

Применение экстракта куколок дубового шелкопряда как метод коррекции инсулинорезистентности

О.М. Балаева-Тихомирова

Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машиерова»

В работе исследована эффективность применения экстракта куколок дубового шелкопряда для коррекции инсулинорезистентности, так как существующие в настоящее время схемы лечения инсулинорезистентности не являются достаточно успешными и заключаются, в основном, в регуляции массы тела и использовании препаратов, повышающих чувствительность клеток к инсулину и влияющих на метаболизм липидов.

Впервые установлено, что при моделировании инсулинорезистентности у крыс гормональные (уровень инсулина, фактора некроза опухоли- α , кортикостерона и адипонектина) и метаболические (гипергликемия, гиперхолестеролемия, гипо-альфахолестеролемия) показатели сыворотки крови сопровождаются развитием стеатогепатоза на фоне увеличения свободнорадикального окисления. Впервые биохимически обосновано применение экстракта куколок дубового шелкопряда при развитии инсулинорезистентности и гиперхолестеролемии. Полученные данные могут быть использованы при разработке медикаментозных средств для профилактики и лечения инсулинорезистентности, а также для совершенствования методов диагностики метаболического синдрома и инсулинорезистентности.

Ключевые слова: *инсулинорезистентность, гормоны, регуляция, метаболизм, печень, сыворотка крови, экстракт куколок дубового шелкопряда.*

Application of oak silkworm pupae extract as a method of insulin resistance correction

O.M. Balaeva-Tikhomirova

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

We have studied the efficacy of the extract of oak silkworm pupae to correct insulin resistance, as current treatment regimen of insulin resistance are not sufficiently successful, and are mainly the regulation of body weight and the use of drugs that increase the sensitivity of cells to insulin and affect lipid metabolism.

It is stated for the first time that while modeling rat insulin resistance hormone (content of insulin, tumor necrosis factors- α , corticosteron and adiponectin) and metabolic (hyperglycemia, hypercholesterolemia, hypo-alpha-cholesterolemia) indicators of serum are accompanied by the development of steatosis together with the increase free-radical oxidation. For the first time application of extract of oak silkworm pupae at the development of insulin resistance and hypercholesterole is biogchemically grounded. The data obtained can be used while creating medical remedies for prophylaxis and treatment of insulin resistance, as well as for the improvement of diagnosis methods of metabolic syndrome and insulin resistance.

Key words: *insulin resistance, hormone, regulation, metabolism, liver, serum, extract of oak silkworm pupae.*

Инсулинорезистентность (ИР) представляет собой нарушенный биологический ответ периферических тканей на воздействие эндогенного или экзогенного инсулина. ИР лежит в основе развития метаболического синдрома (МС), а также может встречаться при физиологических и патологических состояниях, не входящих в понятие «метаболический синдром». До настоящего времени остается нерешенной проблема механизмов нарушения обмена веществ и его регуляции в развитии ИР, МС и последующей клинической патологии. Кроме того, целесообразным является дальнейшее развитие технологий коррекции нарушений метаболизма при развитии инсулинорезистентности, поскольку существующие схемы лечения ИР не являются достаточно успешными и заключаются, в основном, в регуляции массы тела и использовании препаратов, повышающих чувствительность клеток к инсулину и влияющих на метаболизм липидов [1]. Так, в настоящее время существуют нефармакологические и фармакологические методы коррекции ИР и МС. Поскольку одним из факторов, способствующих развитию ИР, является ожирение, то уменьшение массы тела способствует

повышению чувствительности к инсулину [2]. Снижение калорийности питания, низкоуглеводная и низкожировая диета, включение в диету моно- и полиненасыщенных жирных кислот снижает ИР [1].

При МС диетические мероприятия состоят из совокупности трех направлений: гиполипидемического, гипотензивного, гипогликемического [3]. Исследования показали, что систематическое соблюдение диеты и выполнение физических тренировок у больных с МС приводили к достоверному снижению массы тела на 11%, окружности талии на 9%, уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) на 13%, концентрации триацилглицеролов (ТГ) на 24%, что сочеталось со снижением ИР на 15%. Установлено, что физическая нагрузка значительно повышает чувствительность тканей к инсулину, модифицирует содержание жиров в печени [4] и улучшает биохимические показатели крови у лиц с неалкогольным стеатогепатозом (НАСГ). Регулярные физические тренировки приводят к снижению массы тела, усиливают инсулиноопосредованную утилизацию глюкозы скелетными мышцами, уменьшают ИР [5].

