УДК 599.32:591.2+616.379-008.64+615.322

*Е.А. Кривых [1], А.Е. Гуляев [2], Л.В. Коваленко [3], З.Т. Шульгау [4]*

# АНТИГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТОВ СЕВЕРНЫХ ЯГОД НА МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА У КРЫС, ИНИЦИИРОВАННОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ

[1] БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», г. Ханты-Мансийск, Российская Федерация;
[2] Частное учреждение «National Laboratory Astana» Назарбаев университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;
[3] БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет», г. Сургут, Российская Федерация;
[4] Республиканское государственное предприятие «Национальный центр биотехнологии», г. Нур-Султан, Республика Казахстан

**Резюме**. ***Целью*** данного исследования явилось изучение потенциальных терапевтических свойств водно-спиртовых экстрактов черники, голубики, брусники, клюквы на модели экспериментального стрептозотоцинового сахарного диабета. ***Материал и методы исследования***. Для получения полифенольных водно-спиртовых экстрактов северных ягод использовали дикорастущую клюкву, чернику, бруснику, голубику, собранную в летне-осенний период 2018 года в Сургутском районе Ханты-Мансийского округа Тюменской области Российской Федерации. Концентрирование экстрактов проводили в вакуумном испарителе до уровня полифенолов в 10 мг/мл. Крысам вводили полифенольные экстракты из расчета 10 мг/кг (вводимый объем 0,2-0,3 мл). ***Результаты***. Концентрацию полифенолов в образцах исследовали, используя коммерческий набор для определения концентрации полифенолов «Polyphenols folin-ciocalteu (ENOLOGY line by BioSytems. Spain)», в соответствии с инструкцией производителя реагента. Результаты выражали в эквиваленте галловой кислоты, т.е. мг галловой кислоты/мл ягодного экстракта (mgGAE /ml). ***Заключение***. На модели сахарного диабета II типа, полученного у крыс при введении стрептозотоцина, исследовано влияние экстрактов дикорастущих ягод клюквы, брусники, черники и голубики Северо-Западной Сибири на уровень гликемии и инсулинорезистентности, показатели липидного обмена, уровень экспрессии CRP, IL-6 и TNF-α в печени и жировой ткани крыс, также установлены гистопатологические изменения в ткани поджелудочной железы. Определено, что экстракты черники, клюквы, брусники и голубики на модели диабета снижают выраженность инсулинорезистентности наподобие метформина, снижают уровень гликемии (кроме экстракта брусники), снижают концентрацию триглицеридов (кроме экстракта брусники), уменьшают концентрацию ЛПНП (кроме брусники и клюквы). Использование на фоне диабета экстракта черники снижает экспрессии генов воспалительных цитокинов IL-6, TNF-α и CRP. При этом в плазме крови экстракты северных ягод препятствуют избыточному выбросу свободных радикалов и повышают антиоксидантную активность. Патоморфологические исследования ткани поджелудочной железы документируют меньшую степень повреждения островков Лангерганса на фоне введения экстрактов северных ягод.

**Ключевые слова**: модель диабета, стрептозотоцин, экстракты клюквы, брусники, черники, голубики, гликемия, инсулинорезистентность, триглицериды, ЛПНП оксидативный статус, гистология ткани поджелудочной железы

Конфликт интересов отсутствует.
Контактная информация автора, ответственного за переписку:
Кривых Елена Алексеевна
KrivyhEA@hmgma.ru
Дата поступления 04.03.2020 г.
Образец цитирования:
Кривых Е.А., Гуляев А.Е., Коваленко Л.В., Шульгау З.Т. Антигипергликемический эффект экстрактов северных ягод на модели сахарного диабета II типа у крыс, инициированного стрептозотоцином. http://vestnikural.ru/

article/1138 [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №3, с. 193–205, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-3-193-205

**Введение**

Принято относить сахарный диабет к категории болезней оксидативного стресса и хронического течения воспалительного процесса [1]. Окислительный стресс, сопровождающийся усилением свободнорадикальных процессов и снижением функционирования эндогенной антиоксидантной системы, является, видимо, важным патофизиологическим звеном развития осложнений при сахарном диабете [2, 3].

На этом фоне поиск новых биологически активных веществ, способных проявлять комплексную активность на основе универсального антиоксидантного и противовоспалительного механизма действия, не теряет актуальности.

