

УДК 615.277:615.324 (26):577.19

Горбенко Н. И., Битютская О. Е.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ИЗ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ

Профилактику и лечение сахарного диабета называют глобальной медико-социальной проблемой следующего столетия, поскольку по прогнозам ВОЗ количество больных будет удваиваться каждые 15 лет [1]. В настоящее время около 10-30% всего населения в возрасте свыше 65 лет болеют сахарным диабетом, моральное и социальное бремя которого связано с развитием хронических осложнений – ретинопатий, нейропатий, нефропатий и преждевременной сосудистой патологии [2]. Учитывая, что инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНЗСД) составляет приблизительно 90% всех случаев заболевания, а диабетические ангиопатии развиваются с одинаковой частотой у больных 1, и 2 типом, понятно что основных финансовых затрат требует лечение ИНЗСД.

Патогенез сахарного диабета 2 типа мультифакториален и включает не только генетические (нарушения секреции инсулина), но и приобретенные (инсулинорезистентность) факторы.

В последние годы получены данные, свидетельствующие о возможности предупреждения или торможения развития как микро-, так и макрососудистых осложнений благодаря тщательному метаболическому контролю [3]. К сожалению, использование существующих сегодня сахароснижающих агентов (сульфаниламидов, бигуанидов и ингибиторов α -глюкооксидазы) не обеспечивает долгосрочной нормализации гликемии без повышения риска развития негативных побочных эффектов, что стимулирует расширение спектра антидиабетических препаратов [4].

Исследования в этой области проводятся по трем главным направлениям: поиск агентов, которые повышают секрецию инсулина, снижают инсулинорезистентность и блокируют основные биохимические процессы, ведущие к развитию диабетических ангиопатии [5, 6].

Особый интерес в этом плане представляют разработки, посвященные изучению антидиабетических веществ, созданных на основе природного сырья растительного и животного происхождения. Как правило, эта группа соединений уступает по выраженности гипогликемической активности веществам, полученным в результате химического синтеза. Однако низкая токсичность данного ряда препаратов делает их крайне привлекательными для использования с целью профилактики сахарного диабета у лиц, находящихся в группе риска, а также у больных с начальными стадиями заболевания. Кроме того, комбинированное

назначение веществ естественного происхождения с сахароснижающими препаратами (сульфаниламидами или бигуанидами) позволяет снизить дозу последних, необходимую для достижения нормогликемии, и, следовательно, ослабить их негативный побочный эффект.

Среди препаратов растительного происхождения наибольшее распространение получили диетические волокна, представляющие собой различные полисахариды. К ним относятся гуар, пектин, каррагинин, образующие при растворении в воде плотный гель и препятствующие всасыванию глюкозы в тонком кишечнике, что позволяет снизить риск постпрандиальной гипергликемии [7]. При хроническом применении гуар гум незначительно снижает базальную гликемию, возможно, в результате улучшения чувствительности к инсулину и повышения утилизации глюкозы периферическими тканями [8]. У больных с гиперхолестеринемией под влиянием диетических волокон наблюдалось снижение общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности [9]. В то же время препараты этой группы имеют ряд побочных эффектов и в основном включают такие нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, как вздутие, желудочные боли и дискомфорт, диарея. Выраженность этих негативных явлений снижается при продолжительном лечении.

Большое внимание в последние годы уделяется созданию антидиабетических веществ на основе морских продуктов животного происхождения. Так, $\omega 3$ незаменимые жирные кислоты, получаемые из жира холодноводных рыб, оказывают профилактическое действие в отношении атеросклеротических сосудистых заболеваний, снижая уровень триглицеридов и липопротеинов в плазме крови больных ИНЗСД [10]. Являясь важным компонентом клеточных мембран, они определяют такие ее свойства, как проницаемость, активность мембрано-связанных ферментов и рецепторов, а также устойчивость эритроцитов к деформации. Помимо этого, они выступают предшественниками простагландинов и лейкотриенов, которые влияют на сосудистую реактивность и проницаемость, агрегацию тромбоцитов и нервную проводимость [11].

