

ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ И АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГУМАТОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. В. Бузлама¹, Ю. Н. Чернов², А. И. Сливкин¹

¹ Воронежский государственный университет,

² Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Поступила в редакцию 15.02.2010 г.

Аннотация. В экспериментальных доклинических исследованиях, проведенных на 130 мышах и 190 крысах впервые установлено, что соли гуминовых кислот проявляют гипогликемическую и антидиабетическую активность. На модели глюкозотолерантного теста выявлено, что гуматы получаемые из 3-х различных сырьевых источников (лигнина, сапропелей и леонардита) обладают антигипергликемическими свойствами, причем наибольшую эффективность проявляет лигногумат. На моделях аллоксанового и стрептозотоцинового сахарного диабета доказано, что лигногумат проявляет гипогликемическую и антидиабетическую активность, обеспечивая снижение концентрации глюкозы в крови и более физиологичную динамику гликемии при проведении глюкозотолерантного теста. При аллоксановом диабете лигногумат повышает выживаемость животных, предотвращает снижение массы тела, а так же по данным гистологических исследований снижает выраженность повреждения бета-клеток поджелудочной железы. Лигногумат проявляет антиоксидантные свойства, что подтверждается повышением антиокислительной активности крови животных при острой интоксикации аллоксаном. По большинству критериев на обеих моделях аллоксанового и стрептозотоцинового диабета наибольшая эффективность лигногумата проявляется в низкой дозе 1,0 мг/кг при однократном внутримышечном введении.

Ключевые слова: гуминовые вещества, гуматы, диабет, экспериментальная фармакология.

Abstract. In experimental preclinical studies on 130 mice and 190 rats it was determined, that humic acid salts manifest hypoglycemic and antidiabetic activity. Humic acid salts, derived from lignine, sapropel and leonardit, display antihyperglycemic activity on the glucose tolerance test, that is maximal for ligninohumat. The studies examined on alloxan and streptozotocin experimental diabetes models shows the ligninohumat's hypoglycemic and antidiabetic activity, that developed by decrease of blood glucose concentration and more physiological glycemia dynamic during glucose tolerance test. On alloxan diabetes ligninohumat increase rats survivability, prevents body weight reduction and decrease the intensity of beta-cells injury by data of histology research. Ligninohumat shows antioxidant activity advices by blood antioxidative potency increase during acute alloxan intoxication. Maximal ligninohumat's effectiveness on both alloxan and streptozotocin diabetes models reveals in low dose 1.0 mg/kg at single intramuscular injection.

Keywords: humic substance, humate, diabetes, experimental pharmacology.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время целевыми задачами фармакотерапии сахарного диабета являются достижение стабильной компенсации, предотвращение развития осложнений и поиск способов профилактики. В последние десятилетия доказано, что применение антиоксидантов (токоферола ацетат, таурин, α -липоевая кислота и др.) приводит к улучшению метаболического контроля, показателей гликемии и способствует снижению прогрессирования осложнений сахарного диабета [3]. Актуален дальнейший поиск веществ, проявляющих гипоглике-

мические свойства, регулирующих метаболические процессы и активность системы антиоксидантной защиты. Одной их групп соединений, перспективных в указанном аспекте являются гуминовые вещества, известна их антиоксидантная активность [2], однако практически не изучены гипогликемические и антидиабетические свойства.

В связи с вышеизложенным, цель настоящего исследования — изучение гипогликемической и антидиабетической активности солей гуминовых кислот на экспериментальных моделях диабета.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проведены на 320 лабораторных животных (130 мышей, 190 крыс). Объекты ис-

следования: 3 экспериментальных «препарата», содержащие гуматы, получаемые из различных сырьевых источников: лигногумат — соли гуминовых кислот, получаемые из медицинского лигнина; сапропелевый гумат — натриевые соли гуминовых кислот, получаемые из придонных грязей (сапропелей); гумат леонардита — натриевые и калиевые соли гуминовых кислот, получаемые из бурого угля (леонардита).

