ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ИЗ ВИНОГРАДА СО СТЕВИЕЙНА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Загайко А.Л., Войтенко Е.И., Красильникова О.А.
Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

Последнее десятилетие ознаменовалось увеличением частоты эндокринных патологий во всем мире. Среди эндокринных заболеваний особое место занимает сахарный диабет (СД), являясь одним из наиболее распространенных хронических заболеваний. Дефицит инсулина (СД 1 типа) или инсулиновая резистентность (СД 2 типа) способствуют развитию окислительного стресса, который в свою очередь прямо или опосредованно приводит к развитию сосудистых осложнений. На сегодняшний день сахарный диабет как первого, так и второго типа, в определенном смысле представляет собой неизлечимое заболевание, и вполне естественно, что значение профилактики и лечения данной патологии в подобной ситуации возрастает. По данным ВОЗ (2012 год) в мире насчитывается 160 млн. больных сахарным диабетом, из них 85-90 % болеют сахарным диабетом второго типа. Сахарный диабет – глобальная проблема для здравоохранения всех стран мира и для населения всех возрастов и является приоритетом первого ряда среди проблем, стоящих перед медицинской наукой и здравоохранением.

Больные сахарным диабетом того или иного типа часто страдают от разнообразных осложнений этого недуга, а также от сопутствующих заболеваний. Нередко при сахарном диабете развиваются различные заболевания печени.

Развитие СД негативно сказывается на состоянии гепатобилиарной системы, нарушая обмен белков, аминокислот, жиров и других веществ в гепатоцитах, что, в свою очередь, предрасполагает к развитию хронических заболеваний печени. Заболевания печени при сахарном диабете диагностируются как у больных сахарным диабетом первого типа, так и у лиц, страдающих инсулиннезависимым диабетом, однако характер поражения печени в этих случаях, как правило, разный.[1].

В основе патогенеза СД лежат три эндокринных дефекта: нарушение продукции инсулина, инсулинорезистентность и нарушенный ответ печени на инсулин, не приводящий к торможению глюконеогенеза.[3].

В условиях инсулинорезистентности в кровоток, а именно – в портальную вену, выбрасывается значительное количество неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК). По портальной вене избыток НЭЖК кратчайшим путем поступает в печень, где они должны утилизироваться. Главный путь утилизации НЭЖК в этих условиях— синтез триглицеридов.

Традиционная терапия сахарного диабета основана на применении сахароснижающих препаратов и инсулина. В тоже время, поступление ксенобиотиков в организм человека является мощным активатором процессов микросомального, а, следовательно, и свободнорадикального окисления. Увеличение продукции активных форм кислорода, активация процессов перекисного окисления в настоящее время рассматриваются как возможные причины возникно-

вения СД [2]. Однако в последнее время растет интерес к поиску веществ природного, в особенности растительного происхождения. Растительные полифенолы нормализуют содержание глюкозы, инсулина, жирных кислот и триацилглицеринов у крыс с экспериментальным диабетом первого типа.

Кроме того, имеются многочисленные литературные данные о позитивном влиянии гликозидов из стевии на состояние углеводного обмена при СД. Исходя из этого, целью настоящей работы было исследование влияния полифенольного концентрата, полученного из семян винограда, с добавлением стевии, на состояние липидного обмена на модели СД1 и СД2.

Материалы и методы исследования. Эксперименты по изучению гипогликемической, липотропной, антиоксидантной и гепатопротекторной активности проводили на белых беспородных крысах – самцах, массой 180–220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария НФаУ.

СД1 у животных вызывали путем одноразового внутрибрюшинного введения раствора стрептозотоцина (СТЦ) («Sigma», США) в 1 М цитратном буфере pH 4,5 в дозе 55 мг/кг массы тела. Развитие диабета контролировали измерением уровня глюкозы и инсулина в сыворотке крови крыс. Диагноз диабет был поставлен после того, как уровень глюкозы в сыворотке крови, взятой натощак, было больше 14 ммоль/л. СД2 моделировали содержанием животных на диете с высоким уровнем фруктозы (60 г/ на 100 г диеты) в течение 60 дней. Полифенольный концентрат, содержащего экстракт стевии (ПКС) вводили внутрижелудочно. Доза фенольных соединений, 9 мг/100 г массы тела, была рассчитана на основе данных

После этого крысы были распределены на 6 экспериментальных групп по 7 крыс:

1-я группа – интактные животные;

2-я группа – животные с СД1;

3-я группа – животные с СД1, которые через 30 дней в течение 15 дней получали ПКС;

4-я группа – животные, с СД2.

