

Влияние экстракта куколок дубового шелкопряда на метаболизм при моделировании гиперхолестеролемии

Е.О. Данченко, О.М. Балаева-Тихомирова, Л.А. Крумплевская

Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

В эксперименте на крысах линии Вистар изучено влияние экстракта куколок дубового шелкопряда на метаболизм при моделировании гиперхолестеролемии. Моделирование гиперхолестеролемии проводили внутрижелудочным введением холестерина (40 мг/кг) и эргокальциферола (350000 Ед/кг) в подсолнечном масле в течение 5 и 10 суток. Выявлены метаболические нарушения, характерные для развития инсулинорезистентности (увеличение содержания глюкозы, общего холестерина, триацилглицеролов в сыворотке крови и снижение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови и гликогена в печени) на фоне активации свободно-радикального окисления и изменения активности ферментов обмена углеводов в печени. Наиболее выраженные изменения метаболизма отмечены через 10 суток воспроизведения гиперхолестеролемии. Экстракт куколок дубового шелкопряда, вводимый одновременно с холестерином в течение 5 суток, предотвращал изменение липидного спектра сыворотки крови и сохранял уровень восстановленного глутатиона в печени. Экстракт куколок дубового шелкопряда, вводимый с 6-го по 10-й день, нормализовал активность ферментов обмена углеводов, содержание холестерина, восстановленного глутатиона, ТБК-реагирующих субстанций в печени и липидов в сыворотке крови.

Ключевые слова: экстракт куколок дубового шелкопряда, гиперхолестеролемия, метаболизм, сыворотка крови, печень.

Influence of extract of oak silkworm pupae on the metabolism at modelling of hypercholesterolemia

Е.О. Danchenko, О.М. Balaeva-Tichomirova, L.A. Krumplevskaja

Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

Influence of extract of oak silkworm pupae on the metabolism of Wistar rats at modelling of hypercholesterolemia was studied. Modelling of hypercholesterolemia was performed by intragastric introduction of cholesterol (40 mg/kg) and ergocalciferol (350000 IU/kg) in sunflower oil within 5 and 10 days. Metabolic disturbances, characteristic for insulin resistance development (increase of glucose, total cholesterol, triacylglycerol levels in the blood serum and decrease of HDL cholesterol level in blood serum and glycogen in a liver) were found. Activation of free-radical oxidation and change of enzymes activity of carbohydrates metabolism in a liver were revealed. The most expressed changes of a metabolism are noted in 10 days of modelling of hypercholesterolemia. The extract of oak silkworm pupae entered simultaneously with cholesterol within 5 days, prevented change of blood serum lipid spectrum and kept level reduced glutathione in a liver. The extract of oak silkworm pupae entered with 6th till 10th day normalised activity of enzymes of carbohydrate metabolism, the content of cholesterol, reduced glutathione, TBA-reacting substances in the liver, lipids in the blood serum.

Key words: extract of oak silkworm pupae, hypercholesterolemia, metabolism, blood serum, liver.

Высокое содержание насыщенных жиров и холестерина в пище приводит к увеличению массы тела, развитию инсулинорезистентности и гиперлипидемии у людей и животных [1]. Механизмы накопления липидов при их избыточном поступлении в организм включают: повышение активности скавенджер рецепторов, содержания холестерина в атерогенных липопротеинах, маркеров воспаления, снижение экспрессии ферментов, участвующих в синтезе желчных кислот, и экскреции холестерина [2].

Используемые в настоящее время методы коррекции нарушений обмена липидов направлены, в основном, на снижение массы тела, повышение чувствительности тканей к действию инсулина, ингибирование синтеза холестерина и нормализацию функции печени [3–5].

В течение нескольких лет на кафедре химии университета проводится изучение свойств экстракта из куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ). Установлено, что ЭКДШ содержит жир- и водорастворимые витамины, набор аминокислот, обладает антиоксидантным действием [6]. Показана эффективность ЭКДШ при воспроизведении инсулинорезистентности в эксперименте [7].

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности использования экстракта куколок дубового шелкопряда для профилактики и коррекции нарушений метаболизма при воспроизведении гиперхолестеролемии у крыс.