Известно, что для повышения чувствительности тканей к инсулину используются бигуаниды, метформин, тиазолидины (троглитазон, пиоглитазон, розиглитазон). Однако, препараты из группы тиазолидинов проявляют гепатотоксичность. Установлено, что снижение ИР приводит к уменьшению клинических проявлений МС и частоты развития сердечно-сосудистых осложнений [6].

При апробации отдельных классов гипотензивных и гиполипидемических препаратов было установлено, что эти препараты, наряду со своим основным действием, оказывают слабopоложительное или нейтральное влияние на другие компоненты МС. Таким образом, многокомпонентность МС требует сочетания лекарственных препаратов с разными механизмами действия [7].

По данным литературы, для коррекции липидного обмена применяются препараты растительной природы – биологически активные добавки, содержащие растворимые пищевые волокна (пектин). Добавление в суточный рацион питания пектина сопровождается достоверным снижением содержания общего ХС, ТГ, ХС ЛПНП. Установлено, что растворимые пищевые волокна дают умеренный гиполипидемический эффект [8], который связан со стимуляцией в печени синтеза желчных кислот. Рыбий жир и его компоненты (ПНЖК) оказывают нормализующее действие на липидный обмен, активируют рецепторы и увеличивают связывание ЛПНП в печени, уменьшают секрецию ТГ, образование ЛПНП и синтез ХС, способствуют увеличению концентрации в плазме крови антиоксидантных факторов (церулоплазмينا, трансферина, стероидных гормонов), естественных коронародилататоров (аденозина, простагландинов группы Е и простаглицлина), стабилизирующих мембраны. Противовоспалительные и антиоксидантные свойства эйкозопентановых кислот обеспечивают положительный эффект у больных с неалкогольным стеатогепатитом [9].

В качестве антиоксидантных лекарственных средств применяют препараты, входящие в состав антиоксидантной системы организма (токоферолы, аскорбиновую кислоту, полифенолы, β -каротин и др.) и оказывающие не прямое антиоксидантное действие (препараты эссенциальных фосфолипидов, предшественники пиридиннуклеотидов и глутатиона, препараты, индуцирующие ферментативные антиокислительные компоненты клеток и др.). Регуляция процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) возможна при индукции микросомальных ферментов (фенобарбитал, зиксорин), которая сопряжена с реакциями ферментативной пероксидации [10].

Известно, что наиболее применяемой группой гепатопротекторных средств являются гепатопротекторы растительного происхождения, например, экстракт зеленого чая, который защищает от стеатогепатоза при неалкогольных заболеваниях печени, ингибируя всасывание липидов в кишечнике и их накопление в печени, но не влияет на антиоксидантный статус и метаболизм липидов, регулируемый адипонектином [11].

Поскольку МС является биологической проблемой, возникшей в результате жизни человека в индустриальном обществе, целесообразно провести поиск субстанций из природных объектов, отобранных в процессе эволюции с целью долгосрочной адаптации живых организмов к изменяющимся условиям, обладающих антиоксидантным действием, способных предотвращать развитие ИР на уровне мембранной рецепции гормонального сигнала, экспрессии генов и функционирования транскрипционных факторов. Роль такой субстанции могут выполнять компоненты содержимого куколок дубового шелкопряда, в котором обнаружены антиоксидантная, бактериостатическая, иммуномодулирующая и цитопротективная системы, препятствующие повреждению молекул на протяжении 8 месяцев диапаузы [4].

Цель работы – оценка эффективности применения экстракта куколок дубового шелкопряда для коррекции инсулинорезистентности.

Материал и методы. Моделирование ИР проводили содержанием крыс на высокожировой диете (ВЖД) по Либери-Де Карли (2004) в течение 2-х и 3-х месяцев. ЭКДШ вводили внутривентрикулярно через зонд ежедневно в течение последнего месяца ВЖД в дозах 7 и 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела. Алиментарную гиперхолестеролемию (ГХ) моделировали внутривентрикулярным введением через зонд ХС в дозе 40 мг/кг и эргокальциферола 350000 Ед/кг в подсолнечном масле (2001) в течение 10 суток. ЭКДШ вводили внутривентрикулярно через зонд ежедневно в дозах 7 и 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела в течение последних 5 суток эксперимента.

