

УДК 616.379-008.64-092.9-085.322

DOI: 10.34215/1609-1175-2021-3-59-62

Биохимические маркеры влияния сока шикши черной (*Empetrum nigrum*) на течение аллоксанового диабета

Н.В. Плаксен, Л.В. Устинова, С.Г. Пономарчук, Л.Н. Логунова, О.Н. Ли, Е.А. Мотлукх

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

Цель – анализ фармакотерапевтической эффективности сока шикши черной при сахарном диабете (СД) в эксперименте. **Материал и методы.** Использовали химическую модель СД с однократным введением раствора аллоксана (100 мг/кг) на крысах линии Вистар массой 280–320 г. Опытные группы животных получали сок шикши черной и стандартный сосудокрепляющий препарат рутин (бигликозид кверцетина). Определяли уровни глюкозы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови, оценивали состояние перекисного окисления липидов (по малоновому диальдегиду) и индекс антирадикальной активности без нагрузки и при глюкозо-толерантном тесте. **Результаты.** Установлено гипогликемическое, антиоксидантное и панкреозащитное действие сока шикши черной. **Заключение.** Полученные данные позволяют рекомендовать дальнейшее изучение антидиабетического потенциала шикши черной с перспективой использования для предотвращения сосудистых изменений при СД 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, эксперимент, *Empetrum nigrum*, перекисное окисление липидов, антирадикальная активность

Поступила в редакцию 18.07.2021. Получена после доработки 19.08.2021. Принята к печати 03.09.2021

Для цитирования: Плаксен Н.В., Устинова Л.В., Пономарчук С.Г., Логунова Л.Н., Ли О.Н., Мотлукх Е.А. Биохимические маркеры влияния сока шикши черной (*Empetrum nigrum*) на течение аллоксанового диабета. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2021;3:59–62. doi: 10.34215/1609-1175-2021-3-59-62

Для корреспонденции: Плаксен Наталья Васильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры фармации ТГМУ (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2); ORCID: 0000-0002-6885-004X; e-mail: natalya.plaksen@mail.ru

Biochemical markers influence of black shiksha juice (*Empetrum nigrum*) on the process of alloxan diabetes

N.V. Plaksen, L.V. Ustinova, S.G. Ponomarchuk, L.N. Logunova, O.N. Li, E.A. Motlukh

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Objective: The analysis of the pharmacotherapeutic effectiveness of *Empetrum nigrum* juice in case of diabetes mellitus (DM) in the experiment. **Methods:** DM chemical model applying single alloxan injection (100 mg/kg) was used for rats of Vistar line weighing 280–320 grams. Experimental animal groups got *Empetrum nigrum* juice and standard antidiabetic drug – rutin (quercetin biglycoside). The level of glucosemia and alanine aminotransferase in blood serum was measured. The state of lipids peroxidation (by malonic dialdehyde) and antiradical activity index off-load and applying glucose-tolerance test was estimated. **Results:** Hypoglycemic, antioxidant and pancreas-protective effect of *Empetrum nigrum* juice was defined. **Conclusions:** Received data allows recommending further antidiabetic potential of *Empetrum nigrum* with the perspective of using it in the therapy of diabetes mellitus of the second type.

Keywords: diabetes mellitus, experiment, *Empetrum nigrum*, lipid peroxidation, antiradical activity

Received 18 July 2021; Revised 18 August 2021; Accepted 3 September 2021

For citation: Plaksen NV, Ustinova LV, Ponomarchuk SG, Logunova LN, Li ON, Motlukh EA. Biochemical markers influence of black shiksha juice (*Empetrum nigrum*) on the process of alloxan diabetes. *Pacific Medical Journal.* 2021;3:59–62. doi: 10.34215/1609-1175-2021-3-59-62

Corresponding author: Natalya V. Plaksen, MD, PHD, associate professor, Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave., Vladivostok, 690002, Russian Federation); ORCID: 0000-0002-6885-004X; e-mail: natalya.plaksen@mail.ru

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в мире наблюдается постоянный рост заболеваемости сахарным диабетом (СД). В экономически развитых странах количество вновь диагностированных случаев данной нозологии составляет от 6 до 10 % по отношению к общему числу больных, то есть удвоение популяции происходит каждые 10–15 лет, это становится не только медицинской, но и социальной проблемой [1]. В отличие от СД 1-го типа СД 2-го типа характеризуется медленным развитием

патологического процесса, что открывает возможности для его эффективной профилактики. Прием растительных лекарственных средств, содержащих ряд биологически активных веществ, позволяет предотвратить метаболический синдром и развитие СД 2-го типа [2–4].

