

VAISTINIŲ AUGALŲ PAIEŠKA CUKRINIO DIABETO PREVENCIJAI

Aušra Adomėnienė^{1,2}, Rita Kazernavičiūtė², Petras Rimantas Venskutonis²

¹Kauno kolegijos Medicinos fakultetas, ²Kauno technologijos universiteto
Cheminės technologijos fakultetas

Raktažodžiai: α -gliukozidazės inhibitoriai, hiperglikemija, substratas.

Santrauka

Viena iš pagrindinių priežasčių, susijusių su metabolinėmis ligomis – padidėjęs gliukozės kiekis kraujyje. Sveikatai pavojingiausia lėtinė hiperglikemija, kuri pradiniais raidos etapais būna besimptomė, tačiau per keletus metus gali sukelti daugelio organų ir jų sistemų ilgalaikius pažeidimus. Šiame tyrime atkreiptinas dėmesys į vaistinių augalų, galinčių slopinti α -gliukozidazės fermentą, paiešką. Tyrimams pasirinktos dvi Dioskorėjos (*Dioscorea spp.*) rūšys: kaukazinė dioskorėja (*Dioscorea caucasica* Lipsky) ir niponinė dioskorėja (*Dioscorea nipponica* Makino), auginamos Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių augalų kolekcijoje. Tikslas – nustatyti *in vitro* Dioskorėjos lapų ir šaknų ekstraktų slopinimo savybes α -gliukozidazės fermentui bei įvertinti antioksidacines savybes. Tyrimo metu nustatyta, kad kaukazinių ir niponinių dioskorėjų lapų ekstraktai (200 μ g/ml) > 50 % slopino α -gliukozidazės fermentą, šaknų ekstraktai (200 μ g/ml) pastarąjį fermentą slopino silpnai: 20,28 % kaukazinės ir 17,87 % niponinės dioskorėjos ekstraktai. Įvertintos dioskorėjos lapų ekstraktų antioksidacinės savybės, taikant kelis matavimo metodus: DPPH[•] ir ABTS^{•+} modelinėse sistemose. Pastebėta, kad tirti augaliniai ekstraktai yra gana stiprūs antioksidantai ir pakankamai efektyviai slopina hidralazijų šeimos fermentą α -gliukozidazę, todėl tokie ekstraktai galėtų būti vartojami hiperglikemijos prevencijai, o taip pat ir kaip natūralūs antioksidantai.

Įvadas

Lietuvoje, kaip ir daugelyje Europos šalių, didėja įvairaus amžiaus grupių gyventojų sergamumas cukriniu diabetu (CD). Pagal Tarptautinės diabeto federacijos (TDF) duomenis, 2011 metais pasaulyje cukriniu diabetu sirgo apie 366 mln. žmonių [3], o 2013 metais jau apie 382 milijonus [4]. Numatoma, kad 2030 metais cukriniu diabetu sirgs apie

552 mln. žmonių [13]. Ligos atsiradimui didelės įtakos turi padidėjusi gliukozės koncentracija kraujyje (angl. *hyperglycemia*), kuri pasaulyje pripažinta kaip vienas iš reikšmingiausių cukrinio diabeto rizikos veiksnių. Gliukozės apykaitos sutrikimas žmogaus organizme dažniausiai siejamas su angliavandenių įsisavinimo žarnyne sutrikimu, kuriam didelę įtaką turi padidėjusi fermento α -gliukozidazės ekspresija. Šis fermentas atlieka lemiamą vaidmenį biocheminiuose procesuose, skaidydamas polisacharidus į monosacharidus, kurie vėliau absorbuojami į kraują. Siekiant slopinti cukrinio diabeto vystymąsi, pagrindinis dėmesys skiriamas α -gliukozidazės inhibitoriams (AGI). Pastarieji, slopindami α -gliukozidazės fermentą proksimalinėje plonojo žarnyno epitelinio šepetinio sluoksnio dalyje, lėtina angliavandenių įsisavinimą ir sumažina gliukozės kiekio koncentraciją kraujyje po valgio [5]. Gerai žinoma, kad AGI, kaip ir kiti vaistai, gali sukelti šalutinį poveikį (dujų susikaupimą žarnyne, diskomfortą pilve, viduriavimą) [5], todėl greta efektyvių sintetinių vaistų, mažinančių gliukozės kiekį kraujyje, pastaruoju metu ieškoma augalinės kilmės α -gliukozidazės inhibitorių. Kasmet publikuojama vis daugiau straipsnių apie Europos šalyse mažiau žinomų augalų rūšių taikymą medicinoje. Šis tyrimas skirtas dviem Dioskorėjinų (*Dioscoreaceae*) šeimos genties rūšims – kaukazinei dioskorėjai (*Dioscorea caucasica* Lipsky) ir niponinei dioskorėjai (*Dioscorea nipponica* Makino sin. *Dioscorea polystachya* Turcs), kurios auginamos Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių augalų kolekcijoje.

