

© Коллектив авторов, 2024

УДК 57.044

Панова Э.В.^{1,2}, Зыкина Н.С.¹, Илюха В.В.¹

Биологическое действие экстракта листьев стевии на обменные процессы мышей C57BL/6

¹Петрозаводский государственный университет,
185910, Петрозаводск, Россия, пр. Ленина, д. 33;

²Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
185910, Петрозаводск, Россия, ул. Пушкинская, д. 11

Цель исследования – изучение влияния хронического употребления экстракта листьев стевии (ЭЛС, *Stevia rebaudiana* Bertoni), широко применяемой как сахарозаменитель, на биохимические показатели крови и состояние внутренних органов половозрелых самок мышей (*Mus musculus domesticus*) линии C57BL/6.

Методика. Животные были разделены на 3 группы: контрольную и 2 опытных, получавших водный раствор экстракта листьев стевии по 1 (допустимая суточная доза – ДСД) и 10 мг/г массы тела соответственно в течение 2-х мес.

Результаты. Показано повышение общего холестерина, снижение триацилглицеридов (ТАГ) и глюкозы крови, без дозозависимого эффекта. Установлено снижение массы поджелудочной железы и печени, а также сердца исключительно в группе получавшей ДСД экстракта. В этой же группе наблюдалось увеличение массы почек и селезенки. Кроме того прием экстракта приводил к изменению цвета почек, селезенки и печени, а в некоторых случаях к гидронефротическим изменениям почек.

Заключение. Таким образом, хроническое употребление ЭЛС оказывает как положительный, так и отрицательный эффект, что обуславливает необходимость более точного определения ДСД экстракта.

Ключевые слова: экстракт листьев стевии (ЭЛС); холестерин; триацилглицериды (ТАГ); общий белок; глюкоза крови

Для цитирования: Панова Э.В., Зыкина Н.С., Илюха В.В. Биологическое действие экстракта листьев стевии на обменные процессы мышей C57BL/6. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 109-113.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.109-113

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Зыкина Н.С., Илюха В.В.; сбор и обработка материала – Панова Э.В., Зыкина Н.С., Илюха В.В.; подготовка иллюстративного материала – Панова Э.В.; статистическая обработка материала – Илюха В.В.; написание текста и редактирование – Зыкина Н.С., Илюха В.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Илюха Владимир Викторович, e-mail: karax911@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.12.2023

Принята в печать 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Panova E.V.^{1,2}, Zykina N.S.¹, Ilyukha V.V.¹

The biological effect of stevia leaf extract on metabolic processes in C57BL/6 mice

¹Petrozavodsk State University,
33 Prospekt Lenina, Petrozavodsk, 185910, Russian Federation;

²Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk, 185910, Russian Federation

Aim: To study the effect of chronic treatment with stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaf extract (SLE), that is widely used as a sweetener, on blood biochemistry and the state of internal organs in sexually mature C57BL/6 female mice (*Mus musculus domesticus*).

Methods. Animals were divided into three groups: a control group and two experimental groups. The mice received a SLE water solution at doses of one (permissible daily dose, PDD) and 10 mg/g of body weight, respectively, for two months.

Results. The study showed an increase in total cholesterol and decreases in triacylglycerols and blood glucose without a dose-dependent effect. Decreases in the weight of the pancreas, liver, and heart were observed only in the group receiving the SLE at PDD. In the same group, increases in the weight of the kidneys and spleen were observed. Also, the SLE treatment resulted in discoloration of the kidneys, spleen and liver, and, in some cases, hydronephrotic changes in the kidneys.

Conclusion. Thus, the chronic treatment with the SLE had both positive and negative effects, which necessitates a more accurate determination of the SLE PDD.

Keywords: stevia leaf extract; cholesterol; triacylglycerols (TAGs); total protein; blood glucose

For citation: Panova E.V., Zykina N.S., Ilyukha V.V. The biological effect of stevia leaf extract on metabolic processes of C57BL/6 mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 109-113. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.109-113

Author's contribution: concept and design of the study – Zykina N.S., Ilyukha V.V.; collection and processing of material – Panova E.V., Zykina N.S., Ilyukha V.V.; preparation of illustrative material – Panova E.V.; statistical processing – Ilyukha V.V.; text writing and editing – Zykina N.S., Ilyukha V.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Vladimir V. Ilyukha, e-mail: karax911@mail.ru

Information about the authors:

Panova E.V., <https://orcid.org/0009-0003-1124-3489>

Zykina N.S., <https://orcid.org/0009-0005-7736-734X>

Ilyukha V.V., <https://orcid.org/0000-0002-2371-1740>

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.12.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

В последнее время некоторые национальные организации здравоохранения рекомендуют снизить потребление глюкозы, используя некалорийные заменители. Это связано с резким ростом потребления сахаров и негативного влияния глюкозы, в частности с усилением выделения инсулина, ростом аппетита и увеличением веса, провоцирующими развитие сахарного диабета. Одним из востребованных сегодня натуральных веществ, способных заменить сахарозу, являются гликозиды растения *Stevia rebaudiana* Bertoni. Свою популярность экстракт из растения приобрёл благодаря интенсивной сладости (в 250-300 раз слаще сахарозы) и некалорийности. Помимо этого, после употребления стевиозида не происходит выброса инсулина в кровь, что позволяет снизить инсулинозависимым диабетикам дозы принимаемого инсулина. Данные исследований, затрагивающие влияние стевиозида на метаболизм, являются противоречивыми. С одной стороны, можно выделить результаты, содержащие информацию о его безопасности и пользе для людей с диабетом, ожирением, а также для тех, кто намеривается похудеть или сократить приём сахара [1]. Кроме того экстракт листьев стевии обладает противораковой активностью. С другой стороны – имеются исследования, свидетельствующие о негативном влиянии экстракта на различные показатели репродуктивной и нервной, систем, состояния почек, обменных процессов и др. [2]. Таким образом, вышеизложенная противоречивость информации о влиянии стевиозида на организм требует более детального рассмотрения его влияния на обменные процессы.

Методика

Исследования выполнены на научном оборудовании кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института Петрозаводского государственного университета (ПетрГУ) в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным, 64 редакция 2013 г. и директивой европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей [3, 4]. Дизайн исследования одобрен комитетом по медицинской этике при Министерстве здравоохранения РК и Петрозаводском государственном университете. Опыты проводили на половозрелых самках мышей линии C57BL/6 содержащихся в виварии ПетрГУ.

Всего в эксперименте было задействовано 180 мышей линии C57BL/6 (*Mus musculus domesticus*) в возрасте от 1,5 мес. Экспериментальные животные получали экстракт листьев стевии «Стевиозид» производства ООО «Витачай» (ТУ 9197-008-65182242-12 с изменением № 1) с водой в различных концентрациях: допустимая суточная доза (ДСД, 1 мг/г массы тела); допустимая суточная доза, превышенная в 10 раз (10 мг/г массы тела); контрольная группа получала очищенную воду.

Допустимая суточная доза является минимальной, не оказывающей негативного эффекта дозировкой вещества, определяется в основном на мелких грызунах [5]. В случае с пищевыми добавками для использования человеком вводится дополнительный, уменьшающий ее коэффициент. Таким образом, увеличив, рекомендованную производителем, максимальную дозировку препарата на коэффициент безопасности, была определена ДСД для экспериментальных животных.

После 60 дней хронического употребления ЭЛС животных выводили из эксперимента, проводили отбор и измерение массы образцов для проведения биохимических исследований. Уровни содержания глюкозы, общего белка, триглицеридов и холестерина определяли с использованием наборов производства «ЭКО-сервис» (Санкт-Петербург) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, с использованием ПО MS Excel и Statgraphics. Различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$. Скореллированность изменений показателей оценивали с помощью критерия Пирсона.

Результаты

В рамках исследования была проведена оценка биохимических показателей крови половозрелых самок мышей линии C57BL/6 получавших различную до-

зу экстракта листьев стевии. Употребление экстракта листьев стевии, вне зависимости от дозы, достоверно повышало уровень холестерина. При этом наблюдалось значимое снижение уровня ТАГ (рис. 1). Достоверное увеличение уровня глюкозы крови, наблюдаемое у мышей, не имеет дозозависимого эффекта. В ходе исследования не было обнаружено достоверных изменений общего уровня белка.