К негативным побочным эффектам $\omega 3$ жирных кислот можно отнести высокое энергетическое содержание терапевтической дозы (до 300 ккал/день), что является нежелательным для тучных больных ИНЗСД [12].

С учетом возрастающего интереса к разработке безвредных антидиабетических средств на основе природного сырья настоящая работа имеет целью изучение сахароснижающих свойств оригинального препарата из мидии черноморской (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). Препарат представляет собой углевод-липид-белковый комплекс, в котором массовая доля белков составляет в среднем 33,4%, углеводов – 56,6%, липидов – 1,1%, минеральных веществ – 8,9% на сухие вещества. Белки представлены 20 аминокислотами (АК), на долю незаменимых приходится 41,9%, таурин – 3,2% суммарного содержания АК. В составе углеводов комплекса определены: глюкоза – 25,6%, урсоловые кислоты – 33,7%, пентозы – 15,3%, сialовые кислоты – 9,8% и аминокислоты – 22,7% от суммарного содержания углеводов. До 29% массы липидов в комплексе представлены насыщенными жирными кислотами, 37,3% – олеиновой кислотой, 38,3% – полиненасыщенными

жирными кислотами, среди которых 22,0% составляют $\omega 3$ кислоты, биологическая активность липидов (витамин F) достигает 13,7 ед. на 1 г жира. Среди минеральных веществ выявлены макроэлементы (г/кг): кальций (9,78), калий (2,84), магний (0,81) фосфор (2,02), натрий (12,37) и микроэлементы (мг/кг): марганец (14,10), железо (29,81), цинк (12,45), медь (7,20), кадмий (0,36), никель (6,75), хром (1,62), йод (1,87), кобальт (0,40). Комплекс термостабилен, разрушение его начинается через 45-50 мин кипячения, растворим в воде и физиологическом растворе, активная кислотность водного раствора изменяется в пределах 4,95-5,24, антиоксидантная активность – в пределах 16,5-17,4; комплекс характеризуется значительным отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом, что также свидетельствует о его АО-активности. Максимумы УФ-спектра поглощения обнаруживаются при длинах волн λ 210 и 250, 260 нм. Характер максимумов свидетельствует о гетерогенности исследуемого комплекса. Гель-хроматография позволила выявить три фракции с максимумами УФ поглощения при λ 210, λ 210, 260 и λ 280 нм. Препарат обладает антиоксидантным, мембранопротекторным, кроветворным действием [13-16].

При исследовании гипогликемической активности препарата использованы половозрелые крысы-самцы популяции Wistar массой 250-300 г.

Изучение сахароснижающих свойств вещества проводили на химически индуцированных моделях инсулиновой недостаточности, которые по патогенетическим признакам и клинической картине максимально приближены к инсулиннезависимому (ИНЗСД) сахарному диабету у человека.

С целью определения возможного превентивного эффекта препарата на развитие инсулиновой резистентности, которая является одной из главных причин формирования относительной инсулиновой недостаточности, изучаемое вещество в дозе 0,4 г/кг массы тела вводили перорально с помощью зонда в течение 14 дней одновременно с подкожными инъекциями дексаметазона (0,125 мг/кг). Известно, что введение этого глюкокортикоида по указанной схеме приводит к существенному повышению в плазме крови содержания инсулина и неэтерифицированных жирных кислот [17]. Кроме того, обработка дексаметазоном индуцирует продукцию островкового амилоидного полипептида – амилина, гормона, который синтезируется панкреатическими бета-клетками и является главной составной частью островкового амилоида, образующегося у больных ИНЗСД [18]. Физиологическое значение амилина еще до конца не выяснено, однако его супрессивный эффект относительно действия инсулина в скелетных мышцах, печени и торможение секреции инсулина в сочетании с амилогенными свойствами свидетельствует о возможной роли этого гормона в патогенезе ИНЗСД.

Препаратом сравнения в этой серии эксперимента выступал антигипергликемический препарат из группы бигуанидов — метформин, который оказывает сахароснижающий эффект, улучшая чувствительность печени и периферических тканей к действию инсулина [19]. Его применяли по схеме, аналогичной препарату.