Объекты исследования: крысы-самки линии Вистар (Wistar) массой 180–250 г (157), печень, сыворотка крови. Предметы исследования: биорегуляторы, связанные с развитием ИР, – инсулин, лептин, адипонектин, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), кортикостерон (КС); показатели метаболизма сыворотки крови – общий холестерин (ОХС), ХС ЛПВП, триацилглицеролы (ТГ), глюкоза; показатели свободнорадикального окисления – ТБК-реагирующие субстанции (ТБКРС), восстановленный глутатион (GSH); содержание липидов в печени – ТГ, холестерин (ХС), общие липиды; биохимические коэффициенты, количественно характеризующие гормонально-метаболические взаимоотношения; коррегирующее действие экстракта куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ) при развитии ИР.

Содержание гликогена в печени (мг/г ткани) определяли по методу C.R. Krisman, ХС (мг/г ткани) – по методу J.H. Bragdon, ТГ и общих липидов (мг/г ткани) – с помощью стандартных наборов фирмы Lachema (Чехия). Концентрацию ТБКРС в печени исследовали по И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили и выражали в нмоль/г с использованием молярного коэффициента экстинкции $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹. Содержание GSH в печени определяли, используя модифицированный метод J. Sedlak и L. Lindsay, и выражали в ммоль/г ткани.

Биохимические параметры сыворотки крови исследовали с помощью наборов фирмы Диакон-Диасис. Содержание холестерина липопротеинов низкой плотности и холестерина липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) рассчитывали общепринятыми методами. Определение уровня глюкозы из хвостовой вены проводили с помощью глюкометра «Companion-2» (США) энзиматическим методом.

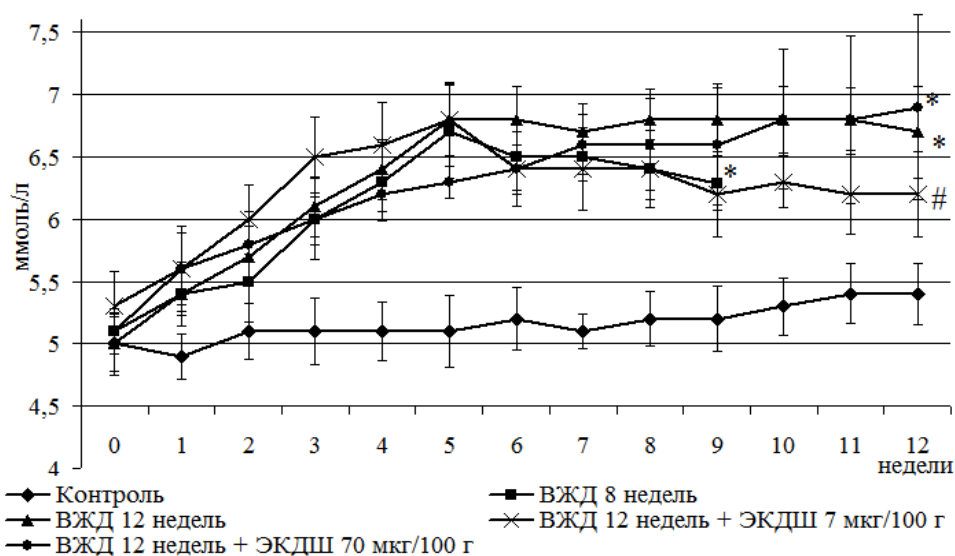
Измерение уровня инсулина в сыворотке крови крыс осуществляли радиоиммунным методом с использованием набора «РИО-инсулин-ПГ-¹²⁵J» (ИБОХ НАН Беларуси, Минск), лептина, адипонектина и TNF- α – иммуноферментным методом (ELISA) с использованием наборов фирмы BioCat (Германия). Уровень КС в сыворотке крови определяли методом высокочувствительной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе «Милихром» (Россия).

