

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
НПА «Одесская биотехнология»



И.А. МУСОНОВА

«22» июня 2012 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
ГУ «Інститут стоматології НАМН»,
професор, чл.-кор. НААН



А.П. ЛЕВИЦКИЙ

«22» июня 2012 г.

ОТЧЕТ

об исследовании лечебно-профилактического действия
пасты черники при экспериментальном сахарном диабете 2 типа

(по договору № 028 с ФОП «Шмигельская» от 14.05.2012 г.)

Научный руководитель НИР,
д.б.н., проф., чл.-корр. НААН

А.П. Левицкий

Ответственный исполнитель НИР,
зав. лаб. технологий, к.техн.н.

И.А. Селиванская

Одесса – 2012

СОДЕРЖАНИЕ

	С.
1. Теоретическое обоснование НИР	3
2. Материалы и методы исследования	4
3. Гипогликемическое действие черники	5
4. Антидисбиотическое действие черники	6
5. Антиоксидантное действие черники	10
Заключение	13
Список литературы	14

1 ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НИР

Актуальность проблемы сахарного диабета с каждым годом увеличивается в связи с неуклонным ростом заболеваемости и серьезностью осложнений диабета, увеличивающих риск смерти в несколько раз [1–3].

Подавляющее число больных сахарным диабетом (почти 90 %) страдает от сахарного диабета 2 типа (СД 2), при котором на первый план выступает инсулинерезистентность, то есть нечувствительность клеток к инулину [4, 5].

Среди причин, вызывающих развитие СД 2, в последние годы получила признанная дисбиотическая концепция патогенеза как самого заболевания, так и его осложнений, особенно, сосудистых [6–8].

Одним из существенных антидисбиотических факторов являются полифенолы, которые обладают широким спектром лечебно-профилактического действия при сахарном диабете [9–11].

Богатейшим источником полифенолов является черника, ягоды которой содержат их почти 10 %. Среди полифенолов ягод черники доминируют хлорогеновая кислота и биофлавоноиды, обладающие Р-витаминной активностью.

Кроме того, ягоды черники являются одним из самых богатых источников витамина Е, превосходя по его содержанию в десятки раз все остальные ягоды [12].

Поскольку до настоящего времени не проводились научные исследования по использованию черники в качестве лечебно-профилактического средства при сахарном диабете, целью настоящей работы стало изучение возможности применения пасты из ягод черники в качестве лечебного средства при сахарном диабете 2 типа (СД 2).

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Паста черники, полученная по новой, более эффективной, технологии, была предоставлена Заказчиком – НПП «Институт «Текмаш» (г. Херсон).

Экстракт из пасты черники получали путем перемешивания 1 части пасты и 1 части дистиллированной воды в течение 30 минут с последующей фильтрацией через 4 слоя марли. Концентрация экстрактивных веществ в экстракте составила 4,9 %.

Исследование антидисбиотического действия пасты черники и водного экстракта из пасты было проведено на 28 крысах линии Вистар (самцы, 5 месяцев, живая масса 260 ± 10 г). Все крысы были распределены в 4 группы: 1-ая – норма (интактные), 2-ая, 3-ья и 4-ая – сахарный диабет 2 типа, который вызывали с помощью протамина [13]. Крысы 3-ей группы с первого дня опыта получали с кормом пасту черники в дозе 8 г/кг ежедневно, а крысы 4-ой группы получали с питьевой водой экстракт из пасты черники в дозе 8 мл/кг.

Крыс умерщвляли на 14-й день опыта под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца.

Получали сыворотку крови и ткань печени. В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы [14], содержание малонового диальдегида (МДА) [15], активность эластазы [16], каталазы [17], уреазы [18], лизоцима [19]. В гомогенате печени (50 мг/мл 0,05 М трис-НСl-буфера pH 7,5) определяли содержание МДА, активность эластазы, уреазы, лизоцима и каталазы. По соотношению активности каталазы и концентрации МДА рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс АГИ [20], а по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима рассчитывали по методу Левицкого [21] степень дисбиоза.

3 ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЧЕРНИКИ

Результаты определения концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс с СД 2 представлены в таблице 1. Из этих данных видно, что введение с кором пасты черники снижает содержание глюкозы в крови, которое достоверно повышается при моделировании СД 2 ($p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены нами и в опыте на сахарным диабетом 1 типа, который воспроизводили с помощью аллоксана (см. «Отчет» по договору № 067А).

