

УДК 615.322

DOI: 10.15372/KhUR20150512

Гиполипидемический эффект фитокомпозиций *Gynostemma pentaphyllum* и полисахарида арабиногалактана, полученных методом механохимии

Е. С. ПЕТРОВА^{1,2}, М. В. ХРАПОВА³, Л. П. СУНЦОВА¹, А. В. ДУШКИН¹, Е. И. ВЕРЕЩАГИН⁴, М. И. ДУШКИН²¹Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН, ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

E-mail: ekato9@yandex.ru

²НИИ терапии и профилактической медицины, ул. Бориса Богаткова, 175/1, Новосибирск 630089 (Россия)³НИИ физиологии и фундаментальной медицины, ул. Тимакова, 4, Новосибирск 630117 (Россия)⁴Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Красный проспект, 52, Новосибирск 630091 (Россия)

Аннотация

Методом механохимической активации получены фитокомпозиции на основе гиностеммы пятилистной *Gynostemma pentaphyllum* (ГП) и арабиногалактана (АГ). Добавление АГ в обрабатываемую смесь способствует образованию водорастворимых межмолекулярных комплексов с повышенной биосуваиваемостью биологически активных веществ, а также повышает растворимость фитокомпозиции в воде. Во всех активированных образцах экстрактивность сапонинов из ГП повышается в 3.4–4.7 раза. На модели гиперлипидемии у мышей при однократном внутрибрюшинном введении Полоксамера-407 показано гиполипидемическое действие образцов на основе ГП. Введение композиции ГП/АГ в соотношении 1 : 2 (по массе) привело к снижению уровня холестерина и триглицеридов на 56 и 63 % соответственно. Также на модели высокожировой диеты у крыс подтверждено гиполипидемическое действие исследуемой фитокомпозиции: уровень триглицеридов и холестерина снижался на 46 и 29 % соответственно по сравнению с контрольными животными, получавшими жировую диету.

Ключевые слова: гиностемма пятилистная, механохимическая обработка, гиполипидемический эффект, фитокомпозиция, арабиногалактан

ВВЕДЕНИЕ

Гиностемма пятилистная (*Gynostemma pentaphyllum*) (ГП) – вид травянистых растений из семейства тыквенных, произрастающих в Восточноазиатско-тихоокеанском регионе. В традиционной восточной медицине считается, что напиток из листьев ГП способен замедлять старение, повышать иммунитет и регулировать кровяное давление.

Результаты недавних исследований фармакологических эффектов ГП свидетельствуют

о широком спектре биологического действия ее экстрактов. Показано, что вещества, входящие в состав ГП проявляют противоопухолевую активность [1–3], обладают антидиабетическим [4–6] и гепатопротекторным [7, 8] эффектами, защищают фагоциты и эндотелиальные клетки сосудов в условиях окислительного стресса [9], оказывают антимикробное действие в отношении патогенов, которые продуцируют афлатоксин, фумонизин и приводят к диарее [10], а также рекомендованы при ишемии [11].

Имеются данные, подтверждающие благотворное влияние ГП на уровень липидов (триглицеридов и холестерина) в крови и гепатоцитах [7, 12–14]. В перечисленных работах оценивали гиполипидемический эффект сапониновой фракции (гипенозидов) и экстрактов, полученных с помощью органических растворителей. В нашем исследовании мы использовали ГП в виде сухого сырья, из которого методом механохимической обработки получали композиции с полисахаридом арабиногалактаном (АГ) из лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii*.

Известно, что измельчение растительного сырья, а тем более интенсивная механохимическая обработка, способны повысить скорость экстракции физиологически активных веществ и полноту их извлечения [15]. Однако измельчение недостаточно эффективно при водной экстракции плохо растворимых растительных веществ. Тем не менее именно их экстрактивность определяет физиологическую активность препаратов растительного происхождения, применяемых перорально. Ранее на примере малорастворимых фармацевтических субстанций (ФС) мы показали возможность повышения их растворимости и фармакологической активности за счет образования межмолекулярных/супрамолекулярных комплексов ФС с полисахаридами и растительными гликозидами [16].