В ходе исследования было отмечено изменение веса ряда органов. Вес печени и поджелудочной железы достоверно снижался при приеме экстракта без дозозависимого эффекта, а вес сердца снижался достоверно лишь при приеме допустимой суточной дозы. Хронический прием ЭЛС превышающий допустимую суточную дозу в 10 раз, так же приводил к достоверному увеличению веса почек и селезенки. Немаловажно, что ЭЛС вызывал у экспериментальных животных изменения в почках, схожие с гидронефрозом, кроме того наблюдалось изменение окраса селезенки, печени и почек в опытных группах (см. табл.). Статистически значимого влияния экстракта

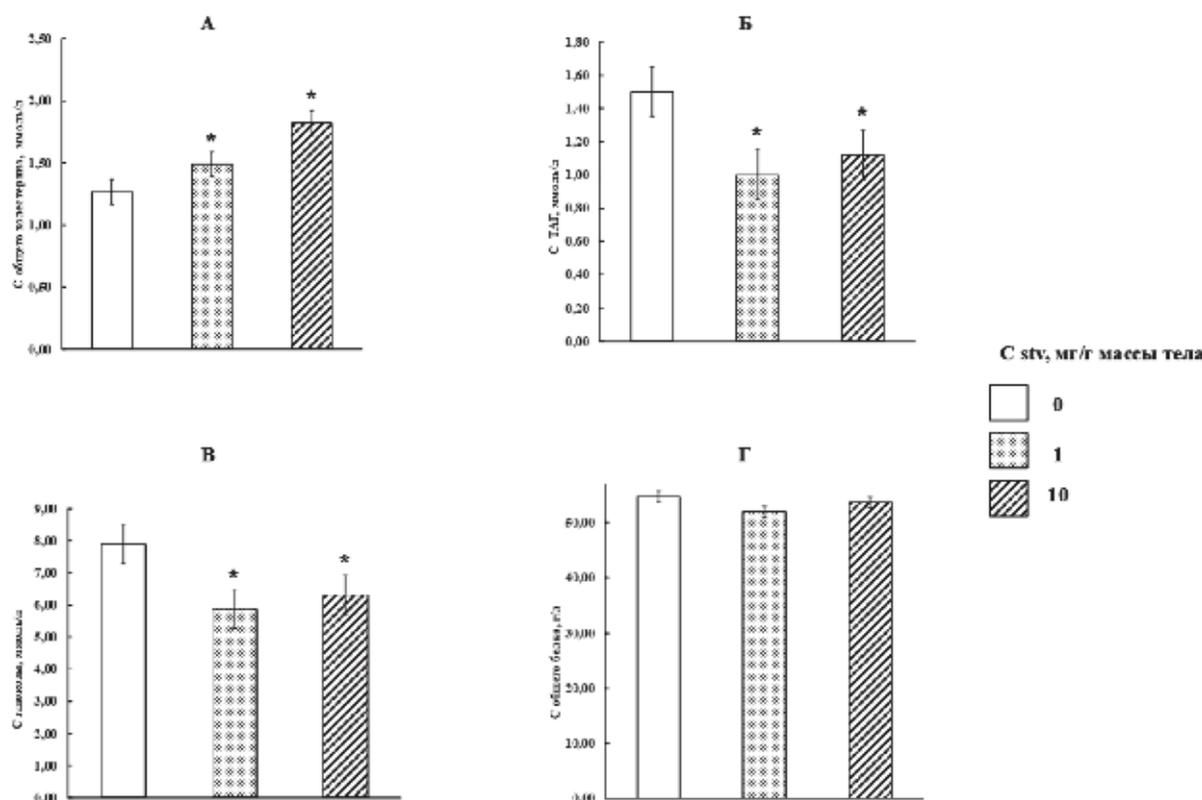


Рис. 1. Содержание глюкозы, общего белка, триглицеридов и холестерина в крови мышей линии C57BL/6 при хроническом употреблении различных доз экстракта листьев стевии. * – показатель достоверно отличается от контрольной группы.

Fig. 1. Blood glucose, total protein, triglycerides and cholesterol content of C57BL/6 mice during chronic administration of different doses of stevia leaf extract. * – the index is significantly different from the control group.

листьев стевии при хроническом приеме на вес легких выявлено не было.

При употреблении животными экстракта листьев стевии отмечалась в разной степени выраженная скоррелированность изменений изученных показателей (рис. 2). Независимо от дозировки ЭЛС появляется прямая корреляция массы печени с содержанием глюкозы в крови экспериментальных животных. Важно, что при десятикратном превышении ДСД образуются замкну-

тые циклы положительных корреляций, в которые вовлечен уровень глюкозы крови, что может являться предпосылкой наблюдаемых патологических изменений.

