы в крови при введении крысам с ЭСД 0,9% раствора NaCl;

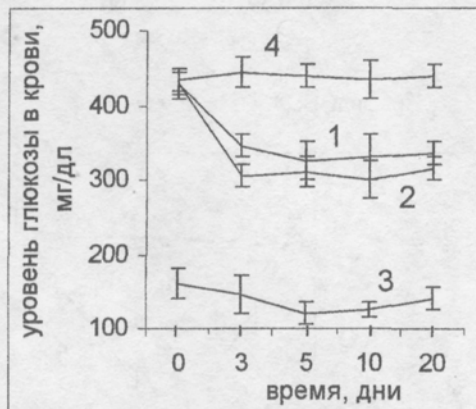


Рисунок 6.

Изменение уровня глюкозы в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом при добавлении экстракта к питьевой воде ($X \pm m$, $n=12$): (1) уровень глюкозы в крови крыс с ЭСД при добавлении к питьевой воде ЭЛАЧ (1 г/л); (2) уровень глюкозы в крови крыс с ЭСД при добавлении к питьевой воде ЭЛАЧ (1,5 г/л); (3) уровень глюкозы в крови здоровых крыс при добавлении к питьевой воде ЭЛАЧ (1,5 г/л); (4) уровень глюкозы в крови крыс с ЭСД без добавления к питьевой воде ЭЛАЧ.

или при состояниях, характеризующихся пониженной толерантностью к глюкозе. Возможно, это позволит уменьшить число инъекций инсулина, увеличить временной промежуток между ними. Это может снять или ослабить побочные явления, возникающие при гормон-заместительной терапии или при использовании применяемых пероральных гипогликемических средств. К преимуществу использования данного экстракта можно отнести и относительно дешевый способ его получения.

Логическим продолжением работы является изучение вклада отдельных составляющих данного экстракта на уровень глюкозы в крови, выделение и описание их строения.

Работа поддержана грантом РФФИ 99-04-48544.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Wichterle D., Stolba P., Krhaková A. (1995) Vnitr. Lek., 41(2), 146-150.
2. Laurence D.R., Bennett P.N. (1987), Clinical Pharmacology. Churchill Livingstone Edinburgh London, New-York.
3. Choi J. S., Yokozawa T., Oura H. (1991) Planta Med., 57, 208-211.
4. Gray A.M., Flatt P.R. (1997), Br. J. of Nutr. 78, 325-334.
5. Gray A.M., Flatt P.R. (1998), Br. J. of Nutr. 80, 109-114.
6. Waterman P.G., Mole S. (1994), Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, /UK/.
7. Abakumova O.Yu., Kutsenko N.G. (1990), Biomed Science, 1, 183-188.
8. Abakumova O.Yu., Podobet O.V., Kondakova L.I., Navasardyan D.C., Medvedev A.E. (1998), J. Neural Transm. Suppl., 52, 87-91.
9. Hyvarinen A., Nikkila E. (1962) Clin. Chim. Acta 7, 140.
10. Yang B., Arai K., Kusu F. (2001) Analytical Sciences 17, 987-989.

Поступила 21.12.01.

INVESTIGATION OF HYPOGLYCEMIC ACTION OF EXTRACT FROM
ARONIA MELANOCARPA LEAVES.

D.L. Maslov, O.M. Ipatova, O.YU. Abakymova, T.A. Tzvetkova, V.N. Prozorovsky

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, 119992, Moscow, Pogodinskaya Street 10, Russia.
Fax: (095) 245-0857

The action of extract from *Aronia melanocarpa* leaves to blood glucose level was investigated. It was shown that incorporated into drinking water and administrated intraperitoneally, the extract significantly reduce the blood glucose level of streptozotocin (STZ)-diabetic and normal rats.

Key words: *Aronia melanocarpa*, extract, hypoglycemic action