

Burmistrov O.S., Khodov D.A., Porotov I.G. Oxidative modification of human serum proteins and the method of their determining. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1995; 41 (1): 24-26. (In Russ.)]

2. Метельская В.А., Гуманов Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клини. лаб. диагн. — 2005. — №6. — С. 15-18. [Metelskaya V.A., Gumanov N.G. The screening method for determining the nitric oxide level in serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; 6: 15-18. (In Russ.)]

3. Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А. и др. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // Фундамент. исслед. — 2010. — №1. — С. 74-78. [Muravleva L.E., Molotov-Luchansky V.B., Klyuyev D.A. et al. Protein oxidative modification: problems and research prospects. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2010; 1: 74-78. (In Russ.)]

4. Селиванов Е.А., Ремизова М.И., Гербут К.А. и др. Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом на течение геморрагического шока при его инфузионной терапии // Мед. академ. ж. — 2012. — Т. 12, №2. — С. 84-89. [Selivanov E.A., Remizova M.I., Gerbut K.A. et al. Effect of dinitrosyl iron complex with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2012; 12 (2): 84-89. (In Russ.)]

5. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H,

cathepsin L // *Methods in Enzymol.* — 1981. — Vol. 80. — P. 535-561.

6. Conus S. Cathepsins and their involvement in immune responses. — *Swiss Medical Weekly*, 2010. — P. 1-12.

7. Grimm S., Höhn A., Grune T. Oxidative protein damage and the proteasome // *Amino Acids*. — 2012. — Vol. 42, N 1. — P. 23-38.

8. Kim C.J., Lee D.I., Lee C.H., Ahn I.S. A dityrosine-based substrate for a protease assay: application for the selective assessment of papain and chymopapain activity // *Anal. Chim. Acta*. — 2012. — Vol. 20, N 723. — P. 101-107.

9. Kumar S., Kumar M.S., Raja B. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* — 2010. — Vol. 1, N 3. — P. 300-307.

10. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J. Biol. Chem.* — 2013. — Vol. 288, N 37. — P. 26 464-26 472.

11. Vittorio C., Cornelius C., Rizzarelli E. et al. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule // *Antioxid. Redox Signal.* — 2009. — Vol. 11, N 11. — P. 2717-2739.

12. Wall S.B., Oh J.Y., Diers A.R., Landar A. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling // *Front Physiol.* — 2012. — Vol. 14, N 3. — P. 369.

13. Wink D.A., Hines H.B., Cheng R.Y. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response // *J. Leukocyte Biol.* — 2011. — Vol. 89. — P. 873-891.

УДК 612.084: 615.322: 615.272.3: 615.252.349.7: 615.036.8

E02

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ

Римма Фуатовна Ерёмко\*, Людмила Николаевна Малоштан, Елена Юрьевна Яценко

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

### Реферат

**Цель.** Изучение гипогликемической активности экстракта из травы люцерны посевной у здоровых крыс и крыс с глюкозной нагрузкой.

**Методы.** На первом этапе исследования определяли гипогликемическую активность экстракта из травы люцерны посевной у здоровых крыс. В качестве препаратов сравнения использовали метформин в дозе 50 мг/кг и растительный противодиабетический сбор «Арфазетин» в дозе 18 мг/кг. На втором этапе исследования была определена гипогликемическая активность экстракта из травы люцерны посевной у крыс с нагрузкой декстрозой (глюкозой). Пробы крови для анализа отбирали до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом.

**Результаты.** Установлена гипогликемическая активность экстракта из травы люцерны посевной у здоровых животных и у животных с нагрузкой декстрозой (глюкозой). В дозе 25 мг/кг экстракт из травы люцерны посевной через 4, 6 и 8 ч снижал уровень глюкозы в крови здоровых животных в 1,04, 1,14 и 1,11 раза по отношению к исходным данным на уровне гипогликемического действия «Арфазетина» и уступал по этому показателю действию метформина. Экстракт из травы люцерны посевной при однократном введении в дозе 25 мг/кг проявлял гипогликемическую активность на фоне нагрузки декстрозой (глюкозой) и достоверно снижал концентрацию глюкозы в крови через 15, 30, 60 и 120 мин в сравнении с контролем.

**Вывод.** Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования экстракта из травы люцерны посевной в дозе 25 мг/кг в комплексной терапии сахарного диабета 2-го типа в качестве фитопрепарата с гипогликемическими свойствами.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, люцерна посевная, гипогликемическая активность.