Материал и методы. Исследования выполнены на 58 крысах-самках линии Вистар с массой 220–250 г. Гиперхолестеролемию (ГХС) моделировали путем внутрижелудочного введения

через зонд холестерина в дозе 40 мг/кг и эргокальциферола 350000 Ед/кг в подсолнечном масле [8]. Животные были разделены на 7 групп: 1 группа – контроль (n=10); 2 группа – ГХЛ 5 сут (n=13); 3 группа – ГХС 5 сут + ЭКДШ 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела 5 сут (n=8); 4 группа – ГХЛ 5 сут + ЭКДШ 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела 5 сут (n=8); 5 группа – ГХЛ 10 сут (n=7); 6 группа – ГХЛ 10 сут с параллельным введением с 6-х по 10 сут эксперимента ЭКДШ 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела (n=6); 7 группа – ГХЛ 10 сут с параллельным введением с 6-х по 10 сут эксперимента ЭКДШ 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела (n=6). Контрольным животным вводили эквивалентное количество дистиллированной воды.

Определение биохимических показателей метаболизма (глюкозы, триацилглицеролов, общего холестерина, холестерина ЛПВП) в сыворотке крови осуществляли с помощью наборов фирмы ДиаконДиасис в соответствии с инструкциями производителя.

Содержание холестерина в печени определяли по методу Bragdon [9]. Содержание общих липидов исследовали с помощью стандартных наборов фирмы Lachema сульфопосфованилиновым методом в соответствии с инструкцией производителя. Выделение общих липидов из печени проводили по методу Bragdon [9]. Для определения концентрации гликогена использовали метод Krisman [7].

Активность ферментов углеводного обмена определяли во фракции, полученной центрифугированием гомогенатов при 6000 об/мин. Гомогенаты готовили при температуре 2–4°C на растворе, содержащем 0,05 М Трис-НСl, 0,15 М

хлорида калия и 0,001 М ЭДТА (рН 7,8). В ткани печени исследовали активность гексокиназы (ГК) (КФ 2.7.1.1), глюкокиназы (ГлК) (КФ 2.7.1.2), фосфорилазы гликогена (ФР гликогена) (КФ 2.4.1.1), фосфоглюкомутазы (ФГМ) по убыли глюкозо-1-фосфата (КФ 2.7.5.1), глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фаза) (КФ 3.1.3.9) [7]. Концентрацию ТБК-реагирующих субстанций (ТБКРС) в печени определяли по методу Стальной и Гаришвили [10]. Содержание восстановленного глутатиона (ГШ) в печени крыс определяли, используя модифицированный метод Sedlak и Lindsay [11]. Водный экстракт куколок дубового шелкопряда получали по методу Трокоза [12].

Результаты и их обсуждение. При моделировании гиперхолестеролемии в течение 5 сут и 10 сут в сыворотке крови обнаружено достоверное увеличение содержания глюкозы на 12,5% и 24,4%, соответственно. Как известно, гипергликемия может быть результатом либо нарушения захвата печенью глюкозы либо увеличения ее выброса из печени в кровь при активации гликогенолиза или глюконеогенеза. Как следует из табл. 1, в печени крыс, получавших ХС, выявлено уменьшение содержания гликогена в 18,1 и в 11,7 раза через 5 и 10 сут, соответственно. Снижение уровня гликогена обусловлено, вероятно, нарушением процесса его синтеза, поскольку обнаружено снижение активности фосфорилазы гликогена, а через 10 суток воспроизведения гиперхолестеролемии – фосфоглюкомутазы. Выявлено уменьшение активности глюкозо-6-фосфатазы в 1,5 раза через 5 дней и в 2,0 раза через 10 сут введения ХС, что снижает поступление глюкозы из печени в кровь.

Таблица 1

Содержание глюкозы в сыворотке крови (ммоль/л), гликогена (мг/г) в печени, активность фосфорилазы гликогена (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹), фосфоглюкомутазы (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹) в печени крыс при воспроизведении гиперхолестеролемии и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Группа животных	Показатель			
	Глюкоза	Гликоген	Фосфорилаза гликогена	ФГМ
Контроль	5,28±0,17	13,6±0,79	1,48±0,23	5,91±0,48
ХС 5 сут	5,94±0,20 ¹	0,75±0,11 ¹	0,81±0,08 ¹	6,81±0,26
ХС 5 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	5,88±0,16 ¹	1,32±0,22 ^{1,2}	0,74±0,12 ¹	6,74±0,20
ХС 5 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	6,04±0,07 ¹	2,47±0,31 ^{1,2}	0,72±0,13 ¹	5,97±0,58
ХС 10 сут	6,81±0,30 ¹	1,16±0,29 ¹	0,81±0,12 ¹	8,37±0,61 ¹
ХС 10 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	5,71±0,19 ^{3,4}	1,37±0,06 ^{1,3}	1,25±0,41 ¹	9,49±0,38 ¹
ХС 10 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	5,81±0,19 ^{3,4}	2,32±0,20 ^{1,3}	0,99±0,20 ¹	9,15±0,20