Состояние глюкозного гомеостаза определяли на 14-й день эксперимента по уровню базальной гликемии, а также во время внутрибрюшинного теста

толерантности к глюкозе (ВБТТГ). Забор крови для анализа осуществляли из хвостовой вены крыс после предварительного 4 часового голодания, а также спустя 30, 60 и 120 минут после введения глюкозы (4 г/кг). Уровень глюкозы в крови экспериментальных животных определяли глюкооксидазным методом с применением анализатора «Эксан-Г», величину интегральной гликемии рассчитывали, суммируя показатели, полученные во всех временных интервалах (0, 30, 60, 120 мин) при проведении нагрузочного теста с глюкозой.

Оценку сахароснижающего эффекта исследуемого вещества при однократном применении проводили в соответствии с методическими рекомендациями [20] на модели относительной инсулиновой недостаточности, индуцируемой стрептозотоцином. У половозрелых крыс внутривенное введение стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг массы тела с предварительной внутрибрюшинной инъекцией никотинамида (230 мг/кг) приводит к развитию умеренной базальной гипергликемии без резкого снижения запасов панкреатического инсулина (до 40% от контрольного уровня). Данная модель характеризуется относительной недостаточностью секреции инсулина в ответ на повышенный уровень глюкозы и вторичной инсулинорезистентностью, т.е. воспроизводит основные патогенетические признаки ИНЗСД у человека [21].

Содержание сахара в крови экспериментальных животных измеряли через 2, 4 и 6 часов после перорального введения исследуемого вещества (0,4 г/кг), контрольные животные получали аналогичный объем физиологического раствора.

Полученные результаты обработаны статистически с применением критерия Стьюдента [22].

Изучение возможного превентивного эффекта препарата на развитие толерантности к глюкозе проводили на модели инсулиновой резистентности, индуцированной дексаметазоном. В настоящее время нарушение толерантности к глюкозе (НТГ) считают одним из самых надежных прогностических маркеров развития ИНЗСД. Так, по данным ВОЗ, через 5-10 лет после установления НТГ у 60 % наблюдаемых пациентов был выявлен ИНЗСД [23]. НТГ указывает на то, что степень инсулиновой резистентности и инсулиновой секреции находятся в состоянии ненадежного баланса. Дальнейшее ухудшение инсулиновой резистентности или снижение инсулиновой секреции приводит к прогрессированию гипергликемии и развитию ИНЗСД [24]. В связи с этим, фармакологическую коррекцию толерантности к глюкозе рассматривают как один из важнейших способов предупреждения и лечения сахарного диабета.

В результате проведенных исследований установлено, что двухнедельная обработка препаратом тормозит развитие толерантности к глюкозе, индуцируемое дексаметазоном. Так, при проведении внутрибрюшинного нагрузочного теста с глюкозой (4 г/кг массы тела) подъем гликемических кривых через 30, 60 и 120 минут у животных, получавших препарат, был существенно ниже по сравнению с группой, которой вводили placebo (рисунок). Подтверждением этого являются также показатели интегральной гликемии, которые под влиянием препарата снижались почти в два раза и приближались к значениям, наблюдаемым у интактного контроля (табл. 1). Следует отметить, что по степени выраженности

гипогликемического действия изучаемое вещество в данной серии экспериментов не уступало препарату сравнения метформину.