Часть изменений изученных показателей являются вполне предсказуемыми и являются положительными с точки зрения протекторного действия стевियोзида. В частности, снижение уровня ТАГ стоит считать положительным, так как повышение его содержания на 0,26 ммоль/л увеличивает риск развития сахарного диабета

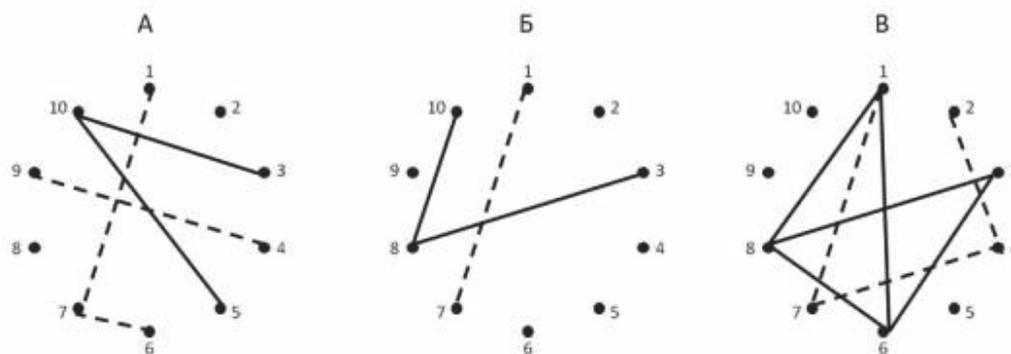


Рис. 2. Корреляционные плеяды контрольной (А), группы потреблявшей 1(Б) и 10(В) мг ЭЛС/г массы тела; корреляции в парах весовых характеристик $n=45$, биохимических характеристик $n=5$; $p<0,05$.

1 – масса животного, 2 – масса сердца, 3 – масса печени, 4 – масса почек, 5 – масса легких, 6 – масса селезенки, 7 – масса поджелудочной железы, 8 – уровень глюкозы крови, 9 – уровень ТАГ крови, 10 – уровень общего белка крови, коэф. коррел. положительный – сплошная линия, коэф. коррел. отрицательный – пунктирная линия.

Fig. 2. Co-relationships of control (A), group consuming 1(B) and 10(C) mg ELC/g body weight; correlations in pairs of weight characteristics $n=45$, biochemical characteristics $n=5$; $p<0,05$.

1 – animal weight, 2 – heart weight, 3 – liver weight, 4 – kidney weight, 5 – lung weight, 6 – spleen weight, 7 – pancreas weight, 8 – blood glucose level, 9 – blood TAG level, 10 – total blood protein level, coefficient of correlations positive – solid line, coefficient of correlations negative – dashed line.

Масса внутренних органов мышей линии C57BL/6 при хроническом употреблении различных доз экстракта листьев стевии
Internal organ weights of C57BL/6 mice during chronic consumption of different doses of stevia leaf extract

C stv, мг/г массы тела C stv, mg/g body weight	0	1	10
Сердце, г Heart, g	0,144 ± 0,038	0,096 ± 0,001*	0,146 ± 0,030♦
Печень, г Liver, g	1,091 ± 0,015	0,924 ± 0,047*	0,962 ± 0,041*
Почки, г Kidneys, g	0,282 ± 0,005	0,267 ± 0,007	0,463 ± 0,041*♦
Лёгкие, г Lungs, g	0,167 ± 0,010	0,159 ± 0,005	0,164 ± 0,006
Селезёнка, г Spleen, g	0,077 ± 0,003	0,075 ± 0,002	0,083 ± 0,002*♦
Поджелудочная железа, г Pancreas, g	0,291 ± 0,009	0,181 ± 0,013*	0,192 ± 0,008*

Примечание. * – группа достоверно отличается от контрольной; ♦ – группа достоверно отличается от получавшей допустимую суточную дозу экстракта листьев стевии (1мг/г массы тела).

Note. * – group is significantly different from the control group; ♦ – group is significantly different from the group that received the permissible daily dose of stevia leaf extract (1mg/g body weight).