Dioskorėjos (*Dioscorea spp.*) – daugiametės, dvinamės, neryškiais žiedais iki keturių metrų aukščio užaugančios laipiojančios lianos, plačiai paplitusios tropinėse ir subtropinėse klimato juostose, tačiau nemažai dioskorėjos rūšių aptinkama ir vidutinio klimato juostoje. Lietuvoje savaimė dioskorėjos neauga. Sistemškai *Dioscorea* gentis priskiriama Magnoliophyta – Magnolijūnų (gaubtasėklių) skyriui, *Magnoliopsida* – Magdolijainių (dviskilčių) klasei, *Dioscoreales* – dioskorėliečių eilei, *Dioscoreaceae* – dioskorėjinų šeimai [6]. Šiai šeimai priskiriama daug augalų rūšių, kurie sintetina skirtingus biologiškai veiklius junginius ir yra taikomi

medicinos, maisto ir kitų produktų gamybos tikslais. Verta paminėti, kad kaukazinė dioskorėja (*D. caucasica* Lipsky) laikoma tretinio laikotarpio endeminiu reliktu. Šios rūšies buveinė Šiaurės Kaukaze užima labai mažus plotus, išilgai besidriekiančius Juodosios jūros pakrante nuo Mzymta upės iki upės Kodor [7]. Žinoma, kad šios dvi rūšys ir jų augalų dalys pritaikomos medicinos ir sveikatos stiprinimo praktikoje. Išskirtas steroidinis sapogeninas – diosgeninas, naudojamas farmacijos pramonėje kaip pirmtakas (prekursorius) steroidinių vaistų sintezėje [11]. Šiose rūšyse vyraujantys saponinai: dioscinas (*D. nipponica*, *D. caucasica*), gracilinas, protogracilinas, protodioscinas; fenolinės rūgštys: piscido rūgštis (*D. nipponica*) fenoliniai junginiai, amino rūgštys [8,11,12] padeda stiprinti imuninę sistemą, atitolindamos lėtinių neinfekcinių ligų vystymąsi.

Darbo tikslas – ištirti kaukazinės ir niponinės dioskorėjos lapų ir šaknų ekstraktų gebą slopinti α -gliukozidazės fermentą bei antioksidacines savybes.

Tyrimo objektas ir metodai

Tyrimams pasirinkta kaukazinė ir niponinė dioskorėja. Tirti dioskorėjų lapų ėminiai surinkti žydėjimo pradžioje, šaknys iškastos vegetacijos laikotarpiu. Išdžiovinti susmulkinti (IKA A11 Basic, Vokietija) mėginiai ekstrahuojami maceruojant 70% (v/v) etanolyje kambario temperatūroje, santykiu 1:10. Gautas tirpalas filtruojamas, tirpiklis (etanolis) išgarinamas rotaciniame garintuve 40 °C temperatūroje, o vanduo pašalinamas liofilizuojant. Gautas liofilizuotas sausas ekstraktas tyrimams naudotas kaip natūralus α -gliukozidazės fermento inhibitorius. Alfa gliukozidazės veikimo mechanizmas ir inhibitoriaus įtaka fermentui parodyta 1 paveiksle.