Для количественной характеристики гормонально-метаболических отношений были проанализированы девять коэффициентов, включающих биохимические показатели, имеющие отношение к развитию ИР: коэффициент 1 – глюкоза/ХС ЛПВП; коэффициент 2 – лептин/кортизол; коэффициент 3 – (лептин $\times$ ХС ЛПНП)/(кортизол $\times$ ХС ЛПВП); коэффициент 4 – (лептин $\times$ глюкоза)/(кортизол $\times$ ХС ЛПВП); коэффициент 5 – ОХС – ХС ЛПОНП/ОХС; коэффициент 6 – ОХС – ХС ЛПВП/ХС ЛПВП; коэффициент 7 – критерий Нема – [инсулин натощак (пмоль/л) $\times$ глюкоза натощак (ммоль/л)/405].

Математическую обработку полученных результатов проводили методами параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003, STATISTICA 6.0.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что ВЖД вызывает развитие ИР, что доказывается увеличением массы тела крыс через 2 и 3 месяца, соответственно, на 61% и 111%, концентрации глюкозы на 16,2% и 25,8%, инсулина на 57,6% и 87%, коэффициента Нема на 69% и 210%.

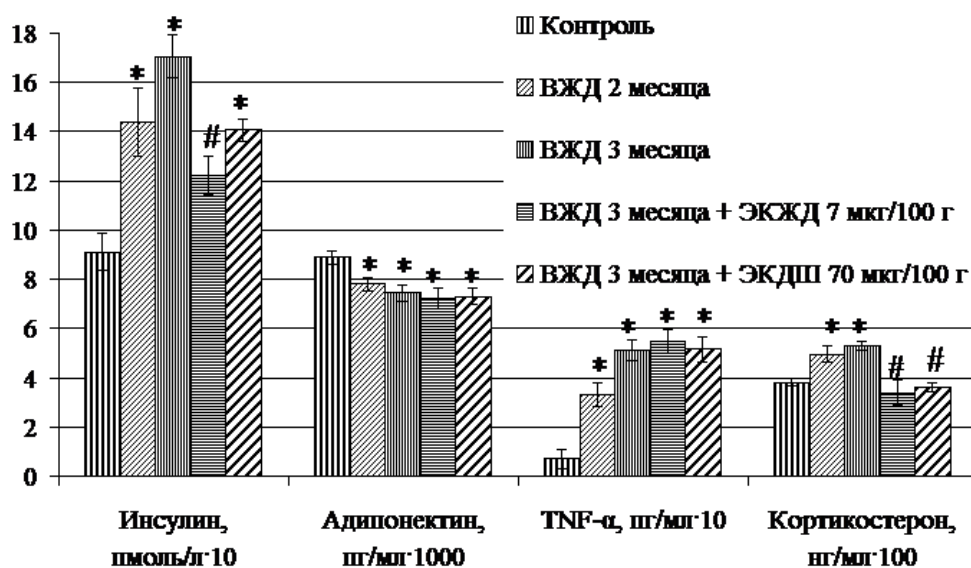
Динамика содержания глюкозы на протяжении всего эксперимента характеризуется значительным повышением ее концентрации у животных, получавших ВЖД, по сравнению с контрольной группой. Введение ЭКДШ в дозе 7 мкг/100 г массы тела в течение последнего месяца содержания животных на ВЖД приводит к постепенному снижению уровня глюкозы в крови, тогда как доза препарата 70 мкг/100 г массы тела не оказывает существенного влияния на этот показатель (рис. 1).



* $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # $P < 0,05$ по сравнению с группой ВЖД 12 недель.

Рис. 1. Динамика изменения концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ.

Развитие ИР сопровождается увеличением в сыворотке крови концентрации $\text{TNF-}\alpha$ в 4,7 и 7,2 раза, КС – в 1,4 и 1,5 раза через 2 и 3 месяца ВЖД, соответственно, и снижением концентрации адипонектина в 1,2 раза через 3 месяца ВЖД (рис. 2).



* $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # $P < 0,05$ по сравнению с группой ВЖД 3 месяца.

Рис. 2. Концентрация инсулина, адипонектина, $\text{TNF-}\alpha$, КС в сыворотке крови крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ.