Выбор объекта, перспективного для дальнейшего изучения антидиабетических свойств, проведен на основании скрининга гипогликемической активности всех 3-х препаратов при глюкозотолерантном тесте (ГТТ) на здоровых животных. Антидиабетические свойства изучали на экспериментальных моделях аллоксанового и стрептозотоцинового диабета [6].

Длительность наблюдений на каждой модели — 14 дней. Концентрацию глюкозы в крови измеряли глюкозо-оксидазным методом, забор крови осуществляли путем дистальной резекции хвоста.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При скрининге с использованием модели ГТТ исследования проведены на 100 мышах самцах и самках массой $20,3 \pm 3,2$ г — контрольная группа (40 животных, по 20 самцов и самок), 3 опытных группы (по 20 животных в каждой). Предварительно всех животных подвергали 12-часовой пищевой депривации. ГТТ воспроизводили путем введения

40,0% раствора глюкозы 3,0 г/кг однократно подкожно. Все 3 изучаемых препарата вводили в виде водных растворов в дозе 10,0 мг/кг. Данная доза выбрана для скрининга как 1/100 от дозы, приближающейся к ЛД 50 (при пероральном введении в дозе 1000 мг/кг летальности не наблюдается — III–IV класс токсичности). Гумат леонардита или сапропелевый гумат вводили однократно перорально за 30 мин. до глюкозы, лигногумат — однократно внутримышечно за 24 часа до глюкозы. В результате определения способности гуматов снижать гликемию натощак установлено, что лигногумат обеспечивает достоверное снижение гликемии на 18,6%, гумат леонардита на 13,2%, а сапропелевый гумат не проявляет выраженной гипогликемической активности. При ГТТ установлено, что сапропелевый гумат вызывал кратковременное снижение гликемии на 43,1% через 30 мин., гумат леонардита не оказал достоверного влияния на динамику гликемии. Лигногумат вызывал достоверное снижение гликемии через 30 мин. на 18,7%, через 60 мин. на 26,8% (рис. 1). Таким образом, наиболее перспективным для дальнейшего изучения следует считать лигногумат, поэтому, дальнейшее исследование антидиабетических свойств проведено именно для данного объекта.

На модели аллоксанового диабета исследования проведены в 2 этапа — на 1 этапе проведен выбор наиболее эффективной схемы введения лигногумата, на 2 — выбор максимально эффективной дозы.



Рис. 1. Гипогликемическая активность гуматов при ГТТ (здоровые животные)

На 1 этапе исследования проведены на 70 белых крысах самцах массой тела $160,0 \pm 25,5$ г (6 групп по 10 животных в каждой). Аллоксан вводили однократно подкожно в высокой диабетогенной дозе — $150,0$ мг/кг. Животным 6 опытных групп вводили лигногумат в дозе $10,0$ мг/кг однократно внутримышечно в разные сроки: «профилактика» — за 7, 4, 3 и 1 сутки до введения аллоксана, и «лечение» — через 1 и 24 часа после аллоксана. Установлено, что общетоксическое воздействие аллоксана вызывает гибель животных (контрольная группа) в течение 3—7 суток в $60,0\%$ случаев. Максимальной эффективностью обладает лигногумат, применяемый по схемам через 24 часа после аллоксана и за 7 суток до аллоксана, данные схемы обеспечивали $100,0\%$ выживаемость животных, что на $60,0\%$ больше чем в контроле. В контрольной группе диабетогенное снижение массы тела к 14 дню составило $19,9\%$ по сравнению с исходным. Введение лигногумата через 24 часа после аллоксана обеспечило достоверное нарастание массы на $5,3\%$. Наиболее эффективной по сравнению с другими (рис. 2) является схема введения лигногумата через 24 часа после аллоксана — на 3-и сутки обеспечивает достоверно ($P < 0,001$) в 2,19 раза меньшую чем в контроле концентрацию глюкозы и наиболее раннюю тенденцию к ее нормализации (9 сутки). Таким образом, перспективным для дальнейшего изучения является введение лигногумата через 24

часа после аллоксана, что послужило основой для проведения следующего этапа исследования — оценки эффективности различных доз лигногумата, вводимых по данной схеме.