В настоящей работе мы применили этот подход для повышения экстрактивности и усиления фармакологического действия экстрактивных веществ ГП. В качестве комплексообразователя к сырью добавляли природный водорастворимый полисахарид АГ, выделен-

ный из древесины лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* по запатентованной технологии [17]. Фитокомпозиции ГП/АГ получены механохимическим путем, причем образование водорастворимых комплексов биологически активных компонентов ГП происходило как в ходе механической обработки, так и при гидратации полученной композиции.

Цель данной работы заключалась в сравнительном изучении экстрактивности и фармакологического действия полученных фитокомпозиций ГП и АГ на модели гиперлипидемии, индуцированной однократным введением Полоксамера-407 у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительным сырьем служила гиностемма пятилистная (*Gynostemma pentaphyllum*) приобретена в Changsha Sunfull Bio-tech Co., Ltd (Чанша, Китай).

Тестируемая фитокомпозиция состояла из высушенных листьев ГП и субстанции АГ (ТУ 9363-021-39094141-08) в различных массовых соотношениях. Для получения композиций смесь исходных компонентов подвергали обработке ударно-стирающими воздействиями в шаровой ротационной/валковой мельнице ВМ-1 в течение 2 ч до достижения размеров частиц исходных компонентов не более 20 мкм, а также образования частиц агрегатов (рис. 1).

Этанольный экстракт ГП получали экстракцией, последующим выпариванием органического компонента и перерастворением экстрагированных веществ в дистиллированной воде. Данный образец ГП использовался в дозировке 250 мг экстракта на 1 кг массы животных.

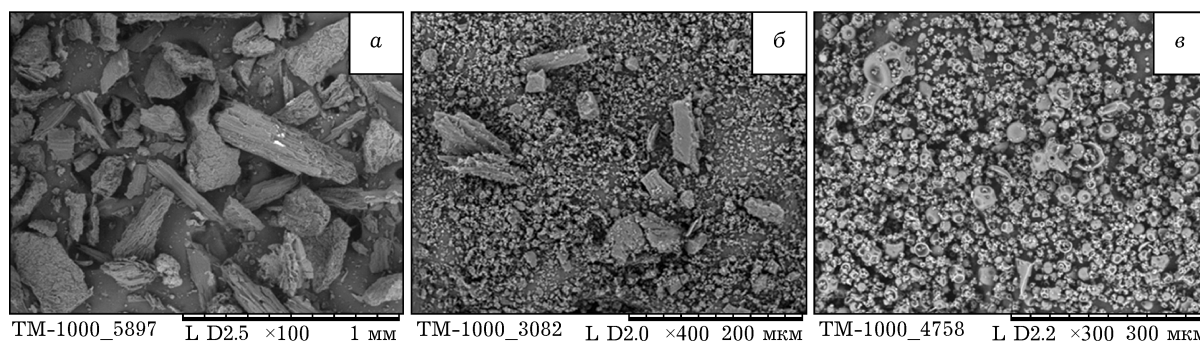


Рис. 1. Электронные микрофотографии образцов: а – ГП, б – ГП/АГ (б), в – АГ.

Экстрактивность сапонинов (гипенозидов) из полученных композиций определяли следующим образом: 0.6 г навески исследуемого материала суспендировали в 5 мл 20 % этанола при 37 °С на магнитной мешалке (400 мин⁻¹) в течение 20 мин. Концентрацию сапонинов в растворе определяли фотометрически: 0.5 мл экстракта смешивали с 1 мл 5 % ванилина в уксусной кислоте и 4 мл 70 % хлорной кислоты, затем смесь выдерживали в термостате при температуре 60 °С в течение 15 мин. Полученные образцы сканировали на спектрофотометре “СПЕКС ССП-700” в диапазоне длин волн 532–536 нм. В качестве калибровочных образцов использовали растворы растительного гликозида сапониона – глицирризиновой кислоты в различных концентрациях.