На кафедре фармации ТГМУ ведутся исследования фармакологических свойств шикши черной (*Empetrum nigrum*) из семейства Вересковых, произрастающей на территориях Камчатского края, Сахалинской

и Магаданской областей. Ранее было показано регулирующее влияние сока из плодов шикши на метаболизм минеральных веществ [5]. Положительная динамика кальций-фосфорного обмена на фоне приема продуктов переработки плодов упомянутого растения позволяет рассматривать их в качестве профилактических средств при остеопорозе. Одна из причин остеопороза – эндокринные нарушения, в том числе СД [6]. Для изучения этого заболевания в эксперименте разработана его химическая модель с использованием аллоксана, избирательно воздействующего на β -клетки островков поджелудочной железы [1].

Целью настоящей работы стал анализ фармакотерапевтической эффективности сока шикши черной при СД в эксперименте.

Материал и методы

Лабораторные крысы линии Вистар массой 280–320 г содержались в виварии Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, где получали стандартное питание в виде комбикорма «Дельта Фидс». Исследование было спланировано в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» и директивы Европейского союза по защите животных, используемых в научных целях (2010/63/EU). Дизайн исследования утвержден на заседании комиссии по биоэтике Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае (протокол № 1 от 20.10.2020). СД моделировали путем однократной внутривенной инъекции свежеприготовленного раствора аллоксана (Индия) в дозе 100 мг/кг через 20 дней от начала эксперимента. Гипергликемию у животных вызывали введением 20 % раствора глюкозы (2,5 г/кг) внутрь через зонд за 45 минут до забора крови через 7 дней после моделирования заболевания [7].

Крысы были разделены на четыре группы по девять особей в каждой:

1-я группа – биологический контроль: интактные животные на стандартном режиме питания;

2-я группа – контроль: животные с моделью СД, которым в течение эксперимента вводили через зонд воду в объеме, эквивалентном объему сока шикши черной;

3-я группа: животные с моделью СД, которым вводили сок плодов шикши через зонд в экспериментально-терапевтической дозе (2 мл на 200 г массы тела) на протяжении всего эксперимента;

4-я группа: животные с моделью СД, которым дважды в день давали биофлавоноид рутин (бигликозид кверцетина) на эмульгаторе Tween-80 через зонд в дозе 100 мг/кг в сутки в течение всего эксперимента.

Крыс выводили из опыта под эфирным наркозом на 27-й день эксперимента. В сыворотке крови посредством анализатора Mindray BS-480 с помощью стандартного набора реактивов фирмы-производителя

определяли содержание глюкозы и аланинаминотрансферазы. Для контроля состояния перекисного окисления липидов в гомогенатах печени с помощью цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой измеряли концентрацию малонового диальдегида [8]. При определении индекса антирадикальной активности антиоксидантов для построения калибровочного графика использовали растворы стандартного антиоксиданта (тролокс). Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2550 с термостатированной ячейкой [9, 10].

Обработка полученных данных осуществлялась методом малой выборки с вычислением среднего значения (M) и его стандартной ошибки (s). Показатели сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента при уровне значимости нулевой гипотезы $p \leq 0,05$ [11].

Результаты исследования

Через 7 дней после введения аллоксана происходило достоверное увеличение (на 39,6 %) уровня глюкозы крови во 2-й группе животных, а при дополнительной нагрузке глюкозой на 45-й минуте исследования глюкоземия увеличивалась на 48 %. В 3-й и 4-й группах при нагрузочном тесте уровень глюкозы достоверно повышался на 28 и 33 %, соответственно. В группе животных, которым вводили сок из плодов шикши, базальный уровень глюкозы по сравнению со 2-й группой снижался на 30 %. Уровень аланинаминотрансферазы в сыворотке крови также измеряли до и после нагрузки глюкозой. В контрольной группе он повышался на 34 и 56 % (без нагрузки и с нагрузкой, соответственно). Содержание фермента в 3-й и 4-й группах по сравнению с контролем до введения глюкозы снижалось на 29 и 37 %, и после нагрузочного теста разница становилась недостоверной (табл.).

В гомогенатах печени у крыс 2-й группы (контроль) содержание продукта перекисидации липидов – малонового диальдегида – возрастало на 68 % без нагрузки и на 42 % – с нагрузкой глюкозой. В этой же группе происходило снижение индекса антирадикальной активности на 54,8 и 39,6 % без нагрузки и с нагрузкой, соответственно. У животных, получавших сок шикши, наблюдали достоверное повышение концентрации малонового диальдегида в гомогенатах ткани печени по сравнению с интактной группой (на 44 и 14 % без нагрузки и с нагрузкой, соответственно) и снижение интенсивности антирадикальной защиты на 37 % без нагрузки глюкозой. Также в 3-й группе определялось повышение индекса антирадикальной активности на 38 и 49 % по сравнению с контролем. В 4-й группе экспериментальных животных концентрация малонового диальдегида в ткани печени снижалась на 25 % (и базально, и после глюкозо-толерантного теста) с повышением индекса антирадикальной активности на 44 % только по сравнению со 2-й (контрольной) группой (табл.).

