

Применение растительных экстрактов для коррекции нарушений метаболических процессов

Толстикова Т.Г.*, Киселёва Д.А., Аньков С.В., Жукова Н.А.

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

* tg_tolstikova@mail.ru

Ключевые слова: фитотерапия; левзея; урсоловая кислота; экдистен; коррекция; мыши; крысы; метаболический процесс

Мотивация и цель: Фитотерапия, являясь методологической основой восстановительной медицины, применяется для профилактики и лечения нарушений обмена веществ, повышения сопротивляемости организма к различным стрессовым условиям (обеспечивая тем самым развитие адаптации и гомеостаз организма) [1]. Биологическая активность лекарственных растений и растительных экстрактов объясняется наличием в их составе вторичных метаболитов (полифенолов, тритерпенов, флавоноидов, гликозидов и т. д.) [2, 3]. Современные исследования доказали высокую эффективность комплексов биологически активных веществ растений (в том числе в виде экстрактов) для коррекции нарушений метаболических процессов, в том числе физического и биологического характера. Кроме того, разработка комплексных растительных композиций может обеспечить наличие синергических эффектов у конечного продукта и более широкий спектр проявляемых фармакологических свойств. Перспективными в этом плане остаются малоизученные аспекты сочетанности действия двух вторичных метаболитов: пентациклических тритерпеноидов (урсоловой кислоты) и фитоэкдистероидов (экдистена). В связи с чем, основной целью исследования было изучение влияния композиции на основе экстрактов левзеи и клюквы, содержащих экдистен и урсоловую кислоту соответственно, на метаболические процессы.

Методы и алгоритмы: Работа выполнена на 100 мышах линии C57BL/6J (70 самцах и 30 самках), 424 аутбредных мышах CD-1 (272 самцах и 152 самках), 14 самцах мышей линии C57BL/6^{Ay}, 80 крысах сток Вистар (24 самцах и 56 самках), полученных из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН. Содержание животных и дизайн экспериментального исследования были одобрены этическим комитетом НИОХ СО РАН (протокол от 28.08.2021; № 38 от 15.12.2021; № 150 от 13.05.2022; № 431 от 18.05.2023). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с законодательством РФ, Решением «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 № 81 и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 о защите животных, используемых в научных целях. Исследуемые соединения: метилтретбутилового эфира экстракт шрота клюквы, содержащий 40 % урсоловой кислоты, стандартизированный по урсоловой кислоте (Инжиниринговый центр НИОХ СО РАН, г. Новосибирск); водно-спиртовой экстракт корней левзеи сафлоровидной, содержащий 0.31 % экдистена, стандартизированный по экдистену (20-гидроксиэкдизону) («ООО

Экстракты Алтая», г. Барнаул); композиция экстрактов левзеи (0.31 % экдистена) и шрота клюквы (40 % урсоловой кислоты); экдистен, 98 % чистоты (Токуо Chemical Industry Co., LTD, Japan); урсоловая кислота, 92 % чистоты (Инжиниринговый центр НИОХ СО РАН, г. Новосибирск). Скрининг гипогликемической активности композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозах 170:50, 35:250, 70:500 мг/кг при длительном введении (4 недели) как без, так и на фоне физической нагрузки (тест «бег на тредмиле», «принудительное плавание») проводили по показателям динамики массы тела, уровня глюкозы крови, глюкозотолерантного теста [4, 5]. Изучение наличия адаптогенных свойств у подобранного эффективного соотношения композиции (70:500 мг/кг) оценивали в тесте «принудительное плавание». Исследование наличия у композиции анаболической активности проводили на модели изолированной перегрузки скелетной мышцы голени крыс с операцией тенотомии [6]. Влияние композиции в дозе 70:500 мг/кг на уровень тестостерона крови проводили с помощью ИФА анализа. Безопасность и переносимость длительного введения композиции в дозе 70:500 мг/кг и ее отдельных компонентов проводили согласно Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [7]. Влияние композиции в дозе 70:500 мг/кг на показатели липидного, углеводного обмена на фоне патологии изучали на диет-индуцированной модели сахарного диабета II типа [8], генетической модели сахарного диабета II типа [9].