Таблица 1 – Влияние пасты черники на содержание глюкозы в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа (СД 2)

№№ п/п	Группа	Концентрация глюкозы, ммоль/л	p	p_1
1	Норма (интактные)	$5,92 \pm 0,19$		
2	СД 2	$7,12 \pm 0,20$	$< 0,001$	
3	СД 2 + паста черники	$6,45 \pm 0,34$	$> 0,05$	$> 0,05$
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	$5,55 \pm 0,50$	$> 0,3$	$< 0,05$

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.
2. p_1 – показатель достоверности различий с группой № 2.

Введение цельной пасты черники снижает уровень глюкозы в крови на 9–10 %, тогда как водный экстракт, который содержит в 3 раза меньше веществ, чем цельная паста, снижает его на 22 %, практически нормализуя этот важнейший показатель гомеостаза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что водный экстракт из пасты черники содержит какое-то сильное гипогликемическое средство.

4 АНТИДИСБИОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЧЕРНИКИ

Установлено, что в патогенезе сахарного диабета и, особенно, его сосудистых осложнений значительную роль играет развитие дисбиоза, приводящего к системной эндотоксинемии [7]. Поэтому одной из задач нашего исследования стало изучение уровня микробной обсемененности крови и печени (по активности уреазы) и состояние неспецифического иммунитета (по активности лизоцима).

Соответствующие результаты определения активности уреазы в сыворотке крови представлены в таблице 2, из которой видно, что при СД 2 достоверно возрастает активность уреазы, что свидетельствует об увеличении уровня бактериемии при диабете ($p < 0,001$). Введение пасты черники или водного экстракта из пасты черники достоверно снижает активность уреазы.

Таблица 2 – Влияние пасты черники на активность уреазы в сыворотке крови крыс с СД 2

№№ п/п	Группа	Уреаза, мк-кат/л	p	p _t
1	Норма (интактные)	0,16 ± 0,01		
2	СД 2	0,23 ± 0,01	< 0,001	
3	СД 2 + паста черники	0,18 ± 0,02	> 0,3	< 0,05
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	0,17 ± 0,02	> 0,4	< 0,05

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p_t – показатель достоверности различий с группой № 2.

Аналогичная ситуация с активностью уреазы наблюдается и в ткани печени (таблица 3), однако из-за больших разбросов показателей во всех случаях $p > 0,05$. Поэтому в отношении микробной обсемененности печени при СД 2 можно лишь говорить о тенденциях.

Таблица 3 – Влияние пасты черники на активность уреазы
в печени крыс с СД 2

№ п/п	Группа	Уреаза, мк-кат/кг	p	p ₁
1	Норма (интактные)	$3,62 \pm 0,34$		
2	СД 2	$4,29 \pm 0,52$	$> 0,05$	
3	СД 2 + паста черники	$3,37 \pm 0,62$	$> 0,3$	$> 0,05$
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	$3,49 \pm 0,46$	$> 0,5$	$> 0,05$

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.
2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

В таблице 4 представлены результаты определения активности лизоцима в сыворотке крови крыс с СД 2. Из этих данных видно, что при диабете достоверно снижается активность лизоцима, свидетельствующая о снижении уровня неспецифического иммунитета. Введение цельной пасты мало влияет на этот показатель, однако водный экстракт из пасты достоверно повышает активность лизоцима, что может свидетельствовать о наличии в водном экстракте какого-то иммуностимулятора, что требует проведения дополнительных исследований.

Наиболее разительное действие на активность лизоцима оказали продукты из черники в ткани печени (таблица 5). При СД 2 активность лизоцима в печени снижается в 3 раза. Введение с кормом и пасты, и экстракта из ягод черники достоверно ($p < 0,01$) повышали активность лизоцима, а, следовательно, и уровень неспецифического иммунитета.

Дальнейшие исследования должны показать, за счет какого соединения происходит такая активация лизоцима печени.

Таблица 4 – Влияние пасты черники на активность лизоцима в сыворотке крови крыс с СД 2

№ № п/п	Группа	Лизоцим, ед/л	p	p ₁
1	Норма (интактные)	91 ± 8		
2	СД 2	69 ± 5	< 0,05	
3	СД 2 + паста черники	74 ± 7	> 0,05	> 0,3
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	83 ± 3	> 0,1	< 0,05

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

Таблица 5 – Влияние пасты черники на активность лизоцима в печени крыс с СД 2

№ № п/п	Группа	Лизоцим, ед/кг	p	p ₁
1	Норма (интактные)	244 ± 9		
2	СД 2	78 ± 9	< 0,001	
3	СД 2 + паста черники	172 ± 18	< 0,01	< 0,01
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	180 ± 9	< 0,01	< 0,01

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

Результаты определения степени дисбиоза в сыворотке крови и в печени крыс с СД 2 представлены в таблице 6, из которой видно, что при диабете достоверно возрастает степень дисбиоза в сыворотке (в 1,93 раза) и очень сильно (в 3,72 раза) – в печени.