Исследование проводили на самцах мышей инбредной линии С57/В1 в возрасте 6 недель, массой 25–30 г, полученных в виварии Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск). Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму (стандартная диета “ПроКорм” производства компании “БиоПро”, Новосибирск) и воде. Животных случайным образом разделили на 6 групп по 10 животных в каждой группе. Первой (контрольной) группе в течение 4 сут внутрижелудочно вводили 0.5 мл воды, на 3-и сут внутрибрюшинно – 0.2 мл физиологического раствора. Мышам второй группы в течение 4 сут вводили сухой этанольный экстракт ГП, суспендированный в 0.5 мл дистиллированной воды. Дозировку экстракта брали из расчета 250 мг сухих экстрагированных веществ на 1 кг массы, что соответствовало 3 г ГП на 1 кг массы. Для животных третьей и четвертой групп образцы фитокомпозиций на основе ГП/АГ (1 : 2 и 1 : 4 соответственно) суспендировали в дистиллированной воде и вводили в течение 4 сут в дозировке 3 г ГП на 1 кг массы животного. Мышам пятой группы на протяжении 4 сут вводили суспендированную в воде механически активированную ГП в дозе 3 г/кг массы. Полоксамер-407 (1 г/кг), растворенный в физиологическом растворе, вводили внутрибрюшинно животным 2-й–5-й групп однократно на 3-и сут эксперимента. Шестая группа была интактная. На 5-е сут животных всех групп декапитировали

и получали сыворотку крови центрифугированием (3000g, 15 мин при 4 °С).

Также в работе использовали самцов крыс линии Wistar в возрасте 6 мес., полученных в виварии Института цитологии и генетики СО РАН. Крыс случайным образом разделили на три группы (в каждой группе по шесть животных). Первая группа включала интактных крыс, содержащихся на стандартной диете “ПроКорм” (322 ккал/100 г: белки 19 %, углеводы 60 %, жиры 6 %). Вторая (контрольная) группа в течение 10 недель получала высокожировую диету (443 ккал/100 г: белки 17 %, углеводы 60 %, жиры 16 %) и ежедневные внутрижелудочные введения воды (0.5 мл) в течение последних двух недель. Третья группа содержалась на жировой диете (10 недель) и в течение последних двух недель получала суспендированную в воде фитокомпозицию ГП/АГ (1 : 2, по массе, 3 г ГП на 1 кг массы). После эксперимента длительностью 10 недель животных декапитировали, центрифугированием получали сыворотку крови.

Содержание липидов в крови определяли энзиматическим колориметрическим методом с помощью наборов “ОльвексДиагностикум” (С.-Петербург).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) при помощи программы Statistica (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Считается [18], что основными действующими веществами ГП являются гипенозиды – соединения класса сапонинов. Их гиполипидемическое действие реализуется путем ингибирования активности NF-κB – фактора, регулирующего метаболизм липидов через PPAR-alpha-зависимый путь [19]. Кроме того, гипенозиды активируют ядерные гормональные рецепторы LXR, которые играют важную роль в обмене липидов [20]. Водорастворимость суммы этих гипенозидов неизвестна, но можно предположить, что эти вещества относятся к малорастворимым, так как в промышленности их экстракцию проводят этиловым спиртом [21]. Таким образом, недостаточная степень экстракции может ограничить активность препаратов, полученных из сухого сырья ГП.

Использованный нами подход, заключающийся в механохимическом получении композиций на основе ГП, позволяет исключить стадию экстракции биологически активных веществ и более полно использовать фитотерапевтический потенциал растения. Добавление АГ в обрабатываемую смесь способствует образованию водорастворимых межмолекулярных комплексов с повышенной биоусвояемостью. В основе механохимической обработки смеси твердых компонентов лежат интенсивные механические воздействия (давление и сдвиговые деформации) в шаровой мельнице, осуществляющей ударно-истирающие воздействия. Процесс сопровождается разрушением растительных клеток, что повышает доступность гипенозидов к прямому контакту с растворителем. Механохимическая обработка также приводит к образованию частиц – агрегатов разрушенных растительных клеток и молекул АГ. За счет контакта между остатками клеточных структур, содержащих экстрактивные компоненты, и АГ в процессе механохимической обработки и при гидратации получаемой композиции эффективно образуются водорастворимые комплексы гипенозидов и АГ.

В табл. 1 приведены количественные показатели экстрактивности гипенозидов из образцов, содержащих ГП. Видно, что во всех активированных образцах экстрактивность сапонинов из ГП повышается в 3.4–4.7 раза.

Для исследования гиполипидемического действия образцов на основе ГП использовали модель гиперлипидемии у мышей при од-

ТАБЛИЦА 1

Экстрактивность сапонинов из исходных и механоактивированных (м/а) образцов, содержащих ГП

Вещество/ Композиция	Количество экстрагированных сапонинов*, мг/г ГП	Увеличение экстрактивности**, разы
ГП	144.2	–
ГП, м/а	290.4	2.0
ГП/АГ (1 : 1), м/а	493.0	3.4
ГП/АГ (1 : 2), м/а	541.0	3.7
ГП/АГ (1 : 5), м/а	678.0	4.7

* В пересчете на глицирризиновую кислоту.