### EXPERIMENTAL STUDY OF HYPOGLYCEMIC EFFECT OF MEDICAGO SATIVA LEAVES EXTRACT

R.F. Eremenko, L.N. Maloshtan, E.Yu. Yatsenko

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

**Aim.** To study the hypoglycemic effect of the *Medicago Sativa* leaves extract in intact rats and in rats with a glucose load.

**Methods.** At the first stage, hypoglycemic effect of *Medicago Sativa* leaves extract was determined in intact rats. 50 mg/kg of metformin and 18 mg/kg of herbal anti-diabetic «Arfazetin» tea were used as comparator drugs. At the second stage, hypoglycemic effect of *Medicago Sativa* leaves extract was determined in rats with glucose load. Blood samples for glucose analysis were taken before and in 15, 30, 60 and 120 minutes after loading. Blood glucose level was determined by glucose oxidase method.

**Results.** *Medicago Sativa* leaves extract showed hypoglycemic effect both in intact animals and in animals with glucose load. 25 mg/kg of *Medicago Sativa* leaves extract decreased blood glucose level in intact animals at 4, 6 and 8 hours by 1.04, 1.14 and 1.11 times compared to the baseline level; the effect was comparable with herbal anti-diabetic «Arfazetin» tea and was inferior to metformin. A single 25 mg/kg dose of *Medicago Sativa* leaves extract showed hypoglycemic effect in animals with glucose load and significantly reduced blood glucose level in 15, 30, 60 and 120 minutes compared to control.

**Conclusion.** The findings suggest that 25 mg/kg of *Medicago Sativa* leaves extract can be used as a herbal medication in the complex treatment of type II diabetes mellitus for its hypoglycemic properties.

**Keywords:** diabetes mellitus, *Medicago Sativa* leaves extract, hypoglycemic activity.

Стремительный рост числа больных сахарным диабетом (СД) в мире, а также увеличение количества пациентов, страдающих от его осложнений, снижение продолжительности жизни и ранняя инвалидизация больных СД подтверждены многочисленными данными [5, 8].

На сегодняшний день, несмотря на значительный прогресс в изучении СД 2-го типа, разработку и применение большого арсенала гипогликемических препаратов, по-прежнему остаётся актуальным поиск эффективных нетоксичных средств растительного происхождения, обладающих различными фармакологическими свойствами, которые будут влиять на компоненты метаболического синдрома — гипергликемию, гиперлипидемию, реологические свойства крови, оксидативный стресс и др. [12].

Перспективный источник получения новых лекарственных средств и биологически активных добавок — люцерна посевная. С учётом этого в Национальном фармацевтическом университете (г. Харьков) путём экстрагирования водой был получен сухой экстракт из травы люцерны посевной (ЭТЛП), и определено содержание в нём биологически активных веществ.

Полученный ЭТЛП представляет собой порошок от светло-коричневого до тёмно-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.

В результате хроматографического и химического исследований ЭТЛП установлено наличие в нём таких групп фенольных соединений, как гидроксикоричные кислоты, кумарины, эуфлавоноиды, изофлавоноиды и дубильные вещества конденсированной группы.

При разделении продуктов кислотного гидролиза фенольного комплекса на колонке полиамидного сорбента с использованием в качестве растворителя хлороформа и его смеси со спиртом были выделены вещества фенольной природы (суммарное содержание в траве люцерны посевной 3,49%): гидроксикоричные кислоты (1,37±0,03%) —

п-кумаровая, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая; эуфлавоноиды — кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, хризозерин; изофлавоноиды (0,71±0,03%) — даидзеин, формонетин, генистеин и биоханин А; полифенолы (1,41±0,05%) [3, 4]. Содержание фенольных соединений в сухом ЭТЛП составляет 10,4±0,4%. С помощью автоматического аминокислотного анализатора в траве люцерны посевной установили наличие 16 аминокислот, в том числе 9 незаменимых [3, 4].

Из выделенных соединений флавоноиды (апигенин, лютеолин, кверцетин, рутин и др.), сапонины, полисахариды проявляют гипогликемическую активность, стимулируют выделение инсулина и тем самым способствуют проникновению глюкозы в клетки организма [3].

Кроме того, люцерна богата микро- и макроэлементами — Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, K, Si, Na и F [3, 4], а СД характеризуется дефицитом Cu, Mn, Cd и Cr, что ведёт к снижению чувствительности тканей к инсулину, ухудшению усвоения ими глюкозы и повышению её содержания в крови [10].