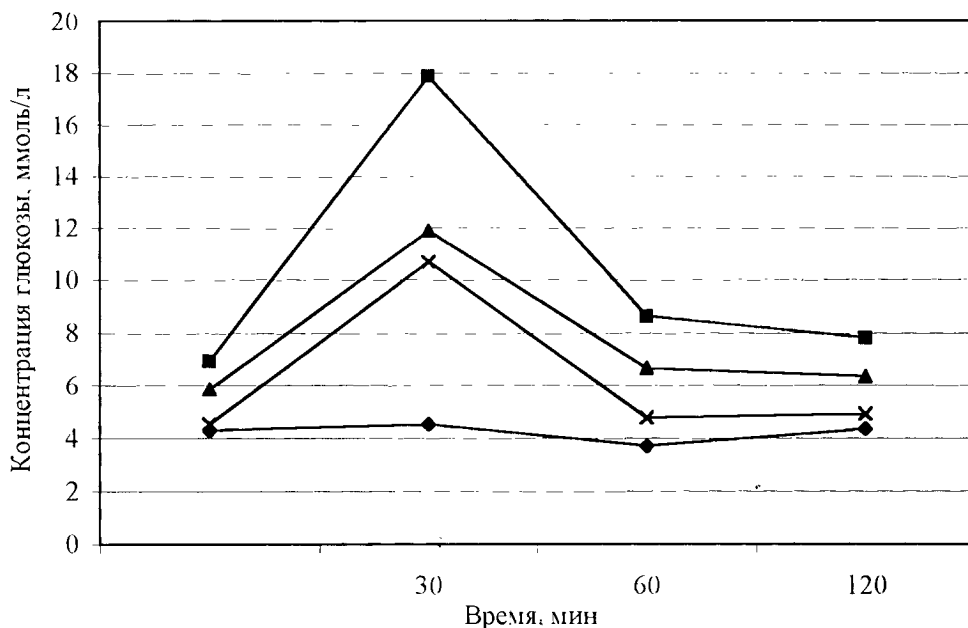


Рис. 1. Гликемические кривые при проведении ВБТТГ у крыс:

- ◆ интактный контроль;
- ▲ дексаметазон+метформин;
- дексаметазон+placebo;
- × дексаметазон+препарат.

Обнаруженный протективный эффект препарата в отношении развития интолерантности к глюкозе, индуцированной дексаметазоном, по-видимому, связан с наличием у него антиоксидантных свойств. Известно, что гиперинсулинемия приводит к развитию «оксидативного стресса», который в свою очередь может быть ответственным за нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности [25].

Применение сахароснижающих пероральных препаратов эффективно только у больных ИНЗСД с умеренной гипергликемией (< 14 ммоль/л). Поэтому для оценки сахароснижающих свойств препарата была выбрана модель стрептозотоцинового диабета с предварительным введением никотинамида, который защищает панкреатические бета-клетки от тотальной деструкции цитостатиком и позволяет сохранить 40 % инсулинпродуцирующего аппарата поджелудочной железы [21].

Проведенные эксперименты показали, что через 2 часа после перорального применения препарата уровень глюкозы в крови диабетических крыс был снижен на 16,44 %, достигал максимального падения через 4 часа (30,6%), которое сохранялось до 6 часов от начала эксперимента. Следует отметить, что содержание сахара в крови животных, получавших препарат через 2 и 4 часа, достоверно

снижалось по сравнению с диабетической группой, обработанной плацебо, хотя и не достигало уровня глюкозы, наблюдаемого в интактном контроле (табл.2).

Таблица 1

Динамика гликемии во время теста толерантности к глюкозе у крыс, получавших препарат, метформин и плацебо одновременно с инъекциями дексаметазона ($X \pm Sx$)

Характер воздействия	Доза, г/кг	П	Базальный уровень, ммоль/л	Гликемия крови (ммоль/л) через ... мин после введения глюкозы	
				30	60
Интактный контроль	—	5	4,28±0,28	6,93±0,44 ²⁾	5,86±0,40 ²⁾
Дексаметазон+ плацебо	—	5	4,52±0,57	17,86±0,32 ¹⁾	11,90±0,17 ¹⁾
Дексаметазон+ метформин	0,2	5	3,70±0,42	8,61±1,06 ²⁾	6,64±0,55 ²⁾
Дексаметазон+ препарат...	0,4	5	4,36±0,22	7,80±0,32	6,34±0,62 ²⁾
				120	
Интактный контроль	—	5	4,28±0,28	4,55±0,19 ²⁾	21,63±1,21 ²⁾
Дексаметазон+ плацебо	—	5	4,52±0,57	10,70±0,30 ¹⁾	44,13±1,16 ¹⁾
Дексаметазон+ метформин	0,2	5	3,70±0,42	4,78±0,27 ²⁾	23,73±2,13 ²⁾
Дексаметазон+ препарат...	0,4	5	4,36±0,22	4,91±0,59 ²⁾	23,4±23,11 ²⁾

Примечание:

¹⁾ - достоверность различий по сравнению с интактным контролем, $P < 0,05$;

²⁾ - достоверность различий по сравнению с ИНЗСД+плацебо.