Примечание – ¹P<0,05 по сравнению с контролем; ²P<0,05 по сравнению с группой ХС 5 сут; ³P<0,05 по сравнению с группой ХС 10 сут; ⁴P=0,05–0,1 по сравнению с контролем.

Таблица 2

Активность гексокиназы (мкмоль НАДФ·г⁻¹·ч⁻¹), глюкокиназы (мкм НАДФ·г⁻¹·ч⁻¹), глюкозо-6-фосфатазы (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹) в печени крыс при воспроизведении гиперхолестеролемии и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_x$)

Группа животных	Фермент		
	Гексокиназа	Глюкокиназа	Глюкозо-6-фосфатаза
Контроль	34,9±1,41	92,5±12,04	1,64±0,26
ХС 5 сут	18,2±1,04 ¹	49,3±4,95 ¹	1,10±0,12 ¹
ХС 5 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	25,4±1,81 ^{1,2}	88,1±9,95 ²	0,82±0,16 ¹
ХС 5 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	30,0±0,80 ^{1,2}	82,0±4,56 ²	1,00±0,17 ¹
ХС 10 сут	10,4±1,23 ¹	38,8±6,08 ¹	0,80±0,13 ¹
ХС 10 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	32,7±1,53 ³	33,3±1,42 ¹	1,16±0,19
ХС 10 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	33,6±1,62 ³	27,4±5,25 ¹	2,43±0,46

Примечание – ¹P<0,05 по сравнению с контролем; ²P<0,05 по сравнению с группой ХС 5 сут; ³P<0,05 по сравнению с группой ХС 10 сут.

Таблица 3

Содержание ТБК-реагирующих (ТБКРС) субстанций и уровень восстановленного глутатиона (нмоль/г) в печени крыс при воспроизведении гиперхолестеролемии и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_x$)

Группа животных	Показатель	
	ТБКРС	Восстановленный глутатион
Контроль	27,9±2,13	18,2±1,45
ХС 5 сут	35,8±2,03 ¹	12,5±1,20 ¹
ХС 5 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	38,6±3,07 ¹	19,3±2,40 ²
ХС 5 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	34,0±2,23 ⁴	16,9±0,83 ²
ХС 10 сут	48,0±4,67 ¹	12,2±0,90 ¹
ХС 10 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	35,6±2,66 ^{1,3}	16,5±1,37 ³
ХС 10 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	34,2±3,09 ³	18,8±1,72 ³

Примечание – ¹P<0,05 по сравнению с контролем; ²P<0,05 по сравнению с группой ХС 5 сут; ³P<0,05 по сравнению с группой ХС 10 сут; ⁴P=0,05–0,1 по сравнению с контролем.

Гипергликемия может быть обусловлена нарушением фосфорилирования глюкозы в печени вследствие снижения активности гексокиназы и глюкокиназы (табл. 2). Обнаружено снижение активности гексокиназы на 91,6% и 236%, глюкокиназы на 83,8% и 137% через 5 и 10 суток воспроизведения гиперхолестеролемии по сравнению с активностью этих ферментов в печени контрольных животных.

ЭКДШ в обеих дозах не предотвращал повышение уровня глюкозы в сыворотке крови крыс, получавших ХС в течение 5 сут. Введение ЭКДШ с 6-х по 10 сутки гиперхолестеролемии приводило к снижению уровня глюкозы в сыворотке крови по сравнению с данным показателем у животных, не получавших препарат. Содержание гликогена в печени крыс, получавших обе дозы препарата, увеличивалось по отношению к соответствующему контролю. Активность фосфорилазы гликогена и фосфо-

глюкомутаза в печени крыс, получавших ЭКДШ, не изменялась; активность глюкозо-6-фосфатазы нормализовалась в печени крыс, получавших ХС в течение 10 сут и ЭКДШ в обеих дозах. ЭКДШ в обеих применяемых дозах полностью нормализовал активность гексокиназы через 10 сут воспроизведения гиперхолестеролемии и предотвращал снижение активности глюкокиназы через 5 сут введения ХС.

