

ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ТЕЧЕНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Р.Э. Джафарова, Г.Ш. Гараев, З.С. Джафаркулиева

Азербайджанский медицинский университет, mic_amu@mail.ru

Экстракт листьев черники обыкновенной оказывает благоприятное действие на состояние углеводного и липидного обмена, на процессы ПОЛ, биохимические показатели функционального состояния печени и почек на фоне экспериментального аллоксанового диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет, патология.

ACTION OF EXTRACT OF VACCINUM MYRTILLUS ON THE PATHOLOGICAL PROCESS OF DIABETES MELLITUS MODELING WITH ALLOXANE

R.A. Cafarova, Q.Sh. Qarayev, Z.S. Cafarkulieva

Azerbaijan Medical University, mic_amu@mail.ru

In this investigation have shown resulting of action of Vaccinum myrtillus on the carbon and lipid metabolism. lipid peroxidation. biochemical results of functional condition of liver and kidneys. Placebo controlling research have shown that studies preparation acts on metabolic disturbances and have hypoglycemic. hypolipidemic. and antioxidant effects.

Decrease of blood sugar is equal to the amount of concentration of free fatty acids. and probably that extract of Vaccinum myrtillus increased regeneration of β -cells. and have insulin sensibility action for residual insulin.

Decrease of amount of common cholesterol. triglycerides. lipoprotein with low density. and increase amount of lipoproteins with high density. shown that this drug have antiatherogenic action.

Reduction of primary and secondary products of lipid peroxidation — is basic factor of antidiabetic action of our drug. so decreased tolerance of insulin receptors to insulin action.

This preparation changed concentration of creatinin. urine acid in the blood.

The drug changed metabolic and enzymological properties of liver disturbances and decreased amount of common bilirubin. alanintransferase. aspartataminotransferase. and glutamintransferase.

Keywords: diabetes, pathology.

Термин «сахарный диабет» (СД) объединяет группу синдромов, для которых характерны гипергликемия, нарушенный метаболизм липидов, углеводов и белков и высокий риск осложнений, связанный с поражением сосудов. Сахарный диабет и нарушение толерантности к глюкозе не только встречаются сами по себе, но и сопутствуют многим заболеваниям — так называемый вторичный сахарный диабет.

Рядом экспериментальных работ было выявлено, что применение фитотерапии в комплексном лечении СД приводит к предупреждению развития заболевания и его осложнений. Препаратами выбора для профилактики и лечения СД и его осложнений являются природные биофлавоноиды [2,10]. Для этих веществ характерна высокая антирадикальная активность. Являясь ловушкой для свободных радикалов в организме, они оказывают наряду с антиоксидантным (АО) действием и (что не менее важно), протекторное действие, защищая систему антиоксидантной защиты самого организма. Оптимальный эффект растительных АО проявляется при применении их в комплексе сопутствующих биологически активных веществ растительного сырья [6].

Ослабление системы антиоксидантной защиты организма при СД приводит к активации перекисных механизмов [1,2,9], что наряду с гипергликемией и дислипидемией приводит к нарушению проницаемости фосфолипидной мембраны клеток периферических тканей, толерантности к инсулину, повреждению β -клеток островков Лангерганса и развитию макро- и микроангиопатии.

Природные антиоксиданты — флавоноиды в комплексе с другими растительными биологически активными веществами оказывают гипогликемическое действие. Интерес для исследования в качестве средства для применения при СД представляет черника обыкновенная — *Vaccinium myrtillus* L. сем. брусничные — *Vaccinaceae*. Листья черники содержат дубильные вещества (до 20%), фенольные соединения арбутин (1–2%), гидрохинон (1%), антациан — миртиллин (1–2%), кверцетин и другие флавоноиды, тритерпеновые сапонины — урсоловую и олеоноловую кислоты, аскорбиновую кислоту (до 250 мг%). Применяют препараты листьев черники для снижения сахара в крови при СД в составе различных растительных сборов. Доказано, что гипогликемическое действие этих препаратов связано с флавоноидным гликозидом миртиллином [4]. Выявление действия экстракта листьев черники обыкновенной на метаболические сдвиги, а также на процессы перекисного окисления липидов при аллоксан-индуцированном СД и являлось задачей данных исследований.