5-я группа – животные с СД2, которые с 45 дня в течение 15 дней получали ПКС;

6-я группа – животные, которые в течение 15 дней получали ПКС;

После окончания эксперимента животных декапитировали. Кровь собирали для получения сыворотки. Печень перфузировали холодной средой выделения (0,25 М сахароза в 0,025 М трис-HCl, pH 7,5), гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера из расчета 1 г печени в 2 мл среды выделения. Все манипуляции с животными проводили под хлоралозо-уретановым наркозом. Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом с использованием стандартных наборов реактивов. Содержание инсулина в сыворотке крыс определяли радиоиммунным методом с использованием стандартных наборов. Содержание триацилглицеринов (ТГ) определяли с помощью стандартного набора реактивов. Содержание свободных жирных кислот (СЖК) определяли по реакции их медных солей с диэтилдитиокарбаматом.

Концентрацию глицеридов определяли с помощью стандартного ферментативного набора фирмы «KONE» (Финляндия).

Содержание холестерола (ХС) определяли с помощью стандартных ферментативных холестеролоксидазных наборов фирмы «Boehringer Mannheim Gmb diagnostica» (Германия).

Концентрацию общих липидов определяли с помощью стандартного набора EagleDiagnostics (США) – реакция с ванилиновым реактивом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием вариационной статистики (ANOVA). P<0,05 – статистически достоверные различия.

Результаты исследований и их обсуждение. Безопасность лекарственных средств является одним из важнейших условий их применения в медицинской практике. Одной из важнейших задач экспериментальной фармакологии является создание средств, обеспечивающих выразительный терапевтический эффект и одновременно проявляющих минимальное негативное влияние на организм. Поэтому определение параметров острой токсичности новых субстанций составляет начальный этап доклинических исследований и должно предшествовать изучению их фармакологических свойств, именно по результатам токсикологических до-исследований должно осуществляться отбор субстанций для дальнейшего изучения.[3].

Экспериментальным животным внутрижелудочно вводили исследуемый концентрата полифенолов в дозах 500, 1000, 2000 и 5000мг/кг (в пересчете на сумму полифенолов). Большой объем вводимой жидкости делал невозможным дальнейшее увеличение дозы, при этом гибель животных не регистрировали.

Нами было обнаружено, что исследованный ПКС относится к классу «практически нетоксичных веществ»по классификации К.К. Сидорова.

У больных, страдающих сахарным диабетом 2 типа, нарушения липидного обмена встречаются значительно чаще и степень дислипидемии более выражена по сравнению с аналогичными нарушениями, выявляемыми у больных диабетом 1 типа. Для большинства больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с нарушениями липидного обмена одной компенсации углеводного обмена недостаточно для нормализации повышенного содержания холестерина, триглицеридов и других показателей липидного обмена, что подтверждается тщательно спланированными и проведенными исследованиями. В этой связи, большинству больных сахарным диабетом 2 типа наряду с применением сахароснижающей терапии приходится назначать различные лекарственные препараты, влияющие на нормализацию липидного обмена. [4].

Содержание животных на диете, обогащенной фруктозой, моделирует состояние инсулинорезистентности и приводит к развитию СД2. Известно, что фруктоза не вызывает усиления секреции инсулина, необходимого для утилизации других углеводов пищи и в печени становится субстратом липогенеза. Содержание животных на рационе, обогащенном фруктозой, приводит к развитию резистентности к инсулину, нарушению поступления глюкозы в клетки, гиперинсулинемии, гипертриацилглицеринемии, артериальной гипертензии у экспериментальных животных. Фруктозная нагрузка также приводит к ускорению синтеза триацилглицеринов denovo, а также увеличению уровня свободных жирных кислот, которые могут активировать ключевой фермент гликогенолиза – глюкозо-6-фосфатазу и, тем самым, увеличивать образование глюкозы в печени, что вносит вклад в увеличение гипергликемии.