Разнообразный химический состав люцерны обуславливает и широкий спектр её биологического действия. Люцерну используют для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, острого и хронического цистита, артрита, ревматизма, СД, гипертонической болезни, гастрита, атеросклероза и др. [4].

В проведённых ранее исследованиях было установлено, что ЭТЛП в дозе 25, 50 и 100 мг/кг способен корректировать белковый обмен путём индукции синтеза белка [2]. Экспериментально определено, что для дальнейших исследований рационально использовать ЭТЛП в дозе 25 мг/кг, в которой он наиболее эффективно влияет на белковый обмен, в частности на функции мембранных белков, мембран эритроцитов и мембран гепатоцитов и кардиомиоцитов животных.

Целью настоящего исследования было изучение гипогликемической активности ЭТЛП у здоровых крыс и у крыс с нагрузкой декстрозой (глюкозой) [9].

Определение возможного гипогликеми-

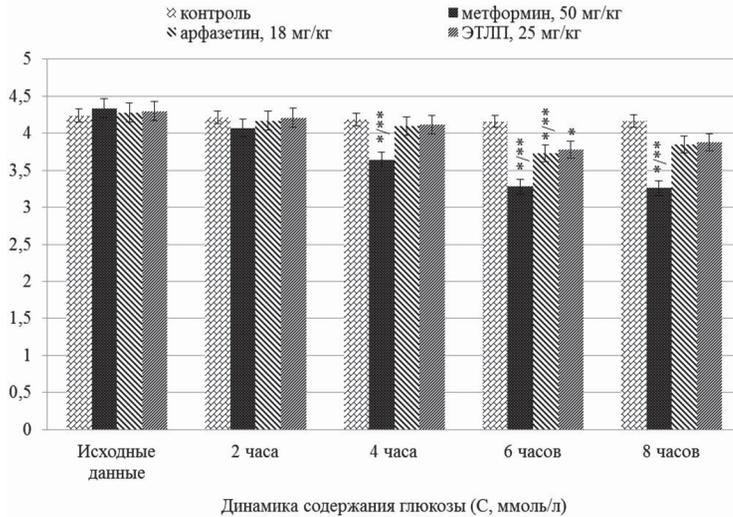


Рис. 1. Влияние экстракта из травы люцерны посевной (ЭТЛП) на концентрацию глюкозы в крови здоровых крыс (n=8); статистическая значимость различий ( $p \leq 0,05$ ) по отношению: \*к исходным данным, \*\*к контрольной группе.

ческого действия ЭТЛП в дозе 25 мг/кг проводили в два этапа.

На первом этапе исследования определяли гипогликемическую активность ЭТЛП у здоровых крыс с массой тела 200–240 г. В качестве препаратов сравнения использовали метформин, служащий «золотым стандартом» среди бигуанидов и нашедший широкое клиническое применение при СД 2-го типа [8, 11], в дозе 50 мг/кг и растительный противодиабетический сбор «Арфазетин» в дозе 18 мг/кг (в пересчёте на крыс через коэффициент Рыболовлева) [7].

Все животные были распределены на четыре группы (по 8 особей в каждой). Животные первой группы (здоровые) внутрижелудочно получали эквивалентное количество питьевой воды, второй группы – препарат сравнения метформин, третьей – препарат сравнения «Арфазетин», четвёртой группы – ЭТЛП. У крыс всех групп определяли концентрацию глюкозы исходно и через 2, 4, 6, 8 ч после однократного введения ЭТЛП и препаратов сравнения.

На втором этапе исследования была определена гипогликемическая активность ЭТЛП у крыс с массой тела 200–240 г с нормальным углеводным гомеостазом в условиях нагрузки декстрозой (глюкозой). Определение возможного гипогликемического действия ЭТЛП при однократном введении проводили на модели гипергликемии, вызванной внутрижелудочным введением с помощью зонда 40% раствора декстрозы (глюкозы) в дозе 3 г/кг массы тела [9].

Все животные были распределены на

пять групп (по 8 особей в каждой). За 1 ч до нагрузки декстрозой (глюкозой) животным первой и второй групп (интактной и контрольной) внутрижелудочно вводили эквивалентное количество питьевой воды, животным третьей группы – препарат сравнения метформин, четвёртой – препарат сравнения «Арфазетин», пятой – ЭТЛП.