на 4% [6]. Вероятной причиной снижения уровня ТАГ является стимуляция активности ферментов липазы, вырабатываемых печенью [7]. Немаловажно что в литературе имеются противоречивые данные о динамике этого показателя [7, 8]. Аналогично, к позитивным изменениям следует отнести и снижение уровня глюкозы крови. Полученные данные согласуются с данными мировых исследований [9]. Причиной изменения полагают снижение экспрессии гена PEPCK в печени под действием стевии, что в итоге замедляет глюконеогенез [9]. Применение экстракта листьев стевии имеет положительный эффект у людей, страдающих сахарным диабетом 2 типа, а так же в целом, снижает риск острого инфаркта миокарда [10]. К негативному влиянию ЭЛС, помимо патологических изменений селезенки, печени и почек, следует отнести и достоверное увеличение общего холестерина крови. В литературе имеются данные как соответствующие полученным в ходе работы [7], так и противоречащие им [11–13]. Повышение уровня холестерина является однозначно негативным фактором, так как приводит к увеличению риска ишемической болезни сердца [14].

Заключение

Суммируя всё вышеизложенное, можно утверждать, что экстракт листьев стевии в целом оказывает благоприятное воздействие на биохимические показатели крови, но при этом негативно влияет на состояние ряда внутренних органов, что не позволяет сделать заключение о безопасности применения данного вещества в качестве пищевой добавки даже в разрешённой концентрации. Различия данных, встречающихся в литературе, могут быть связаны с видовой специфичностью, что дополнительно ставит вопрос о допустимости использования исключительно животных моделей для определения безопасной дозы вещества для организма человека [2, 15].

Литература

(п.п. 1-2; 4-15 см. References)

3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Страсбург, 2010.

References

1. Geuns J.M., Buyse J., Vankeirsbilck A., Temme E.H. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental biology and medicine*. 2007; 232(1): 164–73. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-2320164>

2. Latarissa I.R., Barliana M.I., Lestari K.A. Comprehensive review of stevia rebaudiana Bertoni effects on human health and its mechanism. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2020; 10: 91–5.
3. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Strasbourg, 2010.
4. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013; 310(20): 2191–4. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
5. Walton K., Walker R., Van De Sandt J.J.M., Castell J.V., Knapp A.G.A.A., Kozianowski G. The application of in vitro data in the derivation of the acceptable daily intake of food additives. *Food and Chemical Toxicology*. 1999; 37(12): 1175–97. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00107-6)
6. Beshara A., Cohen E., Goldberg E., Lilos P., Garty M., Krause I. Triglyceride levels and risk of type 2 diabetes mellitus: a longitudinal large study. *Journal of Investigative Medicine*. 2016; 64(2): 83–385. <https://doi.org/10.1136/jim-2015-000025>
7. Ahmad U., Ahmad R.S., Arshad M.S., Mushtaq Z., Hussain S.M., Hameed A. Antihyperlipidemic efficacy of aqueous extract of Stevia rebaudiana Bertoni in albino rats. Lipids in health and disease. 2018; 17: 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0810-9>
8. Farid A., Hesham M., El-Dewak M., Amin A. The hidden hazardous effects of stevia and sucralose consumption in male and female albino mice in comparison to sucrose. *The Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020; 28(10): 1290–300. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.08.019>
9. Chen T., Chen S., Chan P., Chu Y., Yang H., Cheng J. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of stevia rebaudiana. *Planta Med*. 2005; 71(2): 108–13. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837775>
10. Stranders I., Diamant M., van Gelder R.E., Spruijt H.J., Twisk J.W., Heine R.J., et al. Admission blood glucose level as risk indicator of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2004; 164(9): 982–8. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.9.982>
11. Barriocanal L.A., Palacios M., Benitez G., Benitez S., Jimenez J.T., Jimenez N., et al. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2008; 51: 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.02.006>
12. Hsieh M., Chan P., Sue Y., Liu J., Liang T.H., Huang T., et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics*. 2003; 25(11): 2797–808. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)80334-X](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)80334-X)
13. Jeppesen P., Barriocanal L., Meyer M., Palacios M., Canete F., Benitez S., et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with type 2 diabetes: A long-term, randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *Diabetologia*. 2006; 49(1): 511–2.
14. Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Cholesterol, diabetes and major cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Diabetologia*. 2007; 50: 2289–97. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0801-2>
15. Panpatil V.V., Polasa K. Assessment of stevia (Stevia rebaudiana)-Natural sweetener: A review. *Journal of Food Science and Technology*. 2008; 45(6): 467.

Сведения об авторах:

Панова Элина Валерьевна, бакалавр, вед. биолог, лаб. экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН;
Зыкина Наталья Сергеевна, канд. биол. наук, доцент каф. биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института ПетрГУ;
Илюха Владимир Викторович, канд. биол. наук, доцент каф. биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института ПетрГУ.