Исходя из этого, следующим этапом нашей работы было определение показателей метаболизма липидов в печени и сыворотке крови крыс в условиях экспериментального сахарного диабета. Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Влияние ПКС на содержание липидов в печени и сыворотке крови крыс с СД1 (M±m, n=7)

Показатель	Интакт	СД1	СД1+ПКС	ПКС
В ткани печени				
ОЛ, мг/г ткани	171,71±7,88	289,76±13,39*	259,69±4,91*/**	169,67±5,93
ХС, ммоль/г	17,78±2,05	16,67±2,62*	19,01±2,62*/**	18,63±3,02
ТАГ, мг/г	6,17±0,17	13,29±1,21*	12,68±0,87*/**	5,99±0,88
СЖК, ммоль/г	4,13±0,57	6,93±0,45*	5,58±0,47*/**	4,69±0,57
ОФЛ, ммоль/г	42,67±2,05	24,78±2,62*	37,98±2,62*/**	43,78±2,67
В сыворотке крови				
ОЛ, мг/мл	1,87±0,08	2,77±0,24*	2,43±0,10*/**	1,88±0,10
ХС, ммоль/л	5,72±0,34	6,31±0,80*	6,43±0,49*	5,75±0,49
ТАГ, мг/мл	0,51±0,17	1,69±0,13*	1,29±0,98*	0,58±0,98
СЖК, ммоль/л	1,30±0,14	2,02±0,19*	1,86±0,49	1,65±0,49
ОФЛ, ммоль/л	12,93±0,53	7,24±0,53*	8,43±0,69*/**	13,93±0,69

Примечания:

* – отклонения достоверны относительно интактного контроля;

** – отклонение достоверно относительно контрольной патологии;

Таблица 2

Влияние ПКС на содержание липидов в печени и сыворотке крови крыс с СД2 (M±m, n=7)

Показатель	Интакт	СД2	СД2+ПКС	ПКС
В ткани печени				
ОЛ, мг/г ткани	171,71±7,88	259,74±13,39*	209,68±4,91*,**	169,67±5,93
ХС, ммоль/г	17,78±2,05	29,66±2,62*	22,97±2,62*/**	17,63±3,02
ТАГ, мг/г	6,17±0,17	13,75±1,21*	9,67±0,87*/**	5,99±0,88
СЖК, ммоль/г	4,13±0,57	7,53±0,45*	5,34±0,47*/**	4,69±0,57
ОФЛ, ммоль/г	42,67±2,05	18,72±2,62*	25,96±2,62*/**	43,78±2,67
В сыворотке крови				
ОЛ, мг/мл	1,87±0,08	2,63±0,24*	2,13±0,10*/**	1,88±0,10
ХС, ммоль/л	5,72±0,34	9,58±0,80*	9,77±0,49*	5,75±0,49
ТАГ, мг/мл	0,51±0,17	1,54±0,13*	1,19±0,98*	0,58±0,98
СЖК, ммоль/л	1,30±0,14	3,79±0,19*	2,05±0,49	1,65±0,49
ОФЛ, ммоль/л	12,93±0,53	8,22±0,53*	9,24±0,69*/**	13,93±0,69

Примечания:

* – отклонения достоверны относительно интактного контроля;

** – отклонение достоверно относительно контрольной патологии;

Известно, что выраженная декомпенсация углеводного обмена при сахарном диабете сопровождается транзиторными нарушениями липидного обмена, которые уменьшаются или даже нормализуются при полной компенсации диабета. Указанные взаимоотношения между состоянием углеводного и липидного обмена чаще наблюдаются у больных сахарным диабетом типа 1. Так, компенсация углеводного обмена у больных сахарным диабетом типа 1 приводит почти к полной нормализации липидного обмена. [4]. Ранее нами было показано, что введение исследуемых субстанций несколько снижало содержание глюкозы в сыворотке крови животных с экспериментальным СД1, однако не приводило к его нормализации.

Как видно из представленных данных, развитие экспериментального сахарного диабета сопровождается глубокими изменениями обмена липидов в печени животных, которое находит свое отражение в изменении уровня липидов в сыворотке крови.

Так нами было отмечено, что у животных с СД1 имеет место увеличение содержания ОЛ, ТАГ, СЖК на 1,69; 1,86; 2,1 и 1,5 раза, соответственно (табл.1). Содержание ФЛ в печени крыс при этом достоверно уменьшалось в 1,7 раза. Введение животным изучаемых полифенольных концентратов приводило к достоверному снижению данных показателей. Однако, следует отметить, что введение исследованных субстанций не приводило к нормализации исследуемых показателей.

Этот факт, по-видимому, играет ведущую роль в том, что при СД1 вводимые субстанции не оказывают сильного нормализующего действия на показатели липидного обмена. Об этом свидетельствует достаточно высокий уровень ТГ, СЖК и пониженное содержание ОФЛ.

Сходные изменения были отмечены и при СД 2 типа (табл. 2).