Материалы и методы исследований

В работе использовались половозрелые крысы-самцы линии Вистар массой тела 200–280 г. Модель экспериментального СД создавали внутрибрюшинным введением аллоксана тригидрата («La Chema», Чехия) (по модифицированной нами методике). Контрольные животные получали эквивалентную инъекцию физиологического раствора натрия хлорида. По истечении 10 суток, предварительно определив вес и сахар в крови, составили группы по 10 животных в каждой. Далее в течение 2-х недель животным в соответствующих дозах

вводили экстракт травы донника лекарственного, контрольная группа животных получала эквивалентную инъекцию физиологического раствора натрия хлорида. На 15 сутки, после предварительной 24 часовой голодовки, животных взвешивали и затем декапитуировали, забирали кровь и органы на анализ для определения содержания сахара, продуктов липидного обмена, ПОЛ, биохимических показателей функционального состояния печени и почек.

Содержание сахара в крови определяли при помощи индикаторной бумаги ИМЕ-ДС тест-анализатором и ферментативным колориметрическим методом без депротенизатора (GOD-PAF), реактив Глюкоза — Human, анализатор ФП-901 при длине волны 500 нм.

Содержание в крови триглицеридов, липопротеидов, холестерина, свободных жирных кислот определяли ферментативным колориметрическим методом набором химических реактивов производства Human, Германия. Анализатор ФП-901 при длине волны 500 нм.

На анализаторе Stat Fax chem.-well набором химических реактивов производства Human (Германия), определяли содержание общего билирубина при длине волны 546 нм, аланинаминотрансферазы — при длине волны 340–365 нм, аспартатаминотрансферазы — при длине волны 340–365 нм, глутаминтрансферазы — при длине волны 400–420 нм, общего белка — при длине волны 540–560 нм, креатинина — при длине волны 490–510 нм, мочевой кислоты — при длине волны 520–546 нм.

Выраженность окислительного стресса определяли по концентрации диеновых

конъюгантов и малонового диальдегида в сыворотке крови и тканях печени, сердца, почек, поджелудочной железы [7,14].

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с использованием *t*-критерия Стьюдента и непараметрическим определением значений *U* для критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [3,8].

Результаты и их обсуждение

На 2-е сутки после введения аллоксана у животных в крови наблюдается повышение содержания сахара. Гипергликемия усиливается после повторного введения аллоксана на 3-и и 5-е сутки. Дробное введение аллоксана уменьшает летальность крыс в острый период интоксикации и позволяет увеличить период спонтанной регенерации β -клеток. Таким образом, на 10-е сутки содержание сахара в крови превышает интактные показатели на 370.7%. В последующие сроки экспериментального диабета сахар в крови животных начинает постепенно снижаться, наступает период компенсации, что связано с частичной регенерацией β -клеток [2]. Причем в группе животных, получавших плацебо, относительно группе, получавшей препарат, аналогичная компенсация сахара наступает на 10 дней позже.

Поражение различных органов при СД вследствие поражения сосудов этих органов, где свободнорадикальные процессы имеют немаловажное значение, определило интерес к выявлению действия препарата на содержание продуктов ПОЛ.

Для определения эффективности действия исследуемого препарата на выраженность ПОЛ на фоне аллоксанового диабета

Таблица 1

Показатели влияния экстракта листьев черники обыкновенной на выраженность ПОЛ (нмол/мл и нмол/мг ткани) на фоне аллоксанового диабета

	объект		интакт n=5	аллоксановый диабет (модель) n=5	аллоксановый диабет +плацебо (контроль) n=5	Аллоксановый диабет + экстракт n=5
1	кровь	ДК	5.04±0.108 (4.7-5.3)	18.62±0.647 (16.7-20.1)	9.52±0.171 (9.2-10.1)	6.7±0.141 (6.3-7.1)
		МДА	3.16±0.16 (2.8-3.7)	15.46±0.474 (14.7-17.3)	8.02±0.206 (7.3-8.5)	4.18±0.139 (3.8-4.5)
2	печень	ДК	3.38±0.12 (3.0-3.7)	20.14±0.738 (19.8-22.2)	10.74±0.254 (10.0-11.3)	6.7±0.252 (6.1-7.5)
		МДА	2.84±0.13 (2.5-3.3)	17.12±0.512 (15.7-18.3)	10.68±0.128 (10.3-11.0)	5.56±0.229 (5.2-6.4)
3	сердце	ДК	2.7±0.063 (2.5-2.9)	11.94±0.359 (10.9-12.9)	5.38±0.116 (5.0-5.7)	3.8±0.11 (3.5-4.1)
		МДА	1.94±0.11 (1.6-2.2)	9.42±0.35 (8.7-10.7)	5.18±0.107 (4.9-5.5)	1.9±0.07 (1.7-2.1)
4	почки	ДК	3.46±0.163 (3.0-3.9)	22.02±0.326 (20.9-22.7)	11.14±0.112 (10.9-11.5)	4.0±0.164 (3.6-4.5)
		МДА	1.86±0.1 (1.6-2.0)	16.94±0.431 (15.3-17.7)	10.58±0.263 (9.8-11.3)	3.26±0.108 (3.0-3.6)
5	п/ж железа	ДК	2.32±0.12 (2.1-2.7)	25.12±0.269 (24.3-25.7)	11.16±0.172 (10.7-11.7)	4.9±0.130 (4.5-5.2)
		МДА	1.8±0.07 (1.6-2.0)	19.66±0.781 (17.3-21.7)	11.06±0.136 (10.7-11.5)	3.56±0.163 (3.0-3.9)