Продукты из черники достоверно снижают степень дисбиоза и в сыворотке, и в печени практически до нормы.

Таблица 6 – Влияние пасты черники на степень дисбиоза
в крови и в печени крыс с СД 2

№ п/п	Группа	Степень дисбиоза	
		Кровь	Печень
1	Норма (интактные)	$1,00 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,10$
2	СД 2	$1,93 \pm 0,15$ $p < 0,01$	$3,72 \pm 0,42$ $p < 0,001$
3	СД 2 + паста черники	$1,91 \pm 0,13$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$1,33 \pm 0,17$ $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	$1,16 \pm 0,11$ $p > 0,1$ $p_1 < 0,01$	$1,30 \pm 0,14$ $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p_1 – показатель достоверности различий с группой № 2.

5 АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЧЕРНИКИ

Показателем перекисного окисления липидов, а следовательно, состояния прооксидантных систем организма является МДА. В таблице 7 представлены результаты определения содержания МДА в сыворотке крови крыс с СД 2. Из этих данных видно, что при диабете достоверно увеличивается содержание МДА, продукты из черники возвращают этот показатель к норме.

Таблица 7 – Влияние пасты черники на содержание МДА в сыворотке крови крыс с СД 2

№ п/п	Группа	МДА, ммоль/л	p	p ₁
1	Норма (интактные)	0,90 ± 0,05		
2	СД 2	1,36 ± 0,07	< 0,01	
3	СД 2 + паста черники	0,86 ± 0,07	> 0,3	< 0,001
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	1,00 ± 0,09	> 0,3	< 0,05

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

В печени крыс с СД 2 также возрастает содержание МДА, однако продукты из черники лишь проявляют тенденцию к снижению этого показателя (табл. 8).

Результаты определения активности каталазы в сыворотке крови крыс с СД 2 представлены в таблице 9. Как видно, при диабете активность каталазы в сыворотке достоверно увеличивается, при введении пасты черники снижается, однако p > 0,05, а при введении экстракта снижается достоверно даже при сравнении с нормой.

Таблица 8 – Влияние пасты черники на содержание МДА в печени крыс с СД 2

№ № п/п	Группа	МДА, ммоль/л	p	p ₁
1	Норма (интактные)	48,72 ± 1,41		
2	СД 2	72,71 ± 1,74	< 0,001	
3	СД 2 + паста черники	69,03 ± 3,76	< 0,01	> 0,3
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	66,80 ± 3,58	< 0,01	> 0,3

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.
2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

Таблица 9 – Влияние пасты черники на активность каталазы в сыворотке крови крыс с СД 2

№ № п/п	Группа	Каталаза, мкат/л	p	p ₁
1	Норма (интактные)	0,170 ± 0,005		
2	СД 2	0,208 ± 0,010	< 0,05	
3	СД 2 + паста черники	0,150 ± 0,013	> 0,05	< 0,05
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	0,143 ± 0,005	< 0,05	< 0,01

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.
2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

Напротив, в печени крыс с СД 2 активность каталазы практически не изменяется и достоверно не реагирует на введение продуктов из черники (табл. 10).

Таблица 10 – Влияние пасты черники на активность каталазы
в печени крыс с СД 2

№№ п/п	Группа	Каталаза, мкат/кг	p	p ₁
1	Норма (интактные)	6,09 ± 0,03		
2	СД 2	5,91 ± 0,16	> 0,05	
3	СД 2 + паста черники	6,15 ± 0,04	> 0,1	> 0,05
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	6,15 ± 0,05	> 0,1	> 0,05

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

Результаты определения индекса АПИ представлены в таблице 11. Из этих данных видно, что при диабете снижается индекс АПИ как в сыворотке, так и в печени. Продукты из черники слабо влияют на этот показатель, отражающий баланс антиоксидантных и прооксидантных систем организма.

Таблица 11 – Влияние пасты черники на индекс АПИ крыс с СД 2

№№ п/п	Группа	Индекс АПИ	
		Сыворотка	Печень
1	Норма (интактные)	1,89 ± 0,15	1,25 ± 0,10
2	СД 2	1,53 ± 0,12 p>0,05	0,81 ± 0,18 p>0,05
3	СД 2 + паста черники	1,74 ± 0,17 p>0,3 p ₁ >0,3	0,89 ± 0,09 p<0,05 p ₁ >0,3
4	СД 2 + экстракт из пасты черники	1,43 ± 0,13 p<0,05 p ₁ >0,3	0,92 ± 0,09 p<0,05 p ₁ >0,3

Примечания:

1. p – показатель достоверности различий с группой № 1.

