

Винахід відноситься до медицини і може бути використаний як дієтичний лікувально-профілактичний засіб.

Одною з патофізіологічних ланок між гіперглікемією та розвитком діабетичних судинних ускладнень є підвищене утворення кисневмісних вільних радикалів [1]. В нормальних умовах вільні радикали швидко елімінуються природними жир- та водорозчинними антиоксидантами. Однак у хворих на цукровий діабет рівень природних антиокислювачів суттєво зменшений, що призводить до патологічного підвищення кількості реактивних радикалів, або так званому "оксидативному стресу" [2]. Оксидативний стрес, який визначають як дисбаланс між утворенням та утилізацією вільних радикалів, при діабеті виникає за рахунок аутоокислення глюкози, неферментативного глікозилювання, послаблення антиоксидантного захисту і посиленого витоку електронів через дихальний ланцюг з-за підвищеного внутрішньоклітинного метаболізму глюкози. В теперішній час його розглядають як універсальний механізм, що об'єднує всі основні біохімічні шляхи токсичного впливу гіперглікемії [3].

Відомо, що для послаблення розвитку діабетичних мікроангіопатій та покращання глікемічного контролю у хворих на цукровий діабет 2 типу застосовують природні та синтетичні антиоксиданти [4]. Крім того, доцільним є використання замінювачів цукру, які не призводять до підвищення рівня глюкози в крові. Одним з таких замінювачів цукру є стевіозид, який виділяють з листя стевії (*Stevia rebaudina* Bertoni). Дуже актуальним є пошук засобів які не тільки обмежують енергетичне надходження до організму з їжею при збереженні її солодкого смаку та органолептичних властивостей, а й одночасно виказують антиоксидантну дію.

Відомим засобом, який широко застосовують для корекції інсулінорезистентних станів, таких як метаболічний синдром, ожиріння, атеросклероз, є метформін. Застосування метформіну сприяє поліпшенню глюкозного та ліпідного профілів без ризику розвитку гіпоглікемії. Це свідчить про можливість його використання як корегуючого препарату при порушеннях ліпідного профілю за умов інсулінорезистентності [5]. Однак серед недоліків метформіну слід відзначити його побічні ефекти, які обумовлені розвитком лактацидозу та шлунково-кишкових розладів [6].

Задача винаходу: створення засобу з лікувально-профілактичними властивостями, який має антиоксидантний та гіполіпідемічний ефекти і може бути використаний як низькокалорійний замісник цукру.

Поставлена задача вирішується тим, що для запобігання патологічних станів, які обумовлені підвищеною продукцією вільних радикалів, використовується засіб з рослинної сировини - фітоконцентрат, який є композицією екстрактів з листя стевії та пелюсток хризантеми у такому співвідношенні компонентів, мас. %:

екстракт з листя стевії	- 14
екстракт з пелюсток хризантеми	- 5-6
вода	- решта.

Стевіозиди, які виділяють з листя стевії, практично нетоксичні. Встановлена на щурах максимальна доза, що не викazuje токсичної дії, складає близько 550мг/кг маси тіла. При екстраполяції дослідних даних на людину припустима добова доза складає 5,5 мг/кг маси тіла або біля 300мг на добу, що еквівалентно 100г цукру. В експерименті на щурах при вивченні гострої токсичності ЛД<sub>50</sub> очищеного препарату (вміст стевіозиду - 40-55%) складала більше 42г/кг маси тіла, а для мишей - 16г/кг маси тіла, що дозволяє віднести його до групи малотоксичних сполук [7].

Технічний результат: розширення арсеналу лікувально-профілактичних засобів для нормалізації ліпідного профілю та запобігання або послаблення тяжкості макросудинних ускладнень у хворих на цукровий діабет.

Для приготування фітоконцентрату брали 70мл 20% екстракту і листя стевії та 30мл 19,5% екстракту з пелюсток хризантеми, вміст сухих речовин був відповідно 14мас. % та 5,89мас. %. Решту складав розчинник - вода.