Влияние ЭКДШ на уровень глюкозы в крови может быть связано с его антиоксидантными свойствами. Установлено, что введение холестерина вызывает активацию свободно-радикального окисления, что доказывается увеличением уровня ТБК-реагирующих субстанций в печени крыс в 1,3 раза и 1,7 раза через 5 и 10 сут, соответственно, и снижением уровня восстановленного глутатиона в 1,4 и 1,5 раза, соответственно (табл. 3). ЭКДШ не оказал выраженного влияния на содержание ТБК-реаги-

рующих субстанций в печени крыс, получавших ХС в течение 5 сут, но в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела нормализовал уровень ТБК-реагирующих субстанций до значений интактных животных при воспроизведении гиперхолестеролемии в течение 10 сут. Уровень восстановленного глутатиона нормализовался до значений интактных животных при использовании обеих доз ЭКДШ при воспроизведении гиперхолестеролемии в течение 5 и 10 сут эксперимента.

Введение холестерина в течение 5 сут характеризовалось увеличением содержания общих липидов в печени в 2,1 раза, ХС – в 1,5 раза по сравнению с контролем (табл. 4). Через 10 сут введения ХС уровень общих липидов в печени повысился в 2,9 раза, ХС – в 1,6 раза.

Данные результаты обусловлены, вероятно, дополнительным поступлением липидов в организм крыс. Использование ЭКДШ в обеих дозах не оказало влияния на содержание общих

липидов в печени. Содержание ХС в печени крыс, получавших ХС в течение 10 дней и экстракт в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела, уменьшилось по сравнению с соответствующим контролем, но сохранялось повышенным по отношению к значению контрольных животных.

Увеличение содержания ХС в печени сопровождалось изменением липидного профиля сыворотки крови. Как следует из данных табл. 5, введение холестерина в течение 5 сут вызвало статистически значимое увеличение содержания общего ХС в сыворотке крови на 23% и ТГ на 36% и снижение уровня ХС ЛПВП на 15,3% по сравнению с контрольными животными.

Введение холестерина в течение 10 сут характеризовалось аналогичными, но более выраженными изменениями: уровень общего ХС увеличился на 56,5%, ТГ на 74,2%, уровень ХС ЛПВП уменьшился на 25,8% (табл. 5).

Таблица 4

Содержание общих липидов и ХС в печени крыс (мг/г) при воспроизведении гиперхолестеролемии и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Группа животных	Показатель	
	Общие липиды	ХС
Контроль	115±7,0	2,03±0,08
ХС 5 сут	245±21,9 ¹	3,03±0,14 ¹
ХС 5 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	267±18,0 ¹	3,04±0,28 ¹
ХС 5 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	267±10,6 ¹	2,81±0,16 ¹
ХС 10 сут	330±31,0 ¹	3,21±0,17 ¹
ХС 10 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	284±20,8 ¹	2,57±0,13 ^{1,3}
ХС 10 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	296±4,8 ¹	3,43±0,28 ¹

Примечание – ¹P<0,05 по сравнению с контролем; ³P<0,05 по сравнению с группой ХС 10 сут.

Таблица 5

Содержание общего ХС, ХС ЛПВП, ТГ в сыворотке крови крыс (ммоль/л) при воспроизведении гиперхолестеролемии и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Группа животных	Показатель		
	ОХС	ХС ЛПВП	ТГ
Контроль	1,54±0,13	0,39±0,01	1,36±0,15
ХС 5 сут	1,90±0,08 ¹	0,33±0,02 ¹	1,85±0,16 ¹
ХС 5 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	1,43±0,11 ²	0,33±0,02 ¹	1,14±0,18 ²
ХС 5 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	1,52±0,10 ²	0,32±0,02 ¹	1,15±0,24 ²
ХС 10 сут	2,41±0,24 ¹	0,31±0,03 ¹	3,73±0,33 ¹
ХС 10 сут + ЭКДШ 7 мкг/100	1,77±0,07 ³	0,81±0,03 ^{1,3}	2,59±0,37 ^{1,3}
ХС 10 сут + ЭКДШ 70 мкг/100	1,35±0,13 ³	0,38±0,02 ³	1,93±0,32 ³

Примечание – 1. ОХС – общий ХС, ХС ЛПВП – ХС липопротеинов высокой плотности, триацилглицеролы – ТГ.