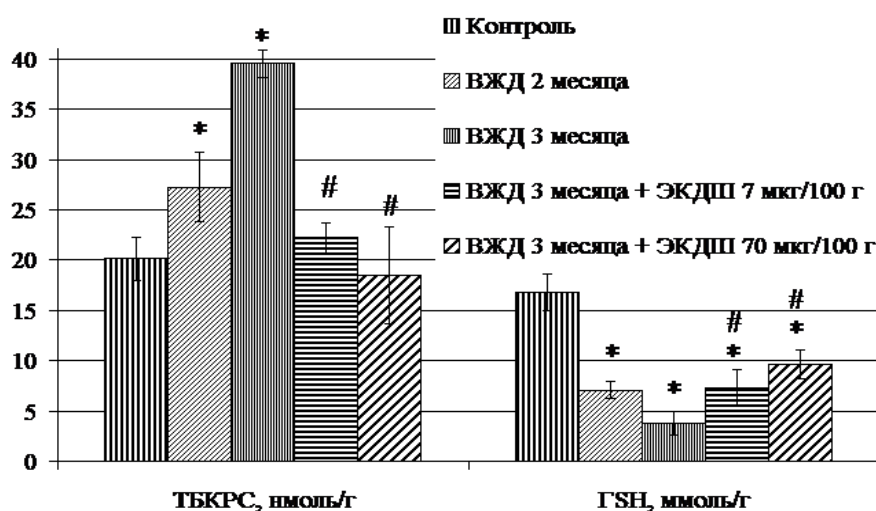
Выявлен положительный эффект ЭКДШ на показатели метаболизма при развитии ИР: масса тела уменьшается на 33,2%, гипергликемия – на 12%, значение коэффициента Нема – на 34,6%, концентрация инсулина – на 26,9%, КС – на 35,7% (рис. 2).

При развитии ИР выявлены биохимические признаки стеатогепатоза, что доказывается увеличением содержания ТГ в печени в 2,2 раза через 2 месяца ВЖД и в 3,0 раза через 3 месяца ВЖД и ХС в печени в 2,4 раза через 2 месяца и в 3,2 раза через 3 месяца ВЖД. Данные изменения сочета-

ются с атерогенными нарушениями транспорта липидов в сыворотке крови: увеличение концентрации ОХС в 1,4 раза через 3 месяца, снижение ХС ЛПВП в 1,2 раза через 2 и 3 месяца ВЖД и увеличение концентрации ТГ в 1,1 раза через 2 месяца ВЖД и 1,4 раза через 3 месяца ВЖД. ЭКДШ в обеих дозах снижает уровень ОХС, ТГ в сыворотке крови, повышает концентрацию ХС ЛПВП и уменьшает содержание ХС в печени.

Установлено, что содержание животных на ВЖД вызывает увеличение содержания ТБКРС в печени на 35% и на 96% и снижение уровня ГSH на 57,7% и 77,5% через 2 и 3 месяца ВЖД, соответственно (рис. 3). При использовании ЭКДШ в обеих дозах уровень ТБКРС снижается до значений контрольных животных; уровень ГSH повышается на 35,5% и 20,8% по сравнению со значениями у крыс, находившихся на ВЖД 3 месяца.

Оценка гормонально-метаболических взаимосвязей с использованием биохимических коэффициентов показала, что при моделировании ИР у крыс изменяются величины 1, 2, 3, 5, 6, 7 коэффициентов. Гормонально-метаболические коэффициенты при ВЖД схожи с таковыми у ликвидаторов, за исключением уменьшения соотношения лептин/кортизол, ОХС – ХС ЛПОНП/ОХС и постоянной величины отношения (лептин × глюкоза)/(кортизол × ХС ЛПВП). Полученные результаты демонстрируют, что у крыс развивается ИР в сочетании с дислипидемией. Уменьшение проявления ИР при использовании ЭКДШ сопровождается нормализацией величин данных коэффициентов.