Результаты достоверны при p < 0,001

обследовались гомогенаты тканей, наиболее страдающие от СРО при СД. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, выраженность изменения первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгантов (ДК) под действием препарата на фоне аллоксанового диабета, относительно аллоксан-индуцированных животных проявилась следующим образом: в крови снизилась на 64,0 %, в печени — на 66,4%, сердце — на 68,2%, почках — на 81,8%, поджелудочной железе — на 80,5%, тогда как в группе животных, получавших плацебо, эти показатели соответственно были: 48,9%, 46,7%, 54,9%, 49,4%, 55,6%. Выраженность из-

менения концентрации вторичных продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) под действием препарата на фоне аллоксанового диабета относительно аллоксан-индуцированных животных имела следующие значения: в крови снизилась на 75,9 %, в печени — на 73,0%, сердце — на 67,5%, почках — на 79,8%, поджелудочной железе — на 80,8%, тогда как в группе животных, получавших плацебо эти показатели соответственно были: 48,1%; 37,6%; 45,0%; 37,5%; 43,7%. Как видно из полученных результатов, исследуемый препарат относительно контрольной группы, получавшей плацебо, более эффективно снижает выраженность ПОЛ, что объясня-

ется флавоноидной природой биологически активных веществ экстракта листьев черники обыкновенной, причем снижение продуктов ПОЛ коррелирует со снижением сахара в крови животных, Увеличение «жесткости» фосфолипидного бислоя мембран клеток при повышении ПОЛ приводит к нарушению инсулинсвязывающей активности рецепторов [5] и, по-видимому, не позволяет везикулам с транспортными белками GLUT-1 и GLUT-4 подойти достаточно близко к клеточной мембране, что необходимо для обеспечения перехода глюкозы в клетку по 12 трансмембранным α -спиральным доменам [11,12,13]. Анализ полученных результатов и сведений литературы позволяет предположить, что одной из причин гипогликемического действия препарата является улучшение состояния мембран клеток, вследствие чего происходит сенсбилизация рецепторов периферических тканей к действию инсулина, концентрация которого с учетом спонтанной регенерации β -клеток поджелудочной железы недостаточна для достижения соответствующей гипогликемии.

Известно, что инсулин стимулирует транскрипцию гена липопротеидлипазы в эндотелии капилляров, который осуществляет гидролиз триглицеридов, находящихся в составе ЛПОНП и хиломикронов. Инсулин также тормозит действие гормон-сенситивной липазы, который вызывает гидролиз триглицеридов, депонированных в жировой ткани, и поступление жирных кислот в кровь, обеспечивает транспорт глюкозы через мембраны в жировые клетки практически тем же путем, что и мышечные клетки. Затем глюкоза используется

в основном для синтеза α -глицерофосфата, являющегося субстратом для синтеза глицерола. Глицерол связывает жирные кислоты, депонируя триглицериды в жировой ткани, поэтому при отсутствии достаточного количества инсулина депонирование жиров даже при наличии больших количеств жирных кислот, выделяемых печенью в виде липопротеидов, практически полностью блокируется.

Дефицит инсулина вызывает липолиз в жировых депо и высвобождение свободных жирных кислот и увеличивает в плазме концентрацию глицерола и фосфолипидов. Избыток свободных жирных кислот в плазме, вызванный дефицитом инсулина, обеспечивает превращение некоторых жирных кислот в фосфолипиды и холестерол. Оба эти вещества в связи с избытком триглицеридов образуются в печени одновременно и затем высвобождаются в кровь в виде липопротеидов. Высокая концентрация липидов, холестерола в особенности, вызывает у людей с тяжелым диабетом развитие атеросклероза. Кроме того, дефицит инсулина может быть сопряжен с избытком ЛПОНП. Учитывая вышесказанное, мы выявляли действие исследуемого препарата на содержание в крови аллоксан-индуцированных животных общего холестерина, триглицеридов, свободных жирных кислот.