Оцінка антиоксидантної та гіполіпідемічної дії проведена на 35 самцях кролів породи Шиншила вагою 2,5-3кг. Абсолютну інсулінову недостатність викликали шляхом внутрішньовенної ін'єкції дитизону (35мг на кг маси тіла) [8]. Фітоконцентрат вводили діабетичним кролям перорально по 0,5мл щоденно на протязі 1 місяця. Група контрольних діабетичних тварин отримувала плацебо за аналогічною схемою. В якості препарату порівняння використовували метформін.

Концентрацію холестерину (ХС) і тригліцеридів визначали ферментативним методом за допомогою стандартних наборів «Boeringer-Mannheim» (Німеччина). Інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) характеризували за вмістом дієнових (ДК), триєнових (ТК), тетраєнових (ТетК) та оксиєнових (ОК) кон'югатів в сироватці крові дослідних тварин. Стан антиоксидантної системи оцінювали за ступенем перекисного гемолізу еритроцитів, загальної антиоксидантної активності (ОАО), рівнем глутатіону та активністю каталази [9] в сироватці крові дослідних тварин.

Визначення антиоксидантної активності розчинів фітоконцентрату *in vitro* проводили на моделі окислення ліпопротеїнів яєчного жовтку. Досліджувані розчини додавали до суспензії ліпопротеїнів в початковій концентрації і розведенні в 2, 4, 40 и 400 разів і проводили інкубацію при 37°C. Рівень малонового діальдегіду (МДА) визначали спектрофотометричне, загальну антиоксидантну активність (ОАО) розраховували у відсотках зниження вмісту МДА відносно контрольної групи.

Було визначено, що фітоконцентрат в концентраціях від 100% до 0,25% викazuje супресивний ефект відносно продукції МДА в суспензії ліпопротеїнів яєчного жовтку. При додаванні в середовище інкубації фітоконцентрату в концентрації 2,5% спостерігалася 50% пригнічення процесів ПОЛ (табл.1). Подібний антиоксидантний ефект виказував препарат порівняння - іонол в концентрації 10мкМ.

Таблиця 1

Характеристика антиоксидантної активності фітокопцентрату *in vitro* па моделі окислення ліпопротеїнів яєчного жовтку (AOA, %; n=5)

Концентрація	Досліджувані розчини j
--------------	------------------------

	Фітоконцентрат	Іюнол
100%	82,1 ± 2,3	-
50%	70,1 ± 4,2	-
25%	61,2 ± 4,1	-
2,5 %	48,3 ± 5,2	-
0,25 %	17,2 ± 4,1	-
10мкМ	-	59,9±3,6

Дослідження антиоксидантних властивостей фітоконцентрату проводили також в умовах ферментативного (індукованого нікотинамідадені-ндінуклеотид фосфатом відновленим (НАДФН) та неферментативного (індукованого аскорбатом) ПОЛ, інтенсивність якого характеризували за накопиченням МДА в гомогенатах печінки інтактних щурів на протязі 30 хвилин інкубації з аскорбатом і НАДФН при 37°C. Оцінка двох видів ПОЛ у присутності фітоконцентрату дозволяє зробити більш обґрунтований висновок відносно механізму реалізації його антиоксидантного ефекту. Так, аскорбатзалежне ПОЛ характеризує здатність активації вільнорадикального окислення ліпідів в гомогенатах тканини за участю активних (}юрм кисню, які виникають в результаті неферментативних процесів в системі Fe<sup>2+</sup> - аскорбат і лімітуються наявністю структурних антиоксидантів - «пасток вільних радикалів». В свою чергу інтенсифікація ферментативного ПОЛ обумовлена утворенням радикалів кисню в електрон-транспортних ферментативних ланцюгах, в яких НАДФН виконує роль донатору електронів [10]. В результаті проведених досліджень було встановлено, що застосування фітоконцентрату в первинній концентрації, а також в 2-х і 4-разовому розведенні призводить до достеменного пригнічення як ферментативного, так и неферментативного ПОЛ (табл.2).