** Относительно сырья (ГП).

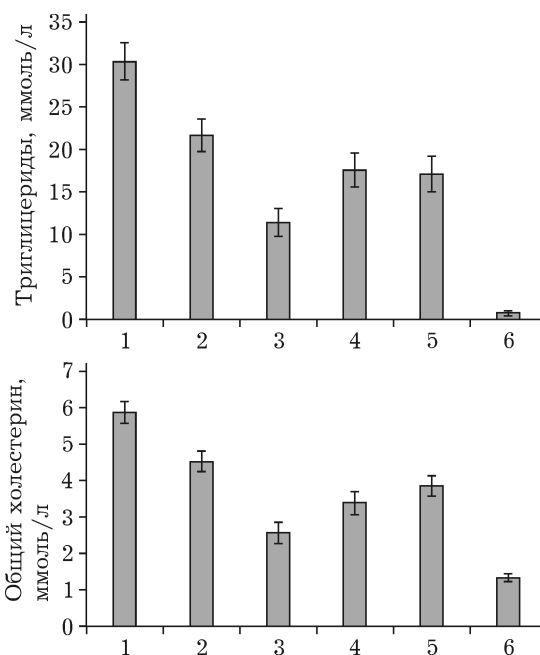


Рис. 2. Гиполипидемический эффект композиций на основе гиностеммы пятилистной: 1 – контроль, 2 – этанольный экстракт, 3 – ГП/АГ (1 : 2), 4 – ГП/АГ (1 : 4), 5 – ГП после механохимической активации, 6 – интактная группа.

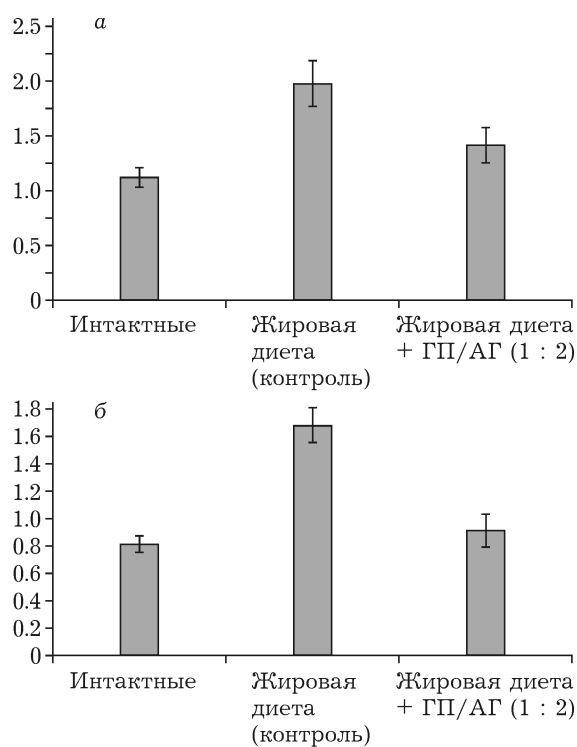


Рис. 3. Гиполипидемическое действие механически активированной композиции ГП/АГ (1 : 2) на уровень общего холестерина (а) и триглицеридов (б) у крыс-самцов линии Wistar.

нократном внутривнутрибрюшинном введении Полиоксамера-407 [22]. Обнаружено, что сухой этанольный экстракт ГП, суспендированный в дистиллированной воде, способствует снижению содержания триглицеридов и общего холестерина на 29 и 23 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 2). Фитокомпозиции ГП и АГ оказывают более выраженное гиполипидемическое действие. Максимальный эффект обнаружен для композиции ГП/АГ в соотношении 1 : 2 (по массе): уровень холестерина и триглицеридов снизился на 56 и 63 % соответственно.