На 2 этапе исследования проведены на 70 самцах крыс массой тела $160,0 \pm 10,5$ г — 5 групп (10 голов интакт, 15 — контроль, 3 опытных группы по 15 голов для 3-х различных доз лигногумата). Аллоксан в дозе 140 мг/кг вводили однократно подкожно, доза аллоксана в данной серии опытов была уменьшена по сравнению с 1 этапом для снижения летальности животных контрольной группы. Животным 3-х опытных групп вводили лигногумат однократно внутримышечно в дозах $1,0$, $10,0$ и $100,0$ мг/кг через 24 часа после аллоксана. На 3 сутки после введения аллоксана было произведено умерщвление 15 животных (хлороформный наркоз) — по 5 голов из интактной, контрольной и опытной групп (лигногумат $1,0$ мг/кг) с целью забора поджелудочной железы для гистологических исследований. ГТТ проводили на 11-й день эксперимента. Установлено, что наибольшую эффективность проявляет лигногумат в дозе $1,0$ мг/кг, предотвращая развитие гипергликемии в течение всего периода наблюдений (табл. 1): на 3-й день достоверно в 2,7 раза меньше, на 8-й день — в 4,6 раза ($P < 0,001$), на 14-й день — в 4,1 раза меньше, чем в контроле. На фоне применения лигногумата в дозе $1,0$ мг/кг клиническое состояние животных расценивалось как удовлетворительное, шерстные покровы являлись сухими и чистыми, проявления диабетической полидипсии и полиурии — менее выраженными, чем в контроле. При проведении на 11-й день ГТТ установлено, что наибольшее влияние на нормализацию гликемической кривой оказывает лигногумат в дозе $1,0$ мг/кг, обеспечивая через 30 мин. достоверно в 1,4 раза меньшую гликемию, через 60 мин. — в 2,5 раза меньшую, чем в контроле. При анализе гистологических материалов установлено, что у здоровых животных (интакт) поджелудочная железа имела типичное морфологическое строение, количество островков Лангерганса в среднем $32,0 \pm 5,5$ на 100 полей зрения. В контрольной группе выявлено снижение количества и размеров островков, клеток в островках, часть клеток с глубокими некротическими изменениями. На фоне применения лигногумата в дозе $1,0$ мг/кг выявлено снижение размеров островков по сравнению с интактом, однако клетки с некротическими изменениями практически отсутствовали (рис. 3), что согласуется с показателями гликемии и свидетель-

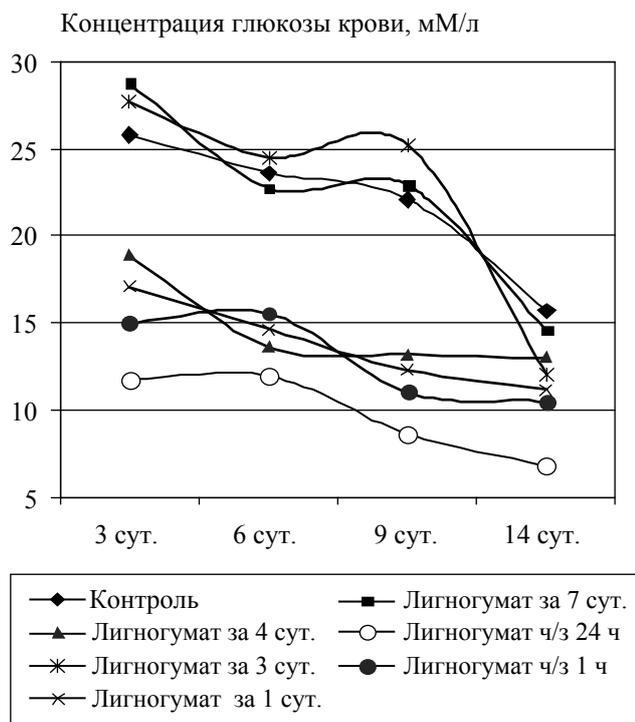


Рис. 2. Эффективность схем введения лигногумата (аллоксановый диабет)