Использование ПКС предотвращало гиперлипидемию и снижало показатели липотоксичности в печени экспериментальных животных.

Таблица 3

Антиоксидантная активность ПКС на модели СД1, (M±m, n=6)

Показатель	Интакт	СД1	СД1+ПКС	ПКС
ТБК-АП, мкмоль/г	63,03±4,80	85,74±4,41*	78,97±5,13**	58,55±4,95**
ВГ, ум.од.	44,85±4,38	28,73±2,63*	43,76±1,73**	47,16±1,23**
Каталаза, мкат/л	2,64±0,19	3,18±0,19	3,11±0,26**	2,85±0,23**

Примечания:

* – отклонения достоверны относительно интактного контроля;

** – отклонение достоверно относительно контрольной патологии;

Как видно из данных таблицы 3, при СД1 наблюдается активация свободно – радикального окисления, которое проявляется в увеличении уровня ТБК-АП на 36%, снижение содержания ВГ почти в два раза и возрастании активности каталазы на 20%. При этом у животных, получавших ПКС, уровень ПОЛ достоверно не отличался от интактных значений. Добавление ПКС к рациону животных с модельным СД1 значительно улучшало показатели СРО: уровень

ТБК-АП у них был несколько ниже, чем у нелеченных, а содержание ВГ возрастало до интактного уровня, хотя активность каталазы оставалась повышенной.

Аналогичные изменения отмечались и при СД2 (табл. 4): у животных с модельной патологией отмечалось возрастание уровня ТБК-АП, падение уровня ВГ и активация каталазы.

Эти изменения позволяют констатировать развитие оксидативного стресса при экспериментальном сахарном диабете, что согласуется с литературными данными относительно ведущей роли свободнорадикального окисления в развитии данной патологии.

Таблица 4

Антиоксидантная активность ПКС на модели СД2, (M±m, n=6)

Показатель	Интакт	СД2	СД2+ПКС	ПКС
ТБК-АП, мкмоль/г	63,03±4,80	95,24±4,41*	69,17±4,93**	58,17±5,13**
ВГ, ум.од.	44,85±4,38	29,14±2,63*	40,18±1,73**	53,26±1,83**
Каталаза, мкат/л	2,64±0,19	3,67±0,19	3,07±0,31**	2,51±0,22**

Примечания:

* – отклонения достоверны относительно интактного контроля;

** – отклонение достоверно относительно контрольной патологии;

Применение ПКС оказало позитивное влияние и при СД2: активность ПОЛ у животных,леченных ПКС, была достоверно ниже, чем у животных с модельными СД обоих типов.

Полученные данные свидетельствуют о высокой антиоксидантной и гиполипидемической активности изученного ПКС, которая, очевидно, достигается за счет полифенольных соединений винограда. Не исключено, что биологически активные компоненты стевии также вносят свой вклад в наблюдаемые эффекты.

Выводы

1. Развитие экспериментального сахарного диабета сопровождается изменениями обмена липидов в печени животных, которое находит свое отражение в повышении уровня липидов в сыворотке крови и может быть одним из механизмов проатерогенного характера экспериментального СД.

2. Экспериментальный СД сопровождается развитием оксидативного стресса.

3. Введение полифенольного концентрата, полученного из винограда с добавлением гликозидов Стевии, снижало содержание глюкозы и уменьшало проявления гиперлипидемии у животных с экспериментальным СД1 и СД2, однако не приводило к его нормализации.

4. Применение ПКС нормализовало показатели оксидантного баланса у животных с экспериментальными СД1 и СД2.

Литература

1. Зиммет П. Быстрый рост распространенности сахарного диабета II ти-па и угроза эпидемии этого заболевания в будущем / П. Зиммет // Укр. мед.часопис. – 2002. – № 3 (29). – С. 5.

2. Балаболкин М. И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета и применение витаминов и микроэлементов для их лечения и профилактики // Реф. сборник «Новости науки и техники». Вып. «Клин. эндокринология». – 2006. – № 6. – С. 1–7.

3. Bernford D.J. Safety evaluation of certain food additives: steviol glycosides. / WHO Food Additives Series. – 2006. P.120-144

4. Davidson M. A review of the current status of the management of mixed dyslipidemia associated with diabetes mellitus and metabolic syndrome. // Am.J.Cardiol.-2008.-Vol.22, N102.-P.19L-27L.

5. Caimi G.C.C., Lo Presti R. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine.// Curr Med Res Opin. -. 2003. –N 19. – P. 581-586.