Выявленный умеренный гипогликемический эффект препарата, возможно, связан с наличием в его составе amino- и трикарбоновых кислот, которые, проникая в панкреатическую бета-клетку, метаболизируются в цикле Кребса с образованием дополнительного количества АТФ. В то же время известно, что изменение отношения внутриклеточной концентрации АТФ/АДФ является сигналом для закрытия АТФ-чувствительных K^+ -каналов, деполяризации мембраны, открытию вольтажзависимых Ca^{++} -каналов, вхождению ионов Ca^{++} внутрь клетки и экзоцитозу инсулина [26]. Т.е. инсулинотропный эффект препарата может быть обусловлен улучшением энергетического баланса панкреатических бета-клеток, что в настоящее время является новым направлением в фармакологической коррекции метаболических нарушений у больных ИНЗСД.

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА
ИЗ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ**

Таблица 2

Динамика гликемии у крыс с ИНЗСД при однократном введении препарата ($X \pm Sx$)

Характер воздействия	П	Базальная гликемия, ммоль/л	После перорального введения препарата через... часов	
			2	
			ммоль/л	% снижения
Интактный контроль	5	4,08±0,04 ²⁾	3,89±0,02 ²⁾	4,70±0,80
ИНЗСД+ placebo	5	8,82±0,35 ¹⁾	8,44±0,33 ¹⁾	4,36±0,60
ИНЗСД+ препарат (0,4г\кг)	5	8,94±0,61 ¹⁾	7,47±0,59 ¹⁾	16,44±0,85 ¹⁾²⁾

Продолжение таблицы

Характер воздействия	После перорального введения препарата через... часов			
	4		6	
	ммоль/л	% снижения	ммоль/л	% снижения
Интактный контроль	3,70±0,04 ²⁾	8,82±0,89	3,62±0,02 ²⁾	11,04±1,28
ИНЗСД+ placebo	7,97±0,28 ¹⁾	9,64±0,88	7,66±0,28 ¹⁾	13,1±1,70
ИНЗСД+ препарат (0,4г\кг)	6,22±0,52 ¹⁾²⁾	30,60±2,67 ¹⁾²⁾	6,01±0,46 ¹⁾²⁾	32,9±1,60 ¹⁾²⁾

Примечание:

¹⁾ – достоверность различий по сравнению с интактным контролем, $P < 0,05$;

²⁾ – достоверность различий по сравнению с ИНЗСД + placebo, $P < 0,05$.

Таким образом, профилактическое 14-дневное применение препарата подобно метформину предупреждает развитие нарушений толерантности к глюкозе, индуцируемых дексаметазоном; препарат оказывает умеренный сахароснижающий эффект при однократном введении животным с относительной инсулиновой недостаточностью (модель ИНЗСД).

Дальнейшее изучение антидиабетических свойств препарата позволит рекомендовать его для использования в качестве пищевой добавки с целью профилактики сахарного диабета 2 типа, а также для нормализации метаболических нарушений на ранних стадиях заболевания.