Таблица

Влияние сока шикши черной на биохимические показатели сыворотки крови и ткани печени крыс при аллоксановом СД ($M \pm s$)

Показатель ^а	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
Глюкоза крови, ммоль/л	5,3±0,6	7,4±0,6 ^б	5,4±0,5 ^в	6,2±0,3
Глюкоза крови (ГТТ), ммоль/л	6,4±0,5	9,5±0,9 ^б	7,7±0,3 ^б	7,9±0,9 ^б
АЛТ крови, Ед/л	73,2±2,7	97,9±9,8 ^б	69,4±6,2 ^в	62,2±2,8 ^в
АЛТ крови (ГТТ), Ед/л	69,2±2,9	107,9±9,4 ^б	92,4±8,3 ^б	96,6±8,9 ^б
МДА, нмоль/г	5,9±0,7	9,9±1,1 ^б	8,5±0,4 ^б	7,4±0,4 ^в
МДА (ГТТ), нмоль/г	6,6±0,5	9,4±0,7 ^б	7,6±0,3 ^{б, в}	7,1±0,4 ^в
ИАА, мкмоль/г	143,8±2,6	65,1±1,4 ^б	90,0±2,8 ^{б, в}	93,5±2,2 ^{б, в}
ИАА (ГТТ), мкмоль/г	112,3±2,1	67,8±1,7 ^б	101,2±2,2 ^в	97,7±1,2 ^в

^а ГТТ – глюкозо-толерантный тест (нагрузочный), АЛТ – аланинаминотрансфераза, МДА – малоновый диальдегид, ИАА – индекс антирадикальной активности.

^б Разница с 1-й группой (интактной) статистически значима.

^в Разница со 2-й группой (контрольной) статистически значима.

Обсуждение полученных данных

Экспериментальное моделирование СД имеет определенные сложности, связанные с природой заболевания и механизмом диабетогенного действия токсикантов, а также с близостью смертельной и диабетогенной доз аллоксана и компенсаторными возможностями организма крыс по нормализации углеводного обмена [12]. Модель с использованием химических веществ (аллоксан, стрептозоцин и др.), избирательно поражающих β -клетки островков Лангерганса, наиболее распространена в экспериментальной практике. Однако до настоящего времени дозировка этих веществ не обоснована, и при чрезмерном поражении ткани поджелудочной железы возможна гибель животных. В настоящей работе при введении аллоксана в дозе 100 мг/кг были получены планируемые сдвиги биохимических показателей. Уровень аланинаминотрансферазы имеет здесь важное диагностическое значение, так как она широко представлена в тканях организма, в первую очередь – в печени. В нашем эксперименте в контроле (2-я группа) зарегистрировано усиление цитолиза с повышением активности этого фермента в 1,4 раза. Также показана интенсификация перекисного окисления липидов, которое, как известно, лежит в основе повреждения биомембран и запускает процесс разрушения гепатоцитов. Поэтому при выполнении нагрузочного теста в группе животных, получившей сок шикши, наблюдалась гипергликемия, связанная с нарушением структуры и функции островков поджелудочной железы и снижением их компенсаторных возможностей.

В патогенезе СД, в том числе индуцированного аллоксаном, важную роль играет образование свободных радикалов [12]. Одной из основных причин гибели клеток поджелудочной железы считается низкий уровень их антиоксидантной защиты [1]. Исследования, проведенные нами ранее, доказали антиоксидантную активность продуктов из растений семейства

Вересковых, содержащих флавоноиды, тритерпеноиды (урсоловая и олеановая кислоты), сапонины, витамины и др. Эти факты подтверждаются и данными специальной литературы [13, 14]. Флавоноидный компонент растительного сырья, обладая антиоксидантным действием, оказывает мембраностабилизирующий эффект [12]. Так, в проведенном эксперименте индекс антирадикальной активности был выше у животных, получавших сок шикши, и оказался сопоставимым с таковым в 4-й экспериментальной группе, получавшей рутин: повышение уровня антирадикальной активности в 1,4 раза и уменьшение концентрации малонового диальдегида в ткани печени в 1,3 раза. Таким образом, данные, полученные в процессе настоящего эксперимента, позволяют рекомендовать дальнейший анализ потенциала шикши черной для использования продуктов ее переработки для предотвращения сосудистых изменений при СД 2-го типа.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – НВП, СГП, ОНЛ

Сбор и обработка материала – НВП, ЕАМ

Статистическая обработка – НВП

Написание текста – НВП

Редактирование – ЛВУ, ЛНЛ, ОНЛ

Литература / References

1. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета. Часть I. Аллоксановый диабет. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2013;3:26–9. [Mozheyko LA. Experimental models for the studying of diabetes mellitus Part I. Alloxan diabetes. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2013;3:26–9 (In Russ).]
2. Зверев Я.Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Особенности и проблемы фармакокинетики. *Обзоры по клинической*