Так, содержание холестерина в крови животных, забитых на 10 сутки после индукции диабета, превышает интакт на 13,7%, ЛПНП — на 29,2%, липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) — на 59,2%, а свободных жирных кислот (СЖК) — на 51,1%. При этом содержание липопротеидов

теидов высокой плотности (ЛПВП) снизилось на 37,7%. После введения животным с аллоксан-индуцированным диабетом в течение 15 дней экстракта листьев черники обыкновенной эти показатели относительно соответствующих показателей на 10-е сутки после введения аллоксана изменились следующим образом: сахар снизился на 75,9%, концентрация триглицеридов снизилась на 50,4%, холестерина — на 9,0%, ЛПНП — на 19,4%, ЛПОНП — на 17,0%, СЖК — на 41,6%. Содержание ЛПВП увеличилось на 44,5%, тогда как эти показатели в группе, получавшей эквивалентную инъекцию физиологического раствора натрия хлорида, имела соответственно следующие зна-

чения: сахар снизился на 66,7%, концентрация триглицеридов снизилась на 41,3%, холестерина — на 6,8%, ЛПНП — на 8,0%, ЛПОНП — на 21,3%, а СЖК — на 17,2%. Содержание ЛПВП увеличилось на 19,0%, и только на 25 сутки эти показатели стали близки к показателям группы животных получавших препарат. Таким образом, экстракт листьев черники обыкновенной в плацебо контролируемом эксперименте значительно улучшает картину липидного состава крови, особый интерес представляет увеличение содержания антиатерогенных ЛПВП. Данные представлены в табл. 2. Возможно, что снижение уровня триглицеридов обусловлено улучшением компенсации угле-

Таблица 2

Показатели влияния экстракта листьев черники обыкновенной на содержание в крови сахара, холестерина, липидов и жирных кислот на фоне аллоксанового диабета

№	состояние животных	сахар Mg/dl	триглицериды Mg/dl	холестерин Mg/dl	ЛПВП	ЛПНП	ЛПОНП	СЖК
1	интакт n=5	111.8±1.46 (108-115)	37.22±1.47 (33.-41.8)	51.04± 0.97 (48.1-53.7)	14.5±0.49 (13.3-15.9)	28.18±0.73 (26.4-30.7)	7.9±0.50 (6.8-9.5)	8.12±1.25 (5.9-12.9)
2	Аллоксан. диабет (модель) n=5	526.2±3.76 ** (518-539)	130.14± 4.21** (115.7-141.5)	58.04± 1.31* (53.9-61.6)	9.04±0.21 ** (8.4-9.5)	36.4±0.73 ** (34.7-36.8)	12.58±0.64 ** (10.6-14.3)	16.6±0.83 (13.-18.0) **
3	Аллоксан. диабет +плацебо (контроль) n=5	175.2± 4.409** (162-187)	76.38± 1.136** (72.7-79.1)	54.12± 0.432*** (52.1-55.7)	10.76± 0.163** (10.2-11.2)	33.48± 0.289** (32.8-34.2)	9.9±0.842 *** (7.1-11.6)	13.7±0.33 ▪ (12.8-14.5)
4	Аллоксан. диабет +препарат n=5	127.2±1.2 ▪ (123-130)	64.52± 0.697 ▪ (62.9-66.7)	52.82±0.412 ▪ (51.7-54.0)	13.06±0.44 ▪ (12.3-14.7)	29.34±0.582 ▪ (27.6-31.0)	10.44±0.97 **** (7.5-13.3)	9.7±0.152 ▪ (9.3-10.1и)

** — p интакт <0.001; * — p интакт <0.01; ** — p <0.001; ▪ — p <0.01; *** — p <0.05; **** — p >0.05

водного обмена, что сопровождается пода-

влением липолиз и снижением печеночной продукции липопротеидов.

В наших экспериментах у аллоксан-индуцированных животных активизация ПОЛ в почках сопровождается увеличением концентрации креатинина и мочевой кислоты в крови. Под действием экстракта листьев черники обыкновенной снижение концентрации ДК и МДА в гомогенатах тканей почек приводит к снижению указанных биохимических параметров, согласно табл. 3, соответственно на 24,7%, 38,8%, тогда как в группе, получавшей плацебо, эти показатели соответственно изменились на 10,5%, 25,1%. Изменения указанных параметров коррелируют с изменениями ПОЛ, и, следовательно, основной причиной улучшения почечных показателей наряду со снижением сахара и холестерина, предположительно является АО действие препарата.

Сдвиг метаболических и энзимологических признаков повреждения печени в сторону улучшения под действием препарата (табл. 3) демонстрирует снижение в крови

показателей концентрации общего билирубина, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, глутаминтрансферазы соответственно на 43,9%, 28,1%, 23,1%, 26,4%, тогда как в группе, получавшей плацебо, эти показатели соответственно были: 22,7%; 19,1%; 14,0%; 19,4%.