Список литературы

1. World Health Organization: Diabetes Mellitus: report of a WHO Study Group. Technical Report Series 727. WHO, Geneva. – 1985. – 58 p.
2. Harris M. Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues // *Diabetes Care*. – 1993. – Vol. 16. – P. 642-652.
3. Fuller J. M., Shipley J. et al. Mortality from coronary heart disease and stroke in relation to degree of hyperglycemia // *Br. Med. J.* – 1983. – Vol. 27 – P. 867-870.
4. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complication // *Diabetes Care*. – 1992. – Vol. 15 – P. 1835-1843.
5. Bressler R., Jonson D. New pharmacological approaches to therapy of NIDDM // *Diabetes Care*. – 1992. – Vol. 15. – P 792-805.
6. Rachman J., Turner R. Drugs on the horizon for treatment of type 2 diabetes // *Diabetic Medicine*. – 1995. – Vol. 25. – P. 467-578.
7. Mc Ivor M. E., Cummings C. C., Leo T. A., Mendeloft A. I. Fattening postprandial blood glucose response with guar gum: acute effects // *Diabetes Care*. – 1985. – Vol. 8. – P274-278.
8. Ray T. K., Mausell R. M., Knight L. C. Long-term effects of dietary fiber on glucose tolerance and gastric emptying in non-insulin-dependent diabetic patients // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1983. – Vol. 37. – P. 376-381.
9. Aro A., Vutilainen E., Hersio K. et al. Improved diabetic control and hypocholesterolaemic effect induced by long-term dietary supplementation with guar gum in Type 2 (insulin-dependent) diabetes // *Diabetologia*. – 1981. – Vol. 21. – P. 29-33.
10. Axelrod L. Omega 3-fatty acids in diabetes mellitus. Gift from the sea? // *Diabetes*. – 1989. – Vol. 38. – P. 539-543.
11. Horrobin D. F. The roles of essential fatty acids in the development of diabetic neuropathy and other complications of diabetes mellitus // *Prostaglandin Leukotriene Synthase and Essential Fatty Acids: Review*. – 1988. – Vol. 31. – P. 181-197.
12. Glauber A., Wallace P., Griver R. et al. Adverse metabolic effect of omega-3 fatty acids in NIDDM // *Ann. Int. Med.* – 1988. – Vol. 108. – P. 663-668.
13. Битютская О. Е., Губанова А. Г., Симонова Л. И. и др. Биополимеры гидробактерий как основа для препаратов лечебно-профилактического назначения // Тез. докл. V Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 21-25 апреля 1998. – М., 1998. – С. 348.
14. Губанова А. Г., Битютская О. Е., Симонова Л. И. и др. Биополан – новый биологический радиопротектор из моллюсков // Тез. докл. V Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 21-25 апреля 1998. – М., 1998. – С. 360-361.
15. К вопросу о биохимическом составе биопрепаратов из мидий и рапаны / Губанова А. Г., Битютская О. Е., Борисова Л. П., Даценко З. М. // Тр. ЮгНИРО. – 1995. – Т. 41. – С. 165-170.
16. Шевченко И. Н. Антиоксидантная защита облученного организма. Гидробактерии Азово-Черноморского бассейна // Тез. докл. Международной конференции «Укрытие-98», 25-27 ноября 1998. – Киев, 1998. – С. 118.
17. Novelli M., Barbera M., Fierabraoci V. et. al. Effects of age and dexamethasone treatment on insulin secretion from isolated perfused rat pancreas // *Diabetologia*. – 1996. – Suppl. 17 – P. A24.
18. Cooper G., Clark A. et al. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1987. – Vol. 84. – P. 34-38.

19. Dunn J. C., Peters H. D. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in NIDDM // *Drugs*. – 1995. – Vol. 49. – №5. – P. 721-749.
20. Полторак В. В. Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых антидиабетических веществ: Методические рекомендации. – Харьков. 1991. – 20 с.
21. Taouis M., Broca C., Masiello P., Roye M. et al. Delayed occurrence of insulin resistance in a new experimental model of NIDDM // *Diabetologia*. – 1998. – Vol. 41. - Suppl.1. – P. A198.
22. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина. - 1975. – 295 с.
23. Генес В. С. Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. - М.: Медицина. – 1964. – 79 с.
24. Bennet P. Primary prevention of NIDDM a practical reality // *Diabetes Metab. Rev.* – 1991. - Vol. 13. – P. 105-111.
25. Paolisso G., Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: is there a relation // *Diabetologia*. – 1996. – Vol. 39. – №3. – P. 357-363.
26. Malaisse W. Islet nutrient metabolism // *Diabetes in the XXI century*. – 1994. – P. 22-23.

Статья поступила в редакцию 05.01.2001