Влияние различных доз лигногумата на динамику гликемии при аллоксановом диабете

Гликемия (на n сутки исследования)	Контроль	Лигногумат 1 мг/кг	Лигногумат 10 мг/кг	Лигногумат 100 мг/кг
3 сутки, мМ/л	23,3±1,57	8,6±0,80 ***	15,3±2,20 **	20,1±2,46
5 сутки, мМ/л	20,3±2,11	5,7±0,79***	10,8±1,10**	18,9±1,97
8 сутки, мМ/л	19,8±3,50	4,3±0,59***	5,5±0,73***	11,3±1,67***
10 сутки, мМ/л	18,3±2,40	6,8±0,87***	7,0±0,90***	6,7±0,95***
12 сутки, мМ/л	18,8±1,97	7,3±1,30**	8,8±0,85***	6,4±0,88***
14 сутки, мМ/л	25,0±0,42	6,0±0,44***	8,3±0,71**	8,0±1,10***

Примечание: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$ — достоверность различий при сравнении показателей опытных групп с контролем.

ствует о снижении активности деструктивных процессов в островках Лангерганса.

Для выяснения механизмов антидиабетического действия лигногумата определяли его антиоксидантные свойства при острой интоксикации аллоксаном. Исследование проведено на 30 мышах самцах массой 18,2±5,1 г (3 группы — интакт, контроль, опыт, по 10 в каждой). Аллоксан вводили в высокой диабетогенной дозе 240,0 мг/кг однократно подкожно. Лигногумат вводили однократно внутримышечно в дозе 10,0 мг/кг через 24 часа после аллоксана. Через 1 сутки животных умерщвляли (хлороформный наркоз), осуществляли забор крови и печени. Антиокислительную активность определяли методом люминолзависимой индуцированной биохемилюминесценции [1] на хемилю-

минометре БХЛ-06М и рассчитывали в виде разницы между светосуммой образца с добавлением плазмы крови (опыт) и без добавления (контроль). Установлено, что в контроле антиокислительная активность компонентов крови и печени достоверно снижается по сравнению со здоровыми животными (интакт) на 32,9% и 33,3%. Лигногумат обеспечивает повышение антиокислительной активности крови на 59,0% ($P < 0,001$) к контролю, и на 6,6% к интакту (рис. 4).

На модели стрептозотоцинового диабета исследования проведены на 50 самцах крыс массой 155,0±23,5 г (5 групп по 10 животных в каждой). Лигногумат применяли однократно внутримышечно в дозах 1,0, 10,0 и 100,0 мг/кг на 4-й день после первого введения стрептозотоцина. Установлено,