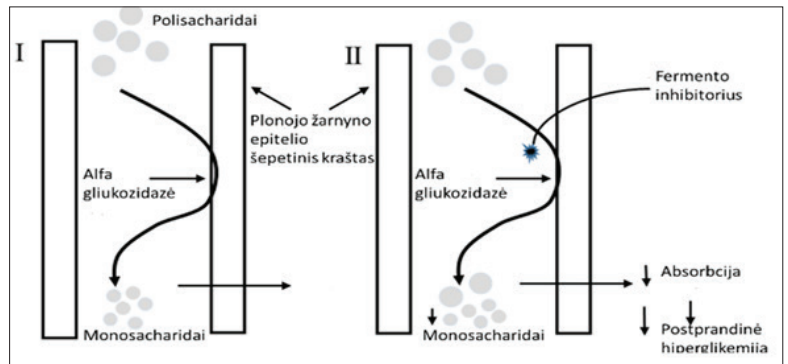
Dioskorėjos ekstraktų slopinamosios savybės α -gliukozidazės fermentui atlikto chromogeniniu analizės metodu, naudojant p-nitrophenyl- α -D-gliukopiranozidą (pNPG) kaip substratą. Spektrofotometriniai matavimai (Genesys 8, Thermo Spectronic, Rochester, NY) atlikti 0,1 M kalio fosfato buferiniame tirpale (pH 6,8 ± 0.01) 1 cm storio vienkartinėje kiuvetėje, esant 10 μ L augalinio ekstrakto, 65 μ L pNPG, 5 μ L α -gliukozidazės fermento. Tiriamųjų tirpalų reakcijos pradėtos įpilant α -gliukozidazės fermento tirpalą. Produkto susidarymas (pNPG + α -gliukozidazė → α -D-gliukozė + pNPG) buvo stebimas po 30 min, esant 405 nm bangų ilgiui. Fermentinė reak-

cija buvo vykdoma 37 ± 2 °C temperatūroje. Kontrolinis tirpalas buvo identiškas tiriamajam, tik vietoje inhibitoriaus tirpalo naudotas 0,1 M kalio fosfato buferinis tirpalas (pH 6.8±0.01). Fermento α -gliukozidazės aktyvumo sumažėjimas procentais apskaičiuojamas pagal formulę: aktyvumo sumažėjimas (%) = $[A_{405\text{kontr.}} - A_{405\text{mėg.}} / A_{405\text{kontr.}}] \times 100$, kurioje:

Akontr. – kontrolinio tirpalo šviesos sugertis;

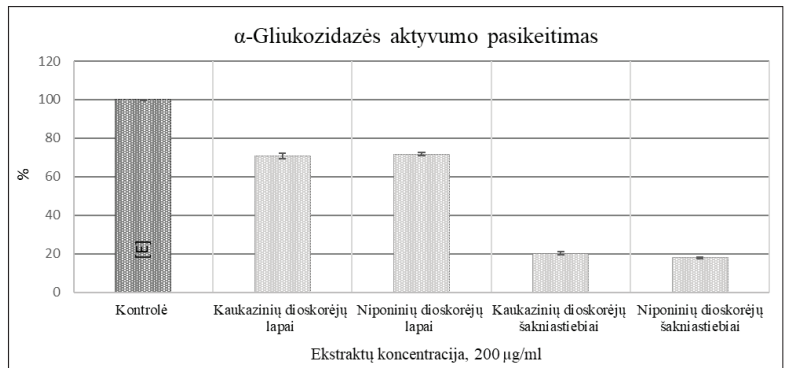
Amėg. – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

Dioskorėjos ekstraktų geba sujungti laisvuosius radikalus nustatyta 2,2-difenil-pikrilhidrazilo hidrato (DPPH[•]) metodu, aprašyta W. Brand-Williams ir kt [2]. DPPH[•] radikalo sujungimo geba nustatyta sumaišius 300 μ L DPPH[•] (6,5 x 10⁻⁵ mol l⁻¹) ir 7,5 μ L tiriamųjų mėginių tirpalus (1 mg/ml). Reakcijos mišinys laikomas tamsoje 30 minučių. Mėginių absorbcijos pokyčiai išmatuoti spektrofotometru (FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Vokietija), esant 515 nm bangų ilgiui. Vandens ir metanolinio DPPH[•] tirpalo mišinys buvo naudojamas kaip palyginamasis tirpalas. DPPH[•] sujungimo geba (%), apskaičiuota kaip ir α -gliukozidazės fermento slopinimui.