Таблиця 2

Вплив фітоконцентрату на інтенсивність НАДФН- і аскорбат - індукованого ПОЛ в гомогенатах печінки інтактних щурів (X±Sx, n=5)

Досліджуваний розчин	Концентрація	Накопичення МДА, ммоль/г ткани і	
		НАДФН-індуковане ПОЛ	аскорбат- індуковане   ПОЛ
Контроль	-	4,69±0,20	4,12±0,14
Фітоконцентрат	100%	2,12±0,15 P <sub>1</sub> <0,001	2,84±0,21 P <sub>1</sub> <0,001
Фітоконцентрат	50%	2,25±0,21 P <sub>1</sub> <0,001	2,41±0,13 P <sub>1</sub> <0,001
Фітоконцентрат	25%	2,50±0,31 P <sub>1</sub> <0,001	2,56±0,13 P <sub>1</sub> <0,001
Іюнол	20 мкмоль/л	0,81±0,03 P <sub>1</sub> <0,001	0,23±0,01 P <sub>1</sub> <0,001 і

Примітка. P<sub>1</sub> - вірогідність відхилення відносно контролю

У тварин, що отримували фітоконцентрат, відмічалось суттєве зниження концентрації первинних продуктів ПОЛ у порівнянні з діабетичним контролем (табл.3). При цьому пригнічення інтенсивності ПОЛ супроводжувалося активацією антиоксидантної системи, про що свідчило зменшення удвічі перекисного гемолізу еритроцитів, підвищення концентрації відновленого глутатіону та загальної антиоксидантної активності в сироватці крові діабетичних тварин (табл.4).

Таблиця 3

Вплив фітоконцентрату на концентрацію первинних продуктів ПОЛ в сироватці крові кролів з дитизоновим діабетом, (X±Sx), n=5

Група	Дієнові кон'югати, ммоль/л	Триєнові кон'югати, ммоль/л	Тетраєнові кон'югати, Е/л	Оксидієнові , кон'югати, j ммоль/л '
Інтактний контроль	0,13±0,06	0,97±0,18	0,17±0,01	0,50±0,07
Діабет + плацебо	0,66±0,08 P <sub>1</sub> <0,01	1,05±0,13 P <sub>1</sub> >0,05	0,29±0,02 P <sub>1</sub> <0,05	0,73±0,17 P <sub>1</sub> >0,05
Діабет+фітоконцентрат	0,17±0,06 P <sub>1</sub> >0,05 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> <0,02	0,62±0,06 P <sub>1</sub> >0,05 P <sub>2</sub> <0,02 P <sub>3</sub> >0,05	0,10±0,01 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,02 P <sub>3</sub> <0,02	0,31±0,03 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> <0,02
Діабет+метформін	0,47±0,06 P <sub>1</sub> <0,01 P <sub>2</sub> >0,05	0,75±0,07 P <sub>1</sub> >0,05 P <sub>2</sub> <0,02	0,32±0,07 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,02	0,72±0,11 P <sub>1</sub> >0,05 P <sub>2</sub> >0,05 ,

Примітка:

P<sub>1</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "інтактний контроль";

P<sub>2</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "діабет + плацебо";

P<sub>3</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "діабет + метформін".

Таблиця 4

Вплив фітоконцентрату на показники антиоксидантної системи захисту в сироватці крові кролів с дитизоновим діабетом, ( $\bar{X} \pm S_x$ ), n=5

Група	Перекислий гемоліз еритроцитів, %	Активність катал ази, мкат/л	Відновлений глутатіон, ммоль/л	Загальна антиоксидантна активність, %
Інтактний контроль	3,03±0,25	20,48±0,37	2,05±0,24	57,03±6,13
Діабет + плацебо	16,68±2,89 P <sub>1</sub> <0,001	23,28±0,56 P <sub>1</sub> <0,01	1,12±0,16 P <sub>1</sub> <0,05	26,30±3,35 P <sub>1</sub> <0,001
Діабет + фітоконцентрат	8,32±0,48 P <sub>1</sub> <0,001 P <sub>2</sub> <0,001 P <sub>3</sub> >0,05	18,37±0,76 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,01 P <sub>3</sub> <0,05	2,09±0,32 P <sub>1</sub> >0,05 P <sub>3</sub> <0,05	36,60±2,87 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> >0,05
Діабет + ме-тформін	9,86±1,32 P <sub>1</sub> <0,001 P <sub>2</sub> <0,001	14,05±0,25 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,001	1,06±0,08 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> >0,05	29,30±4,35 P <sub>1</sub> <0,01 P <sub>2</sub> >0,05

Примітка:

P<sub>1</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "інтактний контроль";

P<sub>2</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "діабет + плацебо";

P<sub>3</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "діабет + метформін".