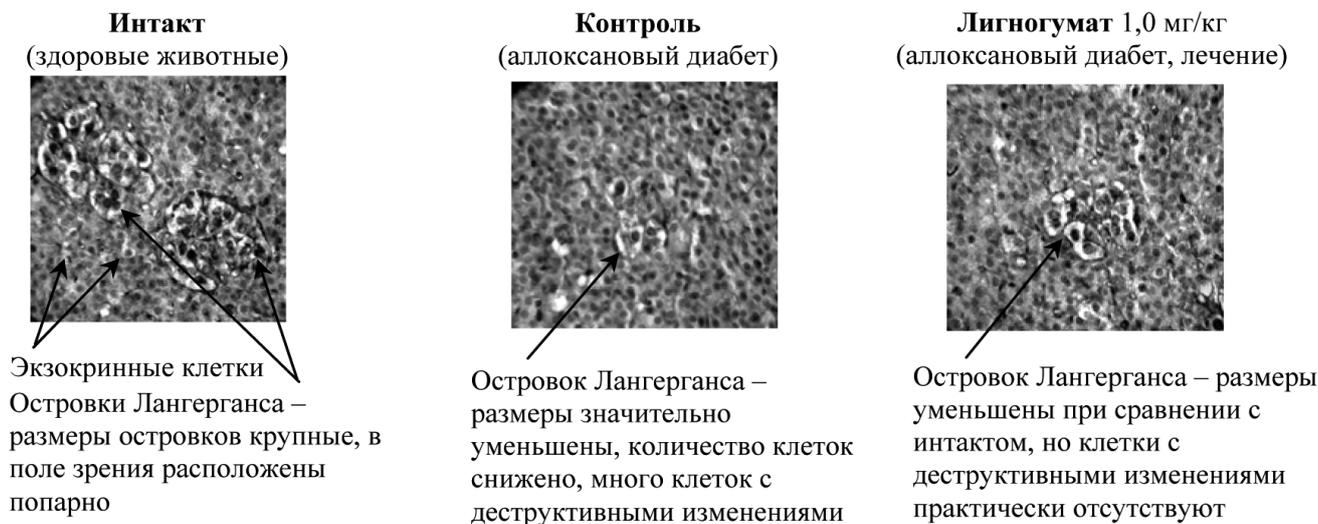


Рис. 3. Гистологическая картина поджелудочной железы (норма и аллоксановый диабет, 3 день). Увеличение — объектив 40. Окраска гематоксилин-эозин

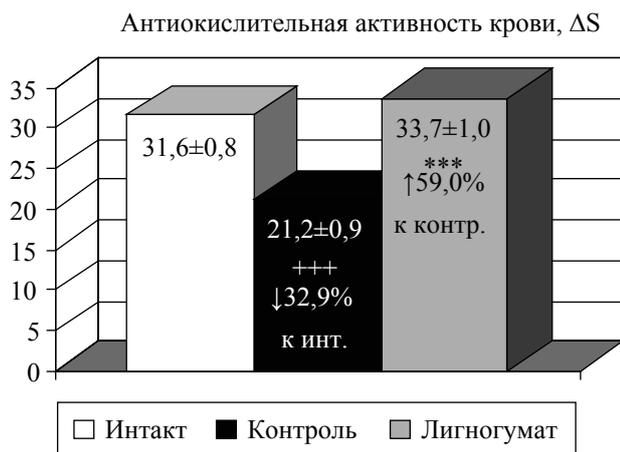


Рис. 4. Влияние лигногумата на антиокислительную активность крови (интоксикация аллоксаном)

что наиболее эффективным является лигногумат в дозе 1,0 мг/кг, обеспечивая на 4-й день достоверно на 36,2% меньшую гликемию, раннюю ее нормализацию начиная с 10-го дня, на 12-й день — достоверно ($P < 0,05$) в 1,4 раза меньший уровень гликемии по сравнению с контролем (табл. 2). При ГТТ установлено, что лигногумат в дозе 1,0 мг/кг, обеспечивает достоверное снижение гликемии через 60 и 120 мин. соответственно в 1,4 раза и в 1,7 раза по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Соли гуминовых кислот, получаемые из 3-х различных сырьевых источников способны снижать концентрацию глюкозы в крови, однако степень их влияния является различной и максимально выражена для лигногумата. С учетом того, что

у здоровых животных гуматы незначительно снижают уровень гликемии натощак, проявляя большую активность при функциональной нагрузке глюкозой на модели ГТТ, выявленный эффект следует расценивать скорее как нормогликемический, нежели гипогликемический. Лигногумат обладает антидиабетической активностью на модели аллоксанового диабета, что подтверждается повышением выживаемости животных, предотвращением снижения массы тела, снижением концентрации глюкозы, более физиологичной динамикой гликемии при ГТТ и данными гистологических исследований. Выявленная антиоксидантная активность лигногумата может являться одним из механизмов его антидиабетического действия, так как известно, что аллоксан вызывает свободнорадикальное повреждение β-клеток, имеющих слабую антиоксидантную защиту [6]. При стрептозотоциновом диабете лигногумат так же проявляет антидиабетическую активность, однако его эффективность является менее выраженной. Данный факт вероятно связан с различиями в механизмах диабетогенного действия аллоксана (свободнорадикальное повреждение β-клеток) и стрептозотоцина, вызывающего некроз β-клеток вследствие снижения уровня НАД и НАДФ [6]. По большинству критериев на обеих моделях экспериментального сахарного диабета наибольшая эффективность лигногумата проявляется в низкой дозе 1,0 мг/кг.