1 pav. Alfa gliukozidazės veikimo mechanizmas. Adaptuotas iš G. Aruangerinathan ir kt. [1]:

I – alfa gliukozidazės fermentas skaido polisacharidus ir (ar) oligosacharidus į monosacharidus; II – padidėjęs alfa gliukozidazės aktyvumas nevisiškai suskaido polisacharidus, gali sukelti metabolinius sutrikimus. AGI slopina fermento aktyvumą, mažindami gliukozės kiekio koncentraciją kraujyje po valgio



2 pav. Dioskorėjų ekstraktų įtaka α -gliukozidazės aktyvumui

2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS⁺) radikalo katijono sujungimo gebai nustatyti [11] reakcijos mišinys 6,7 mM ABTS/2,45 mM K₂S₂O₈ santykiu 1:2 paliekamas 16 valandų tamsoje, kad susidarytų ABTS⁺. Prieš atliekant antioksidacinio aktyvumo tyrimą (AA), ABTS⁺ tirpalas skiedžiamas fosfatiniu druskų (PBS) buferiu (pH 7,4), kol pasiekiamas 0.8 ± 0.03 absorbcija, esant 734 nm bangos ilgiui.

ABTS⁺ radikalo sujungimo geba nustatyta sumaišius 300 µl ABTS⁺ ir 3 µl tiriamųjų mėginių tirpalo. Mėginių absorbcijos pokyčiai išmatuoti spektrofotometru FLUOstar Omega, esant 734 nm bangos ilgiui. Dioskorėjos lapų ekstrakto antiradikalinis aktyvumas *in vitro* išreikštas trolokso ekvivalentu (mgTE/g).

Statistinių duomenų įvertinimas. Statistinė analizė atlikta naudojant programinį paketą MS Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, JAV). Statistinės duomenų analizės metu skaičiuoti duomenų vidurkiai, standartiniai nuokrypiai. Rezultatų patikimumas įvertintas Student's testu.

Tyrimo rezultatai

Tiriant *in vitro* dioskorėjos lapų sausų ekstraktų slopinantį poveikį α-gliukozidazės fermentui, nustatyta, kad niponinių ir kaukazių dioskorėjų lapų ekstraktai >50% šį fermentą slopina (2 pav.).

Abiejų dioskorėjos rūšių bendri α-gliukozidazės aktyvumo rezultatai reikšmingai nesiskyrė: 200 µg/mL kaukazinės dioskorėjos lapų ekstraktas fermentą slopino 70,39 % (95% PI: 68,92 – 71,86), niponinės dioskorėjos lapų ekstraktas fermentą slopino 71,70 % (95% PI: 70,84 – 72,54). Priešingai nei dioskorėjos lapų ekstraktai, šaknų ekstraktai (200 µg/ml) α-gliukozidazės fermentą slopino silpnai: kaukazinės dioskorėjos – 20,28 % (95% PI: 19,46 – 21,64); niponinės dioskorėjos – 17,87 % (95% PI: 17,6 – 18,14). Nustatyti reikšmingi skirtumai tarp lapų ir šaknų ekstraktų. Padidinus dioskorėjų šaknų ekstraktų koncentraciją nuo 0,5 mg/ml iki 1,0 mg/ml, α-gliukozidazės aktyvumas sumažėjo (jis buvo atitinkamai 40,6 % ir 47,85 %, kaukazinės dioskorėjos; 39,25 % ir 46,1 % niponinės dioskorėjos) tačiau nepasiekė 50 procentų slopinimo. Nustatyta, kad niponinių ir kaukazių dioskorėjų lapų ekstraktai veiksmingai neutralizuoja laisvuosius radikalus: *D. nipponica* 415±9 mgTE/g DPPH metodu ir 659±4 mgTE/g ABTS⁺ metodu; *D. caucasica* 279±4 mgTE/g DPPH metodu ir 880±10 mgTE/g ABTS⁺ metodu. Taikant kelis matavimo metodus, rūšių antioksidacinės savybės reikšmingai skyrėsi: DPPH metodu niponinės dioskorėjos lapų ekstraktas laisvuosius radikalus neutralizavo stipriau, nei kaukazinės (atitinkamai 415 ± 9 mgTE/g ir 279 ± 4 mgTE/g, vidutinis skirtumas 136 mgTE/g, p < 0.0001); priešingai, ABTS⁺ metodu niponinių dioskorėjų

lapų ekstraktai laisvuosius radikalus neutralizavo silpniau, nei kaukazinės (atitinkamai 659 ± 4 mgTE/g ekstrakto ir 880 ± 10 mgTE/g ekstrakto), vidutinis skirtumas 222 mgTE/g, p < 0.0001.