- фармакологии лекарственной терапии. 2017;15(2):4–11. [Zverev YaF. Flavonoids through the eyes of a pharmacologist. Features and problems of pharmacokinetics. *Reviews on Clinical Pharmacology of Drug Therapy*. 2017;15(2):4–11 (In Russ).]
3. Лютикова М.Н., Ботиров Э.Х. Химический состав и практическое применение ягод брусники и клюквы. *Химия растительного сырья*. 2015;2:5–24. [Lyutikova MN, Botirov EK. The chemical composition and the practical application of berries cranberries and cranberry. *Chemistry Natural Comounds*. 2015;2:5–24 (In Russ).]
 4. Вяткин А.В., Чугунова О.В. Напитки антиоксидантной направленности как метод борьбы с окислительным стрессом. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2016;6(4):119–26. [Vyatkin AV, Chugunova OV. Drinks antioxidant orientation as a method of combating oxidative stress. *University News: Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016;6(4):119–26 (In Russ).]
 5. Плаксен Н.В., Устинова Л.В., Степанов С.В., Пономарчук С.Г., Парфенова Е.А. Коррекция экспериментального остеопороза соком и шротом плодов шикши черной. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018;4:79–81 [Plaksen NV, Ustinova LV, Stepanov SV, Ponomarchuk SG, Parfenova EA. Correction of experimental osteoporosis with juice and oil meals of *Empetrum nigrum* fruits. *Pacific Medical Journal*. 2018;4:79–81 (In Russ).]
 6. Мистяков М.В., Бардымова Т.П., Цыреторова С.С. Сахарный диабет и остеопороз. *Сибирский медицинский журнал*. 2015;6:47–52. [Mistyakov MV, Bardimova TP, Tsyretorova SS. Diabetes mellitus and osteoporosis. *Siberian Medical Journal*. 2015;6:47–52 (In Russ).]
 7. Барнаулов О.Д. Сравнительная оценка влияния фитопрепаратов из растений флоры России на концентрацию инсулина и глюкозы в крови крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом. *Психофармакология и биологическая наркологию*. 2008;8(3–4):2484–90. [Barnaulov OD. The comparative estimation influence of drugs from Russian flora plants on insuline and glucose blood level in alloxane-diabetic rats. *Psychopharmacology and Biological Narcology*. 2008;8(3–4):2484–90 (In Russ).]
 8. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии* / под. ред. В.Н. Орехович. М.: Медицина, 1977:66–8. [Stalnaya ID, Garishvili TG. Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoshchyu tiobarbiturovoj kisloty. *Sovremennye Metody v Biohimii*. Moscow: Medicina; 1977:66–8 (In Russ).]
 9. Bartosz G, Janaszewska A, Ertel D, Bartosz M. Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity. *Biochem Mol Biol Int*. 1998;46:519–28.
 10. Buege JL, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302–10.
 11. Колдаев В.М., Кропотов А.С. *Основные приемы статистики в медико-биологических исследованиях*. Владивосток: Медицина ДВ, 2019. [Koldaev VM, Kropotov AS. *Main techniq of biomedical research*. Vladivostok: Medicina DV; 2019 (In Russ).]
 12. Джафарова Р.Э., Гараев Г.Ш., Джафаркулиева З.С. Действия экстракта листьев черники обыкновенной на течение патологического процесса аллоксан-индуцированного сахарного диабета. *Фундаментальные исследования*. 2010;4:36–43. [Dzhafarova RE, Qarayev GSh, Dzhafarkulieva ZS. Action of extract of *Vaccinium myrtillus* on the pathological process of diabetes mellitus modeling with alloxane. *Basic Researches*. 2010;4:36–43 (In Russ).]
 13. Плаксен Н.В., Устинова Л.В., Степанов С.В., Трофимова А.А., Горюва Н.Я. Гепатопротекторный эффект композиции энтеросорбента и природного антиоксиданта. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;2:79–81. [Plaksen NV, Ustinova LV, Stepanov SV, Trofimova AA, Gorovaya NY. Hepatoprotective effect of enterosorbent composition and natural antioxidant. *Pacific Medical Journal*. 2015;2:79–81 (In Russ).]
 14. Яшин Я.Н., Веденин А.Я., Яшин А.Я. Лекарственные препараты, лекарственные растения и БАДы с антиоксидантной активностью. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017;17(3):496–504. [Yashin YaN, Vedenin AY, Yashin AY. Medical products, medicinal plants and BUDe with antioxidant activity. *Sorption and Chromatographic Processes*. 2017;17(3):496–504 (In Russ).]