В связи с вышеизложенным, для коррекции метаболического статуса при сахарном диабете, перспективна разработка лекарственных препаратов, содержащих соли гуминовых кислот. В каче-

Таблица 2

Влияние лигногумата на динамику гликемии при стрептозотоциновом диабете

Гликемия (на n сутки исследования)	Контроль	Лигногумат 1 мг/кг	Лигногумат 10 мг/кг	Лигногумат 100 мг/кг
3 сутки, мМ/л	22,8 ± 2,45	17,0 ± 2,24	25,0 ± 2,11	28,8 ± 0,82*
4 сутки, мМ/л	24,6 ± 2,10	15,7 ± 1,40**	22,7 ± 1,92	28,3 ± 0,59
5 сутки, мМ/л	17,0 ± 2,11	17,3 ± 1,73	34,4 ± 4,01	21,0 ± 1,10
8 сутки, мМ/л	16,2 ± 2,02	15,2 ± 1,71	19,2 ± 0,91	8,7 ± 0,27***
10 сутки, мМ/л	11,0 ± 1,45	7,0 ± 0,51**	6,6 ± 2,19	13,3 ± 0,63
12 сутки, мМ/л	7,8 ± 0,85	5,4 ± 0,50*	7,8 ± 0,31	12,0 ± 3,28
14 сутки, мМ/л	7,0 ± 0,58	6,0 ± 0,40	12,2 ± 3,10	12,1 ± 2,86

Примечание: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$ — достоверность различий при сравнении показателей опытных групп с контролем.

стве преимуществ солей гуминовых кислот по отношению к известным группам сахароснижающих препаратов следует подчеркнуть широкий терапевтический интервал, низкую токсичность и невысокую себестоимость производства.

Механизм антидиабетического действия гуминовых кислот точно не установлен, в частности потому, что по данным литературы их гипогликемические и антидиабетические свойства практически не изучены. Тем не менее, учеными Республики Китай при проведении фундаментальных исследований на культурах клеток выявлено, что гуминовые кислоты вызывают пролиферацию пероксисом в печени мышей и индуцируют экспрессию ядерных рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом — PPAR γ [5]. Данные ученые не связывали установленный ими факт с механизмами антидиабетической активности, однако, известно, что основным механизмом действия антидиабетических препаратов группы тиазолидиндионы является именно агонизм в отношении рецепторов PPAR γ [4]. В связи с вышеизложенным можно предположить, что одним из механизмов антидиабетической активности гуминовых кислот

является агонизм в отношении PPAR γ , а так же антиоксидантные свойства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Удинцев Г.В. Пособие по клинко-лабораторным методам исследования / Г.В. Удинцев, В.Б. Бланк, Д. А. Кравец. — М.: Медицина, 1968. — 262с.
2. Федько И.В. Сравнительное изучение химического состава и биологической активности торфа в зависимости от степени его разложения / И.В. Федько, М.В. Гостищева, Р.Р. Исмадова // Химия растительного сырья. — 2008. — №1. — С 127—130.
3. Beneficial effects of antioxidants in diabetes / H. Kaneto [et al.] // Diabetes. — 1999. — Vol. 48. — P. 2398—2406.
4. Hashiramoto M. A target of PPAR γ agonist: diabetes mellitus / M. Hashiramoto, K. Kaku // Nippon Rinsho. — 2010. — Vol. 68, №2. — P. 284—293.
5. Peroxisome proliferation, adipocyte determination and differentiation of C3H10T1/2 fibroblast cells induced by humic acid: induction of PPAR in diverse cells / Y. Lee [et al.] // J. Cell. Physiol. — 1999. — Vol. 179. — P. 218—225.
6. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // Physiol. Res. — 2001. — Vol. 50, № 6. — P. 537—546.

Бузлама Анна Витальевна — доцент кафедры фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530380, e-mail: buzlamaa@yandex.ru

Чернов Юрий Николаевич — заведующий кафедрой клинической фармакологии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 371011, 656607

Сливкин Алексей Иванович — профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 530789

Buzlama A.V. — associate professor of the department of pharmacology, Voronezh State University; tel.: (4732) 530380, e-mail: buzlamaa@yandex.ru

Chernov Y. N. — professor, head of the department of clinical pharmacology, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 371011, 656607

Slivkin A. I. — professor, head of the department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh state university; tel.: (4732) 530789