2. ¹P<0,05 по сравнению с контролем; ²P<0,05 по сравнению с группой ХС 5 сут; ³P<0,05 по сравнению с группой ХС 10 сут.

Полученные результаты могут быть следствием увеличения экспорта ХС из печени, снижения скорости метаболизма липопротеинов в кровеносном русле и синтеза липопротеинов в печени. Экстракт в обеих дозах предотвращал увеличение уровня общего ХС и ТГ в сыворотке крови при воспроизведении гиперхолестеролемии в течение 5 сут. При воспроизведении гиперхолестеролемии в течение 10 сут ЭКДШ в обеих дозах нормализовал уровень общего ХС в сыворотке крови до значений контрольных животных; в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела – нормализовал уровень ХС ЛПВП и ТГ; в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела – повышал уровень ХС ЛПВП и снижал уровень ТГ.

Заключение. При введении холестерина крысам выявлены метаболические нарушения, характерные для развития инсулинорезистентности (увеличение содержания глюкозы, общего ХС, ТГ в сыворотке крови и снижение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови и гликогена в печени) на фоне активации свободно-радикального окисления и изменения активности ферментов обмена углеводов в печени. Наиболее выраженные изменения метаболизма отмечены через 10 суток воспроизведения гиперхолестеролемии. Экстракт куколок дубового шелкопряда, вводимый одновременно с холестерином в течение 5 суток, предотвращает развитие атерогенных сдвигов сыворотки крови и сохраняет уровень восстановленного глутатиона в печени. Экстракт куколок дубового шелкопряда, вводимый с 6-го по 10-й день, нормализует активность ферментов обмена углево-

дов, содержание холестерина, восстановленного глутатиона, ТБК-реагирующих субстанций в печени и липидов в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Delarue, J. Free fatty acids and insulin resistance / J. Delarue, C. Magnan // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2007. – Vol. 10. – P. 142–148.
2. Hoshida, S. Cholesterol feeding exacerbates myocardial injury in Zucker diabetic fatty rats / S. Hoshida [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2000. – Vol. 278. – P. H256–H262.
3. Andersen, T. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects / T. Andersen [et al.] // *J. Hepatol.* – 1991. – Vol. 12. – P. 224–229.
4. Мамедов, М.Н. Перспективы применения антигипергликемических препаратов у больных с метаболическим синдромом и преддиабетом / М.Н. Мамедов, В.Н. Шишкова // *Кардиология.* – 2007. – № 6. – С. 88–93.
5. Мараховский, Ю.Х. Клиническая оценка потенциальных возможностей и ограничений гепатопротекторов / Ю.Х. Мараховский // *Рецепт.* – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 42–49.
6. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.М. Шейбак // *Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова».* – 2007. – Т. 6. – С. 247–265.
7. Балаева-Тихомирова, О.М. Коррекция нарушений обмена углеводов при развитии инсулинорезистентности в эксперименте / О.М. Балаева-Тихомирова // *Вестн. Вітебск. дзярж. ун-та.* – 2010. – № 2(56). – С. 74–79.
8. Белай, И.М. Исследование гипополипидемических и антиоксидантных свойств пикамилаона и карнитина хлорида / И.М. Белай [и др.] // *Український ревматологічний журнал.* – 2001. – № 1(3). – С. 6–8.
9. Bragdon, J.H. A simple method for measurement of cholesterol / J.H. Bragdon // *Lipids and steroid hormones in clinical medicine.* – 1960. – Vol. 2. – P. 78–83.
10. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Е.Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
11. Sedlak, K.J. Estimation of total proteinbound and nonprotein sulfhydryl group in tissues with Ellmans reagent / K.J. Sedlak, R. Lindsay // *Anal. Biochem.* – 1968. – Vol. 25. – P. 192–205.
12. Трокоз, В.А. Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз [и др.]; Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 1696. – 1997.

Поступила в редакцию 20.04.2011. Принята в печать 29.04.2011

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 22, корп. 3, кв. 61,
e-mail: Elena.danch@gmail.com – Данченко Е.О.