Результаты: На основании скрининга выявлено, что композиция экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозе 70:500 мг/кг (210 мкг/кг экдистена и 200 мг/кг урсоловой кислоты соответственно) оказывает положительное влияние на показатели углеводного обмена, а именно проявляла гипогликемический эффект на фоне глюкозной нагрузки как без, так и на фоне физической нагрузки. Разработанная композиция в дозе 70:500 мг/кг проявляла аналогичные со смесью индивидуальных действующих веществ фармакологические эффекты в отношении показателей углеводного, белкового, липидного обмена на фоне физической нагрузки (тест «принудительное плавание»), а именно: было отмечено значимое ($p < 0,05$) снижение концентрации глюкозы, лактата, креатинкиназы, холестерина, липопротеинов высокой плотности, увеличение концентрации общего белка, что может являться показателями развития реакций адаптации организма [10]. На модели изолированной перегрузки скелетной мышцы голени крыс композиция в дозе 70:500 мг/кг проявляла анаболический эффект у крыс обоих полов. Полученные значения процента прироста мышцы *m. soleus* на фоне введения композиции коррелировали с показателями смеси индивидуальных действующих веществ, что подтверждает их роль в проявлении композицией анаболического эффекта. При однократном введении композиции в дозе 70:500 мг/кг, экстракта шрота клюквы в дозе 500 мг/кг происходило достоверное увеличение уровня тестостерона у самцов мышей CD-1. В то время как на фоне однократного введения экстракта левзеи в дозе 70 мг/кг не происходило статистически значимого изменения уровня тестостерона. При оценке безопасности и переносимости длительного введения композиции не наблюдалось визуальных признаков интоксикации, гибели животных, токсических эффектов в отношении внутренних органов, биохимических показателей крови. Кроме того, введение композиции в дозе 70:500 мг/кг на фоне нарушенной толерантности к глюкозе (диет-индуцированная модель сахарного диабета II типа, генетической модели сахарного диабета II типа) не усугубляло развитие патологических

процессов в органах-мишенях (печень, поджелудочная железа), оказывало положительное влияние на показатели липидного обмена и способствовало уменьшению размеров адипоцитов белой и бурой жировой ткани, предотвращая развитие гипертрофического ожирения.

Выводы: Композиция экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозе 70:500 мг/кг обладает адаптогенными свойствами на фоне физической нагрузки и выраженной анаболической активностью, сопоставимой с активностью смеси действующих веществ – экдистена и урсоловой кислоты. На фоне однократного введения композиции увеличение уровня тестостерона обусловлено наличием в составе композиции экстракта шрота клюквы. Длительное введение композиции не оказывает токсического влияния на организм экспериментальных животных. На фоне врожденной и приобретенной патологии композиция оказывает положительное влияние на показатели липидного обмена и перераспределение жировой ткани.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках базовых проектов ФНИ НИОХ СО РАН (№ 122040400038-4).

Plant extracts application for correction disorders of metabolic processes

Tolstikova T.G.*, Kiseleva D.A., An'kov S.V., Zhukova N.A.

Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* tg_tolstikova@mail.ru

Key words: phytotherapy; leuzea; ursolic acid; ecdystene; correction; mice; rats; metabolic process

Motivation and Aim: Phytotherapy, being the methodological basis of regenerative medicine, is used for the prevention and treatment of metabolic disorders, increasing the body's resistance to various stressful conditions (thus providing adaptation and body homeostasis) [1]. The biological activity of medicinal plants and plant extracts is explained by the presence of secondary metabolites (polyphenols, triterpenes, flavonoids, glycosides, etc.) [2, 3]. Modern research has proven high efficiency of plant complexes in the form of extracts for correction of metabolic processes disorders, including physical and biological nature. In addition, the complex herbal compositions development may provide synergistic effects in the final product and a wider range of pharmacological properties exhibited. The poorly studied aspects of the combined action of two secondary metabolites: pentacyclic triterpenoids (ursolic acid) and phytoecdysteroids (ecdystene) remain promising. Therefore, the main aim of the study was to investigate the effect of leuzea and cranberry extracts composition, containing ecdystene and ursolic acid, respectively, on metabolic processes.

Methods and Algorithms: The experiments were performed on 100 C57BL/6J mice of both sexes (70 males and 30 females), 424 CD-1 mice of both sexes (272 males and 152 females), 14 male C57BL/6^{Ay} mice and 80 stock Wistar rats (24 males and 56 females). Animals were obtained from the vivarium of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. The protocol of the animal experiment was approved by the Ethics Committee of N.N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS (protocol of 28.08.2021; No. 38 of 15.12.2021; No. 150 of 13.05.2022; No. 431 of 18.05.2023). All manipulations with animals were conducted in strict accordance with the laws and

regulations of the Russian Federation, the Decision "On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice of the Eurasian Economic Union in the field of circulation of medicines" No. 81 of 3 November 2016, and the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Materials: methyl tert-butyl ether cranberry meal extract containing 40 % ursolic acid, standardized for ursolic acid (Engineering Center of NIOCH SB RAS, Novosibirsk); aqueous-alcoholic radix leuzea extract containing 0.31 % ecdystene, standardized by 20-hydroxyecdysone (Altai Extracts Ltd., Barnaul); composition of leuzea (0.31 % ecdystene) and cranberry meal (40 % ursolic acid) extracts; ecdystene, 98 % purity (Tokyo Chemical Industry Co., LTD, Japan); ursolic acid, 92 % purity (Engineering Center of NIOCH SB RAS, Novosibirsk). Hypoglycemic activity screening of the composition of leuzea and cranberry meal extracts in doses of 170:50, 35:250, 70:500 mg/kg at long-term administration (4 weeks) with and without physical load ("treadmill test", "forced swim test" (FST)) was carried out according to the body weight dynamics, blood glucose level, glucose tolerance test [4, 5]. The adaptogenic properties in the selected composition (70:500 mg/kg) was evaluated in the FST. The anabolic activity of the composition was investigated on a model of isolated overload of the rat skeletal muscle with tenotomy operation [6]. The effect of the composition at a dose of 70:500 mg/kg on the blood testosterone level was carried out by ELISA analysis. Safety and tolerability of long-term administration of the composition and its individual components were carried out according to the Guidelines for experimental preclinical studies of new pharmacological substances [7]. The effect of the composition at a dose of 70:500 mg/kg on lipid and carbohydrate metabolism of experimental animals was studied on a diet-induced model of type II diabetes mellitus [8], genetic model of type II diabetes mellitus [9].