2. p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поведенные исследования показали, что при СД 2, как и при СД 1, паста черники оказывает гипогликемическое действие, обусловленное наличием какого-то водорастворимого гипогликемического соединения.

Вторая особенность действия пасты черники заключается в ее антидисбиотическом свойстве, приводящем к снижению микробной обсемененности и стимуляции неспецифического иммунитета.

Третья особенность лечебно-профилактического действия пасты черники состоит в ее гепатопротекторном действии, проявляющемся, главным образом, в усилении ее антимикробной функции [22].

В результате проведенных исследований есть возможность рекомендовать широкое использование пасты черники в диетическом питании больных сахарным диабетом.

Кроме того, полученные результаты ставят на повестку дня проведение дополнительных биохимических исследований по выяснению природы гипогликемических и иммуномодулирующих соединений ягод черники.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиммет П. Быстрый рост распространенности сахарного диабета II типа и угроза эпидемии этого заболевания в будущем / П. Зиммет // Укр. мед. часопис. – 2002. – № 3 (29). – С. 5.
2. Ефимов А.С. Актуальные проблемы клинической диабетологии / А.С. Ефимов // Медичний всесвіт. – 2002. – Т. 2, № 1–2. – С. 72–76.
3. Титович Е. В. Профилактика сахарного диабета: прошлое, настоящее и будущее / Е. В. Титович // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55, № 2. – С. 3–9.
4. Егорова Е.Г. Инсулинерезистентность – основа метаболического синдрома / Е.Г. Егорова // Экспер. и клин. гастроэнтерология. – 2007. – № 1. – С. 8–13.
5. Маньковский Б.Н. Инсулинерезистентность: механизмы формирования и возможные пути коррекции / Б.Н. Маньковский // Рацион. фармакотерапия. – 2007. – № 1 (02). – С. 35–38.
6. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the bio-breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? / S. Brugman, F. A. Klatter, J. T. J. Visser [et al]. // Diabetologia. – 2006. – V. 49, № 9. – P. 2105–2108.
7. Цисельский Ю. В. Дисбиотические аспекты патогенеза сосудистых осложнений сахарного диабета и их профилактика полифенолами / Ю. В. Цисельский // Вісник стоматології. – 2010. – № 5 (спецвип.). – С. 56–59.
8. Великая М.М. Микробиологические аспекты некоторых эндокринных патологий / М.М. Великая, Н.Е. Шевелева // Укр. біофармацевтичний журн. – 2010. – № 4 (9). – С. 6–13.
9. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin – induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas / O. Coskun, M. Kanter, A. Korkmaz [et al.] // Pharmacological research. – 2005. – V. 51, № 2. – P. 117–123.

10. Цисельский Ю.В. Влияние биофлавоноидов на биохимические показатели сыворотки крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом I-го типа / Ю.В. Цисельский // Междун. эндокринол. журн. – 2007. – № 5 (11). – С. 16–17.
11. Боріков О.Ю. Вплив кверцетину на розвиток синдрому інсульнорезистентності у самців шурів за умов високожирової дієти / О.Ю. Боріков, Н.І. Горбенко // Проблеми ендокринної патології. – 2009. – № 4. – С. 64–70.
12. Химический состав пищевых продуктов. Справочные таблицы под ред. Нестерина М.Ф. и Скурихина И.М. // М.: «Пищевая промышленность», 1979. – 247 с.
13. Ульянов А. М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А. М. Ульянов, Ю .А. Тарасов // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.
14. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике / Горячковский А. М. – [3-е изд.]. – Одесса: Экология, 2005. – 616 с.
15. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
16. Левицкий А. П. Методы определения активности эластазы и ее ингибиторов: метод. рекомендации / А. П. Левицкий, А. В. Стефанов. – К. : ГФЦ, 2002. – 15 с.
17. Гирин С. В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах / С. В. Гирин // Лабораторная диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45-46.
18. Гаврикова Л. М. Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // Стоматология. – 1996. – Спец. вып. – С. 49–50.
19. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий // Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

20. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации / А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.] – Одесса, 2010. – 16 с.
21. Деклараційний патент на корисну модель № 43140, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / А.П. Левицький, О.В. Деньга, І.О. Селіванська [та ін.] – № u200815092, заявл. 26.12.2008; опубл. 10.08.2009. Бюл. № 15.
22. Левицкий А.П. Антимикробная функция печени / А.П. Левицкий, С.А. Демьяненко, Ю.В. Цисельский // Одесса: КП ОГТ, 2011. – 141 с.