Таким образом, результаты исследований фармакологического действия экстракта листьев черники обыкновенной на патологические изменения у аллоксан-модулированных животных показывают, что препарат:

- а) снижает сахар в крови;
- б) оказывает положительное влияние на липидный обмен;
- в) снижает выраженность оксидативного стресса;
- г) устраняет функциональную недостаточность энзимсинтезирующих звеньев печени, что повышает его антитоксическое свойство, оказывая патогенетическое антидиабетическое действие.

Таблица 3

Влияние экстракта листьев черники обыкновенной на печеночные и почечные показатели на фоне аллоксанового диабета

показатель	интактный контроль n=5	аллокс. диабет (модель) n=5	аллокс. диабет +плацебо (контроль) n=5	фармакологическое воздействие n=5
общий билирубин mg/dl	0.43±0.012 (0.40-0.47)	0.642±0.035* (0.52-0.72)	0.496±0.017** (0.78-0.85)	0.36±0.013*** (0.32-0.40)
ALT u/l	63.18±4.12 (50.0-72.0)	89.68±3.13* (83.5-99.8)	72.52±1.978** (68.7-78.7)	64.5±5.633** (49.3-79.1)
AST u/l	244.7±13.18 (222.3-287.9)	323.34±8.09* (318.2-329.1)	277.96±8.015** (255.9-301.2)	248.5±8.157*** (221.0-267.8)
GTP u/l	28.78±0.64 (26.5-30.0)	51.08±3.41* (40.3-59.5)	41.18±0.811* (38.5-42.5)	37.58±0.713** (35.4-39.2)
креатинин mg/dl	0.64±0.024 (0.6-0.7)	0.94±0.024* (0.9-1.0)	0.818±0.0146*** (0.78-0.85)	0.64±0.051*** (0.5-0.8)
мочевая кислота mg/dl	1.2±0.184 (0.7-1.7)	5.1±0.114* (4.9-5.5)	3.82±0.116*** (3.5-4.1)	3.12±0.169*** (2.7-3.7)

* — p интакт <0.001; ** — p <0.01; *** — p <0.001 ▪ — p <0.05

Флавоноидный компонент экстракта, обладающая АО действием, оказывает мембран-стабилизирующее действие, в результате чего чувствительность инсулиновых рецепторов к инсулину повышается, что, по-видимому, и объясняет антидиабетическое действие препарата.

Список литературы

1. Бобырева Л.Е. Свободнорадикальное окисление, антиоксиданты и диабетические ангиопатии // Пробл.эндокринолог. — 1996. — Т.42.— №6. — С. 14–19.
2. Бондарь И.А., Климонтов В.В. Антиоксиданты в лечении и профилактике сахарного диабета. — www.diabet.ru. Сахарный диабет. — 2001. — № 1.
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. — М.: Медицина, 1969. — 28 с.
4. Джафарова Р.Э. Исследование гипогликемического действия некоторых лекарственных растений, содержащих флавоноиды//Проблемы физиологии и биохимии. — 2008. — Т.26.— С.237–248.
5. Князев Ю.А., Гурина А.Е., Максина А.Г., Дзугкоева Ф.С. Состояние цитоплазматических мембран при экспериментальном сахарном диабете. — www.diabet.ru. Сахарный диабет. — 1999. — №3.
6. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Зенкевич И.Г. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. — 2004. — №2. — С. 30–32.
7. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот// Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1997. — С. 63–64.
8. Статистические методы исследования в медицине и здравоохранении / под редакцией проф. Л.Е.Полякова. — Л.: Медицина, 1971. — 199 с.
9. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., Stevenson H.C., Witztum J.L. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesterol ester in human monocyte-derived macrophages// Diabetes. — 1988. — V.37.— P. 550–557.
10. Saifa F., Skalese M., Lanza V. et al/ Flavonoid and antioxydant agents: importance of their interaction with biomembranes // Free Radical Biol.Med. — 1995. — V.19, №4. — P. 481–486.
11. Shepherd P.R., Kahn B.B. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus // N.Engl.J.Med. — 1999. — 341:248–256.
12. Simpson I.A. Cushman S.W. Hormonal regulation of mammalian glucose transport // Annu.Rev.Biochem. — 1986. — 55:1059–1089.
13. Suzuki K., Kono T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site // Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.,1980. — 77:2542–2545.
14. Uchiyama M., Michara M/ Determination of malonaldehyde in tissues by Thiobarbituric acid test // Biochem. — 1978. — N1. — P.271–278.