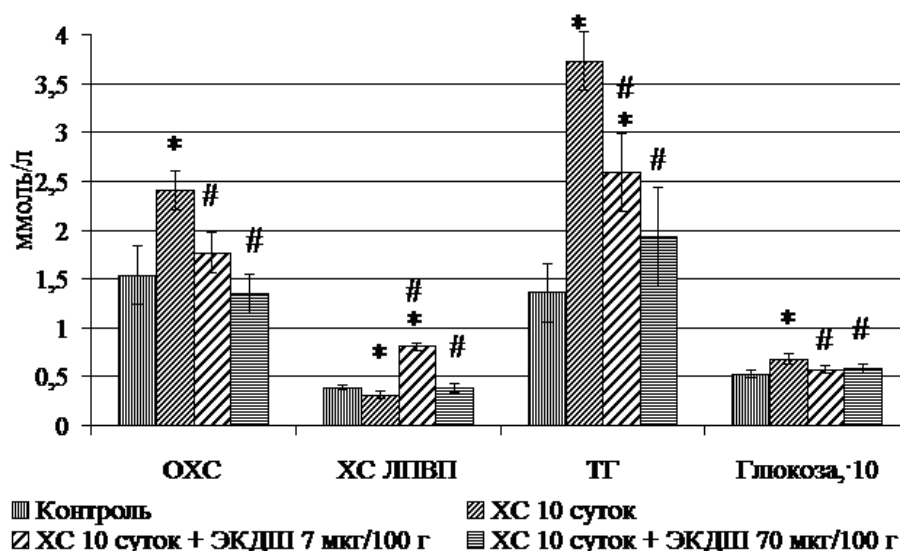


* $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # $P < 0,05$ по сравнению с группой ВЖД 3 месяца.

Рис. 3. Содержание ТБКРС и ГSH в печени при моделировании ИР и применении ЭКДШ.

При алиментарной ГХ выявлены метаболические нарушения, характерные для развивающейся ИР (рис. 4). В сыворотке крови при алиментарной гиперхолестеролемии найдено увеличение содержания глюкозы на 28,9%, ОХС на 56,5%, ТГ на 74,2% и снижение содержания ХС ЛПВП на 18,1%. В печени установлено истощение запасов гликогена в 11,7 раза на фоне увеличения концентрации общих липидов в 2,9 раза, ХС – в 1,6 раза (рис. 4).

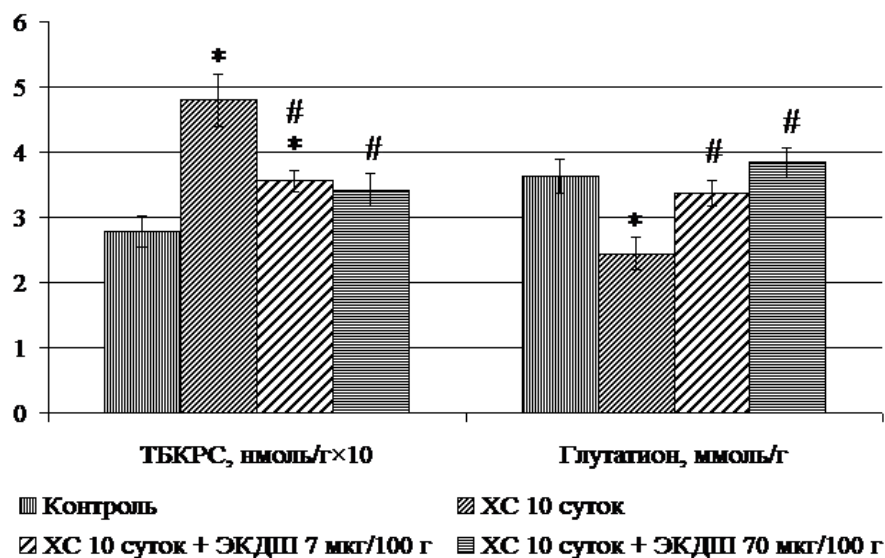
ЭКДШ в обеих дозах нормализует уровень ОХС в сыворотке крови до значений контрольных животных; в дозе 70 мкг/100 г массы тела – нормализует уровень ХС ЛПВП и ТГ; в дозе 7 мкг/100 г массы тела – повышает уровень ХС ЛПВП и снижает уровень ТГ (рис. 4).



* $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # $P < 0,05$ по сравнению с группой ХС 10 суток.

Рис. 4. Содержание ОХС, ХС ЛПВП, ТГ в сыворотке крови при моделировании ГХ и применении ЭКДШ.

Алиментарная ГХ сопровождается развитием окислительного стресса (рис. 5), что доказывается увеличением уровня ТБКРС в печени крыс в 1,7 раза и снижением уровня ГSH в 1,5 раза. ЭКДШ снижает содержание ТБКРС в печени и восстанавливает уровень ГSH до значений интактных животных.