Также нами проведено тестирование образца ГП/АГ (1 : 2) на крысах-самцах линии Wistar, содержащихся на жировой диете в течение 10 недель (рис. 3). Результаты эксперимента также подтвердили гиполипидемическое действие исследуемой фитокомпозиции: уровень триглицеридов и холестерина снижался на 46 и 29 % соответственно по сравнению с контрольными животными, получавшими жировую диету.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы показано, что полученные путем механохимической активации фитокомпозиции ГП/АГ обладают улучшенными характеристиками экстрактивности биологически активных веществ, в частности гипенозидов, по сравнению с исходной и механоактивированной ГП. Полученные фитокомпозиции хорошо растворяются в воде и проявляют ярко выраженный гиполипидемический эффект как на модели гиперлипидемии, так и на фоне высокожировой диеты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Wang Q. F., Chiang C. W., Wu C. C., Cheng C. C., Hsieh S. J., Chen J. C., Hsieh Y. C., Hsu S. L. // *Planta Med.* 2007. Vol. 73. P. 535–544.
- 2 Cheng T. C., Lu J., Wang J., Lin L. J., Kuo H. I., Chen B. H. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. Vol. 59. P. 11319–11329.
- 3 Shi L., Lu F., Zhao H., Zhao Y.-Q. // *J. Asian Natural Prod. Res.* 2012. Vol. 14, No. 9. P. 856–861.
- 4 Yassin K., Huyen V. T., Hoa K. N., Ostenson C. G. // *Int. J. Biomed. Sci.* 2011. Vol. 7, No 2. P. 131–136.
- 5 Huyen V. T. T., Phan D. V., Thang P., Ky P. T., Hoa N. K., Ostenson C. G. // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2012. Vol. 2012. Article ID 452313. 7 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/452313>.
- 6 Huyen V. T. T., Phan D. V., Thang P., Hoa N. K., Ostenson C. G. // *J. Nutrition and Metabolism.* 2013. Vol. 2013. Article ID 765383. 7 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/765383>.
- 7 Muller C., Gardemann A., Keilhoff G., Peter D., Wiswedel I., Schild L. // *Phytomed.* 2012. Vol. 19, Issue 5. P. 395–401.
- 8 Qin R., Zhang J., Li C., Zhang X., Xiong A., Huang F. // *Arch. Pharm. Res.* 2012. Vol. 35, No. 7. P. 1241–1250.
- 9 Li L., Jiao L., Lau B. H. // *Cancer Biotherapy.* 1993. Vol. 8, No. 3. P. 263–272.
- 10 Srichana D., Taengtip R., Kondo S. // *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* 2011. Vol. 42, No 3. P. 704–710.
- 11 Schild L., Cotte T., Keilhoff G., Brodemann R. // *Phytomedicine.* 2012. Vol. 19. P. 812–818.
- 12 Cour B., Molgaard P., Yi Z. // *J. Ethnopharm.* 1995. Vol. 46. P. 125–129.
- 13 Megalli S., Davies N. M., Roufogalis B. D. // *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 9, Issue 3. P. 281–291.
- 14 Zhou L., Xu Y. P., Wei Y., Shi X. P., Liu C. P. // *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2008. Vol. 24, Issue 2. P. 205–208.
- 15 Lomovosky O. I., Lomovsky I. O. // *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry / N. Lebovka, E. Vorobiev, F. Chemat (Eds). CRC Press, 2011. P. 361–398.*
- 16 Dushkin A. V., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Tolstikov G. A. // *The Complex World of Polysaccharides / Dr. D. N. Karunaratne (Ed.) INTECH, 2012. P. 573–602.* URL: <http://dx.doi.org/10.5772/48182>.
- 17 Пат. 2256668 РФ, 2005.
- 18 Megalli S., Aktan F., Davies N. M., Roufogalis B. D. // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2005. Vol. 8, Issue 3. P. 507–515.
- 19 Huang T. H.-W., Li Y., Razmovski-Naumovski V., Tran H., Li G. Q., Duke C. C. // *J. Biomed. Sci.* 2006. Vol. 13. P. 535–548.
- 20 Huang T. H.-W., Razmovski-Naumovski V., Salam N. K., Duke R. K., Tran H., Duke C. C., Roufogalis B. D. // *Biochem. Pharm.* 2005. Vol. 70. P. 1298–1308.
- 21 Lin Y. H., Li C. M., Li X. D., Xiang Y., Zhang Y. Q., Zhang X. C., Liu X. // *Zhong Yao Cai.* 2013. Vol. 36(5). P. 803–806.
- 22 Chaudhary H. R., Brocks D. R. // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2013. Vol. 16(1). P. 65–73.