В умовах інсулінової недостатності також відмічається знижене пригнічення активності гормончутливої ліпази, що в свою чергу призводить до підвищення гідролізу тригліцеридів в жировій тканині та накопиченню неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) в печінці. Збільшення вмісту НЕЖК є основним стимулом для продукції атерогенних ліпопротеїнів високої щільності. Виразний антиоксидантний ефект фітоконцентрату у діабетичних тварин супроводжується значним покращанням ліпідного обміну, про що свідчить зниження концентрації НЕЖК, тригліцеридів та загального холестерину (табл. 5).

Таблиця 5

Вплив фітоконцентрату на показники ліпідного обміну у кролів с дитизо-новим діабетом, ( $\bar{X} \pm S_x$ ), n=5

Група	НЕЖК, ммоль/л	Тригліцериди, ммоль/л	Загальний холестерин, ммоль/л
Інтактний контроль	0,42±0,03	0,62±0,15	1,33±0,11
Діабет+плацебо	1,45±0,05 P <sub>1</sub> <0,001	5,31±0,79 P <sub>1</sub> <0,001	2,04±0,05 P <sub>1</sub> <0,001
Діабет+фітоконцентрат	0,85±0,05 P <sub>1</sub> <0,001 P <sub>2</sub> <0,001 P <sub>3</sub> <0,05	1,62±0,26 P <sub>1</sub> <0,001 P <sub>2</sub> <0,001 P <sub>3</sub> <0,05	1,61±0,09 P <sub>2</sub> <0,01 P <sub>3</sub> <0,05
Діабет+метформін	0,71±0,02 P <sub>1</sub> <0,001 P <sub>2</sub> <0,001	1,31±0,21 P <sub>1</sub> <0,001 P <sub>2</sub> <0,001	1,68±0,06 P <sub>1</sub> >0,05 P <sub>2</sub> <0,01

Примітка:

P<sub>1</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "інтактний контроль";

P<sub>2</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "діабет+плацебо";

P<sub>3</sub> - вірогідність відхилення відносно групи "діабет+метформін".

Антиоксидантна дія фітоконцентрату та його вплив на ліпідний обмін за більшістю показниками був подібним до препарату порівняння метформіну (табл.3, 4, 5).

Таким чином, виразні антиоксидантні та гіполіпемічні властивості фітоконцентрату обґрунтовують перспективність використання його для покращання ліпідного профілю та профілактики або послаблення макросудинних ускладнень у хворих на цукровий діабет.

#### ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Porte D., Schwartz M. Diabetes complications: why is glucose potentially toxic? // Science. -1996. - Vol.272. - P.699-700.
2. Baynes J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes // Diabetes. -1991. - Vol. 40. - P.405-412.
3. Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic

complications // *Kidney Int.* - 2000. - Vol.58 (Suppl. 77). - P.S26-S30.

4. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation // *Metabolism.* - 2000. - Vol.49, №2 (Suppl 1). - P.27-29.

5. Davidson VD, Peters AL 1997 An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 102:99-110.

6. Cusi K, Consoli F, DeFronzo RA 1996 Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4059-4067.

7. Metis M. S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects // *J. Ethnopharmacology.* - 1995. - Vol.28, N 3. - P.129-134.

8. Okamoto H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes // *Molec. Cell. Biochem.* - 1981. - Vol.3. - P.43-61.

9. Королук А., Иванова Л., Майорова И. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* - 1988. - №1. - С.16.

10. Беленичев И. Ф., Мазур И. А., Коваленко С. И. Комплексная оценка антиоксидантной активности *in vitro* производных (3,4-дигидрохинолон-4-ил-3)-а; b-карбоновых кислот // *Фармаком.* - 1995. - №5, 6. - С.40-44