Пробы крови для определения уровня глюкозы отбирали до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки из хвостовой вены крыс в количестве 0,01 мл [9]. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью ферментативного анализатора глюкозы «Эксан-Г», используя тест-наборы фирмы «Филисит-Диагностика» [6].

Исследование проводили согласно «Общим этическим принципам экспериментов на животных», которые отвечают положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). Результаты обрабатывали статистически с использованием параметрических и непараметрических методов с помощью программы Statistica 6 [1].

Содержание глюкозы в крови здоровых животных через 2, 4, 6, 8 ч во время проведения первого этапа исследования значительно не отличалось от исходных показателей. Под влиянием однократного введения метформина в терапевтической дозе 50 мг/кг в сравнении с исходными данными отмечена тенденция к снижению уровня глюкозы через 2, 4, 6, 8 ч на уровне 6,22; 16,13; 24,42 и 24,88% соответственно (рис. 1).

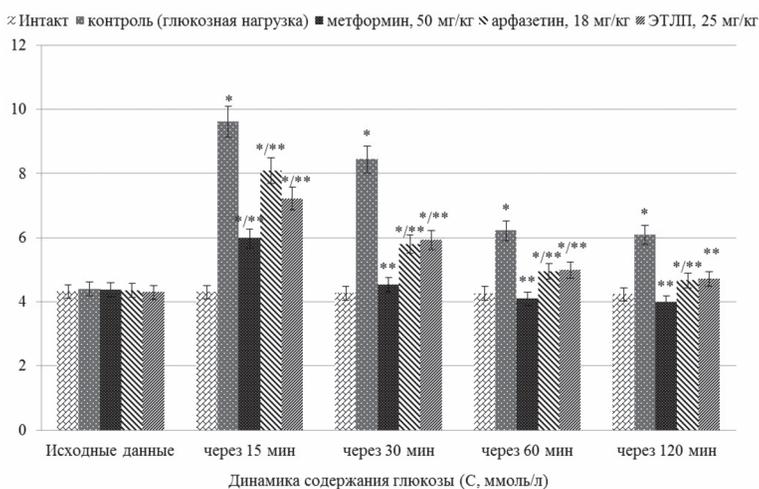


Рис. 2. Влияние экстракта из травы люцерны посевной (ЭТЛП) на концентрацию глюкозы в крови крыс с глюкозной нагрузкой (n=8); статистическая значимость различий (p ≤ 0,05) по отношению: \*к исходным данным, \*\*к контрольной группе.

Максимальное снижение уровня глюкозы в крови под действием метформина в сравнении с показателями исходных данных зарегистрировано через 6 и 8 ч (в 1,32 и 1,33 раза соответственно). Под действием препарата сравнения «Арфазетина» концентрация глюкозы в крови здоровых животных снижалась через 4, 6 и 8 ч на 4,2; 12,85 и 10,05% соответственно. Гипогликемическая активность ЭТЛП через 4, 6, 8 ч составила 4,19; 12,09 и 9,77% соответственно по отношению к исходным данным (на уровне гипогликемического действия «Арфазетина» и уступая метформину).

Задачей следующего фрагмента работы было изучение влияния ЭТЛП на составляющее СД 2-го типа — гипергликемию. Уровень глюкозы является мощным регулятором активности β-клеток островкового аппарата поджелудочной железы. Увеличение концентрации глюкозы в крови стимулирует выделение в кровь инсулина [5], что приводит к уменьшению содержания глюкозы в крови.

После нагрузки декстрозой (глюкозой) уровень глюкозы крови в контрольной группе животных увеличился через 15 мин в 2,2 раза в сравнении с исходным уровнем. Через 120 мин гипергликемия снизилась в 1,6 раза, но превышала исходный уровень в 1,4 раза (рис. 2).

По мнению ряда авторов, толерантность к глюкозе приводит к инсулинорезистентности при высоком уровне глюкозы в крови. Хотя на сегодняшний день не выявлен точный механизм, обуславливающий указанные метаболические нарушения [11].

Введение ЭТЛП увеличивало толерантность к глюкозе и, соответственно, уменьшало инсулинорезистентность. Через 15 мин гипергликемия снизилась на 24,9%, через 30 мин — на 29,9%, через 60 мин — на 19,9%, через 120 мин — на 22,7% в сравнении с контрольной группой животных. Аналогичный фармакологический эффект наблюдали после применения «Арфазетина» (см. рис. 2), что подтверждалось уменьшением гипергликемии по сравнению с контрольной группой животных на 15,9; 31,3; 20,4 и 23,5% соответственно.