Results: According to the screening results, the composition of leuzea and cranberry meal extracts at a dose of 70:500 mg/kg (210 µg/kg ecdystene and 200 mg/kg ursolic acid respectively) has a positive effect on carbohydrate metabolism parameters (showed hypoglycemic effect on the background of glucose load, with and without physical load). The developed composition at a dose of 70:500 mg/kg showed similar pharmacological effects to the individual active substances in terms of carbohydrate, protein, lipid metabolism in the FST, namely: there was a significant ($III < 0.05$) decrease of glucose, lactate, creatine kinase, cholesterol, high-density lipoproteins concentration, an increase in total protein concentration, which may be indicators of the development of the organism adaptation reactions [10]. On a model of isolated overload of the rat skeletal muscle, the composition at a dose of 70:500 mg/kg showed anabolic effect in animals of both sexes. The obtained values of *m. soleus* muscle growth at administration of the composition correlated with the indices of individual active substances mixture, which confirms their role in the manifestation of anabolic effect by the composition. A single administration of the composition at a dose of 70:500 mg/kg and cranberry meal extract at a dose of 500 mg/kg resulted in a significant increase in testosterone levels CD-1 male mice. However, there was no statistically significant change in testosterone levels after a single injection of leuzea extract at a dose of 70 mg/kg. When assessing the safety and tolerability of long-term administration of the composition, no visual signs of intoxication, animals died, toxic effects to internal organs, blood biochemical indices were observed. In addition, administration of the composition at a dose of 70:500 mg/kg at impaired glucose tolerance (diet-induced model of type II diabetes mellitus, genetic model of type II diabetes mellitus) did not worsen the course of pathological processes

in target organs (liver, pancreas), had a positive effect on lipid metabolism parameters and promoted the reduction of white and brown fat adipocytes size, preventing the development of hypertrophic obesity.

Conclusion: The composition of leuzea and cranberry meal extracts at a dose of 70:500 mg/kg has adaptogenic properties and pronounced anabolic activity, comparable to the activity of active substances – ecdystene and ursolic acid. The increase in testosterone level at a single administration of the composition is due to the presence of cranberry meal extract in the composition. Long-term administration of the composition has no toxic effect on the organism of experimental animals. The composition has a positive effect on lipid metabolism indicators and redistribution of adipose tissue against the background of pathological changes.

Funding: The study was carried out within the framework of basic projects of FSR NIOCH SB RAS (No. 122040400038-4).

Список литературы/References

1. Colalto C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytother Res.* 2018;32(3):413-425. doi 10.1002/ptr.5977
2. Bujor O.C., Tanase C., Popa M.E. Phenolic Antioxidants in Aerial Parts of Wild Vaccinium Species: Towards Pharmaceutical and Biological Properties. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(12):649. doi 10.3390/antiox8120649
3. Majhi S. Discovery, Development and Design of Anthocyanins-Inspired Anticancer Agents: A Comprehensive Review. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022;22(19):3219-3238. doi 10.2174/1871520621666211015142310
4. Odriozola C.P. et al. Reliability of blood lactate as a measure of exercise intensity in different strains of mice during forced treadmill running. *PLoS One.* 2019;14(5):e0215584. doi 10.1371/journal.pone.0215584
5. Ковалева М.А. и др. Применение теста «принудительное плавание» при проведении доклинических исследований. *Международный вестник ветеринарии.* 2015;4:90-95 [Kovaleva M.A. et al. Application of «forced swimming» test for preclinical trials. *International bulletin of veterinary medicine.* 2015;4:90-95 (in Russian)]
6. Гаджиева Д.М. и др. Сравнительное изучение анаболизирующей активности апилака и метандростенолона на модели изолированной перегрузки скелетной мышцы голени крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2002;65(1):56-57 [Gadzhieva D.M. et al. Comparative study of anabolizing activity of apilac and methandrostenolone on a model of isolated overload of the rat skeletal muscle. *Eksp Klin Farmakol.* 2002;65(1):56-57 (in Russian)]
7. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012 [Mironov A.N., Bunatyan N.D. Manual for conducting preclinical studies of medicinal products. Part one. Moscow: Grif and K., 2012 (in Russian)]
8. Surwit R.S. et al. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes.* 1988;37(9):1163-1167. doi 10.2337/diab.37.9.1163
9. Derkach K.V. et al. Metabolic parameters and functional state of hypothalamic signaling systems in AY/a mice with genetic predisposition to obesity and the effect of metformin. *Dokl Biochem Biophys.* 2017;477(1):377-381. doi 10.1134/S1607672917060096
10. Mul J.D. et al. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;135:17. doi 10.1016/bs.pmbts.2015.07.020