* $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # $P < 0,05$ по сравнению с группой ХС 10 суток.

Рис. 5. Содержание ТБКРС и ГSH в печени при моделировании ГХ и применении ЭКДШ.

Закключение. Высокожировая диета у крыс в течение 3-х месяцев вызывает развитие инсулино-резистентности, которая характеризуется увеличением критерия Нема, индекса массы тела, концентрации глюкозы, инсулина, фактора некроза опухоли- α , кортикостерона и снижением концентрации адипонектина.

Инсулинорезистентность в эксперименте сопровождается развитием стеатогепатоза (увеличение содержания в печени триацилглицеролов и холестерина), атерогенными сдвигами сыворотки крови (увеличение концентрации общего холестерина, триацилглицеролов и снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности) в условиях активации свободнорадикального окисления (увеличение в печени содержания ТБК-реагирующих субстанций и снижение уровня восстановленного глутатиона).

Однормесное введение водного экстракта куколок дубового шелкопряда в процессе воспроизведения инсулинорезистентности уменьшает величину критерия Нота, массу тела, концентрацию глюкозы, инсулина, кортикостерона, ТБК-реагирующих субстанций, увеличивает уровень восстановленного глутатиона, нормализует показатели транспорта липидов в сыворотке крови и величины коэффициентов гормонально-метаболических взаимосвязей.

При алиментарной гиперхолестеролемии у крыс выявлены метаболические нарушения, характерные для развивающейся инсулинорезистентности (гипергликемия, гипертриацилглицеролемия и снижение концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности) в сочетании с проявлениями окислительного стресса (повышение содержания ТБК-реагирующих субстанций и снижение содержания восстановленного глутатиона). Экстракт куколок дубового шелкопряда нормализует уровни глюкозы, холестерина, триацилглицеролов, холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, ТБК-реагирующих субстанций и восстановленного глутатиона в печени.

Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей разработки методов профилактики и фармакологической коррекции гормонально-метаболических нарушений при развитии ИР. В частности, результаты по эффективности ЭКДШ рассматриваются как фрагмент этапа доклинических испытаний препарата, обладающего профилактическим действием при развитии ИР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease / J. Siebler [et al.] // World of Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12. – P. 1261–1267.
2. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects / T. Andersen [et al.] // J. Hepatol. – 1991. – Vol. 12. – P. 224–229.
3. Мельниченко, Г.А. Ожирение в практике эндокринолога / Г.А. Мельниченко // Русск. мед. журнал. – 2001. – Т. 9, № 2. – С. 82–87.
4. Чиркин, А.А. Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Вестн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2011. – № 1(61). – С. 30–36.
5. Мамедов, М.Н. Артериальная гипертензия в рамках метаболического синдрома: особенности течения и принцип медикаментозной коррекции / М.Н. Мамедов // Кардиология. – 2004. – № 4. – С. 95–100.
6. Measurements of glucose metabolism and insulin secretion during normal pregnancy and pregnancy complicated by gestational diabetes / S.B. Bowes [et al.] // Diabetologia. – 1996. – Vol. 39. – P. 976–983.
7. Оценка эффективности комплексной терапии антигипертензивными средствами и бигуанидами у больных с метаболическим синдромом / В.И. Маколкин [и др.] // Кардиология. – 2004. – № 10. – С. 39–42.
8. Effects of psylliumhydrophilic mucilloid on LDL-cholesterolemia / G.T. Everson [et al.] // J. Lipid Res. – 1993. – Vol. 33. – P. 1183–1192.
9. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis / N. Tanaka [et al.] // J. Clin. Gastroenter. – 2008. – Vol. 42, № 4. – P. 413–418.
10. Мараховский, Ю.Х. Клиническая оценка потенциальных возможностей и ограничений гепатопротекторов // Рецепт. – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 42–49.
11. Характеристика гепатопротекторных лекарственных средств, представленных на фармацевтическом рынке России / В.А. Егоров [и др.] // Фармация. – 1999. – № 6. – С. 23–26.

Поступила в редакцию 15.01.2013. Принята в печать 20.02.2013

Адрес для корреспонденции: e-mail: olgabal.tih@gmail.com – Балаева-Тихомирова О.М.