Išvados

1. Tiriant dioskorėjų lapų ekstraktų antioksidacines savybes DPPH ir ABTS⁺ metodais, nustatyta, kad kaukazinės ir niponinės dioskorėjos lapų ekstraktai yra gana stiprūs antioksidantai.

2. Tiriant dioskorėjų ekstraktų slopinamąsias savybes α-gliukozidazės fermentui, nustatyta, kad lapų ekstraktai efektyviai slopina hidralazių šeimos fermentą α-gliukozidazę, todėl tokie ekstraktai galėtų būti vartojami hiperglikemijos prevencijai ir kaip natūralūs antioksidantai.

3. Šio tyrimo rezultatai skatina tolimesnius tyrimus, siekiant išskirti konkrečius, α-gliukozidazės fermentą slopinančius ir radikalus sujungiančius fitocheminius junginius.

Literatūra

1. Aruagarinathan G, McKay GA, Fisher M. Drug for diabetes: part 4 diabetes. Br J Cardiol 2011;18 :78 - 81.
2. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Technol 1995; 28 (1):25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
3. IDF diabetes atlas. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium 2011.
4. IDF diabetes atlas. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium 2013.
5. Inzucchi SE. 2 tipo cukrinio diabeto gydymas peroraliniais glikemiją mažinančiais vaistais. Diabeto panorama, 2005;(6):8 -17. https://www.emedicina.lt/site/files/diabeto_panorama/2005_01/2_tipo.pdf
6. ITIS Standard Report. Taxonomic Information System. <http://www.itis.gov>
7. Krylova IL. Dioscorea caucasica Lipsky - areal, morphology, biology and ecologic-cenotical characteristic. Rast Resources 1996;1-13.
8. Ou-Yang SH, Jiang T, Zhu L, Yi T. Dioscorea nipponica Makino: a systematic review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profiles. Chem Cent J 2018;12(1):57. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0423-4>
9. Paškevičius A, Ivanovienė L, Gailys R, Sadauskienė I. ir kt. Dažniausiai vartojamų biomedicinos terminų ir sąvokų aiškinamasis žinynas. LSMU leidybos namai, 2014:494.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad Biol Med 1999;26:1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

11. Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. Springer-Verlag 1992:459 -472.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-73739-8_59
12. Vasil'eva IS, Paseshnichenko VA, Guseva AR. Steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea caucasica* Lipsky. Prikl Biokhim Mikrobiol 1984;20(3):404-6. PMID: 6235520. Russian.
13. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2011; 94(3):311-321.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>

A SEARCH FOR MEDICINAL PLANTS SUITABLE FOR THE PREVENTION OF DIABETES MELLITUS

A. Adomėnienė, R. Kazernavičiūtė, P.R. Venskutonis

Key words: α -glucosidase inhibitors, hyperglycemia, substrat. Summary

An elevated blood glucose level is one of the main causes of metabolic diseases. Chronic hyperglycemia, which is asymptomatic in the early stages of development but is likely to cause long-term damage to many organs and their systems over a few years, is the most dangerous to health. This study focused on the search for medicinal plants that can inhibit the α -glucosidase enzyme.

Two species of *Dioscorea* (*Dioscorea* spp.) were selected for the study – *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponica* Makino grown in the collection of medicinal plants in the Botanical Garden of Vytautas Magnus University in Kaunas. The aim of the study was to determine the *in vitro* inhibitory properties of *Dioscorea* leaf and root extracts on the enzyme α -glucosidase and to evaluate their antioxidant properties. The study showed that leaf extracts of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponica* Makino (200 μ g/ml) inhibited the α -glucosidase enzyme by >50%. Meanwhile, the inhibitory effect of root extracts (200 μ g/ml) on this enzyme was weak: root extracts of *Dioscorea caucasica* Lipsky inhibited this enzyme by 20.28%, and root extracts of *Dioscorea nipponica* Makino – by 17.87%. The antioxidant properties of *Dioscorea* leaf extracts were evaluated using DPPH \cdot and ABTS $^{+}$ assays. The results of the evaluation showed that the studied plant extracts were quite strong antioxidants and sufficiently effectively inhibited the enzyme α -glucosidase of the hydrolase family, and thus such extracts could be used for the prevention of hyperglycemia and as natural antioxidants.

Correspondence to: ausra.adomeniene@go.kauko.lt

Gauta 2020-10-18