В группе животных, получавших на фоне нагрузки декстрозой (глюкозой) препарат сравнения метформин, уровень глюкозы через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки уменьшался на 37,8; 46,4; 34,1 и 34,6% соответственно.

Таким образом, ЭТЛП способен положительно влиять на толерантность к глюкозе и, возможно, приводить к уменьшению инсулинорезистентности на фоне глюкозной нагрузки и по этим свойствам не уступает растительному противодиабетическому сбору «Арфазетин». Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования ЭТЛП в дозе 25 мг/кг в комплексной терапии СД 2-го типа в качестве фитопрепарата с гипогликемическими свойствами.

## ВЫВОДЫ

1. Экстракт из травы люцерны посевной после однократного введения в дозе 25 мг/кг проявил более выраженную гипогликемическую активность через 6 ч у здоровых животных, что выражалось в снижении уровня

глюкозы в крови. Его эффект приближался к действию препарата сравнения «Арфазетин».

2. После внутривенного введения декстрозы (глюкозы) в дозе 3 г/кг экстракт из травы люцерны посевной при однократном введении в дозе 25 мг/кг проявлял гипогликемическую активность на протяжении всего эксперимента и статистически значительно снижал концентрацию глюкозы в крови через 15, 30 и 60 мин в сравнении с контролем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 459 с. [Glantz S. Medical and biostatistics. Moscow: Praktika. 1999: 459. (In Russ.)]

2. Ерьоменко Р.Ф. Визначення впливу екстракту з трави люцерни посівної на білковий обмін у системі крові за умов доксорубіцинової гіпопротеїнемії // Медична хімія. — 2012. — Т. 14, №1 (50). — С. 100-103.

3. Ковальов С.В., Ковальова А.М., Ерьоменко Р.Ф. и др. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної // Фармацевтичний часопис. — 2008. — №2 (6). — С. 27-30.

4. Ковальов С.В., Ерьоменко Р.Ф., Малоштан Л.М. Кількісне визначення фенольних сполук у траві люцерни посівної // Фармаком. — 2008. — №4. — С. 35-38.

5. Маньковский Б.Н. Частота выявления новых случаев сахарного диабета 2-го типа и эффективность сахароснижающей терапии у впервые выявленных па-

циентов: результаты исследования DIABETTER // Ліки України. — 2011. — №10 (156). — С. 1419.

6. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н. Микрометоды биохимического и иммуноферментного анализа. — М.: Лабинформ, 1994. — С. 171-174. [Menshikov V.V., Delektorskaya L.N. Micromethods of biochemical tests and enzyme-linked immunosorbent assay. Moscow: Labinform. 1994: 459. (In Russ.)]

7. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. — 1979. — Т. 247, №6. — С. 1513-1516. [Rybolovlev Yu.R., Rybolovlev R.S. Dosages for mammals based on biologic activity constants. Doklady Akademii nauk SSSR. 1979; 247 (6): 1513-1516. (In Russ.)]

8. Офіційні дані МОЗ України, American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes // Diabetes Care. — 2012. — Т. 35. — С. 11-63.

9. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.

10. Черних В.П., Малоштан Л.М., Горбенко Н.І. та ін. Сучасні аспекти пероральної фармакотерапії цукрового діабету 2 типу. Досягнення НФаУ: монографія. — БУ-РУН і К, 2010. — 208 с.

11. Шишкова В.Н. Современный подход к терапии сахарного диабета 2-го типа — влияние на инсулинорезистентность // Фарматека. — 2011. — №3. — С. 42-49. [Shishkova V.N. Current approaches to therapy of type 2 diabetes mellitus — effect on insulin resistance. Farmateka. 2011; 3: 42-49. (In Russ.)]

12. Alberti K.G., Zimmet P., Shaw Y. Metabolic syndrome — a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation // Diabet. Med. — 2006. — Vol. 23, N 5. — P. 469-480.

### Уважаемые читатели!

**С 1 сентября 2014 г. во всех почтовых отделениях связи РФ принимается подписка на 2015 год на «Казанский медицинский журнал».**

Статьи от авторов принимаются только при наличии ксерокопий квитанций о подписке на 2015 год.

#### Подписные индексы журнала:

годовая подписка:

48073 — Агентство Роспечать,

83076 — Почта России;

подписка на полгода: 73205.

Цена подписки на год — 990 рублей, на полугодие — 495 рублей без услуг связи.