Представляет большой научный и практический интерес расширение объема экспериментальных исследований с целью доказательства гипогликемической и антиоксидантной активности индивидуальных веществ и экстрактов, содержащих фенольные соединения, на различных моделях *in vivo*, из которых наиболее информативной является модель сахарного диабета.

Наибольшее распространение в современной экспериментальной диабетологии получили химические модели сахарного диабета, чаще всего модель сахарного диабета у экспериментальных животных получают, используя стрептозотоцин [4]. Относительно механизма действия стрептозотоцина известно, что одной из основных причин, вызывающих токсическое поражение ß-клеток, многие авторы называют образование гидроксильных радикалов [5]. Эти гидроксильные радикалы и считают в конечном итоге ответственными за гибель β-клеток, имеющих особенно низкую антиоксидантную защитную способность, и последующее развитие диабета.

Как источник полифенолов-антиоксидантов более изучены культивируемые черника (Vaccinium myrtillus) и, существенно меньше, клюква (Vaccinium erythrocarpum) в северо-американском и северо-европейском вариантах [6,7]. Относительно других северных ягод сведений крайне мало, а эффекты на моделях диабета описаны недостаточно.

Для уточнения возможности влияния экстрактов северных ягод региона Северо-Западной Сибири на углеводный и липидный обмен эксперимент был проведен на модели сахарного диабета II типа, полученной с помощью стрептозотоцина.

**Целью** данного исследования явилось изучение потенциальных терапевтических свойств водно-спиртовых экстрактов черники, голубики, брусники, клюквы на модели экспериментального стрептозотоцинового сахарного диабета.

**Материал и методы исследования**

Для получения полифенольных водно-спиртовых экстрактов северных ягод использовали дикорастущую клюкву, чернику, бруснику, голубику, собранную в летне-осенний период 2018 года в Сургутском районе Ханты-Мансийского округа Тюменской области Российской Федерации. Концентрирование экстрактов проводили в вакуумном испарителе до уровня полифенолов в 10 мг/мл. Крысам вводили полифенольные экстракты из расчета 10 мг/кг (вводимый объем 0,2-0,3 мл). Концентрацию полифенолов в образцах исследовали, используя коммерческий набор для определения концентрации полифенолов «Polyphenols folin-ciocalteu (ENOLOGY line by BioSytems. Spain)», в соответствии с инструкцией производителя реагента. Результаты выражали в эквиваленте галловой кислоты, т.е. мг галловой кислоты/мл ягодного экстракта (mgGAE /ml).

В работе были использованы крысы Wistar, самцы в возрасте 7-8 месяцев, массой тела 210-230 гг. Они были размещены в клетках при комнатной температуре (22±2) °С с 12-часовым циклом свет/темнота и минимальной относительной влажностью 40%. Крыс кормили стандартным гранулированным кормом и доступ к воде был свободным, *ad libitum*.

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации. Приложение утверждено приказом Министерства Здравоохранения Российской Федерации

от 19.06.2003 № 267, а также Европейской Конвенциией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) ETS N 123.

Моделирование сахарного диабета II типа (СД2) [8]. 50 крыс самцов Wistar кормили коммерческим вариантом сухого гранулированного корма с повышенным содержанием жиров (El-Gomhoria Company, Cairo, Egypt). В качестве источника избыточного количества углеводов использовали 10%-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды в течение 4 недель.

Таблица 1

Состав диеты с повышенным содержанием жиров (г/кг)

| Ингредиенты | Диета с повышенным содержанием жиров AIN-76A diet #100496 |
|---|---|
| Casein | 200 |
| DL-Метионин | 3 |
| Corn Statch | 150 |
| Sucrose | 345 |
| Cellulose | 50 |
| Corn Oil | – |
| Beef Tallow | 205 |
| Salt Mixture | 35 |
| Vitamine Mixture | 10 |
| Choline Bitartrate | 2 |
| Fat % (Calories) | 40 |

Далее, через 4 недели всем животным внутрибрюшинно ввели по 45 мг/кг стрептозотоцина в 0,2 М растворе натрия фосфата (pH 4,5), дважды через 3 дня. Стрептозотоцин вводили крысам после 12-часового голодания. Через 3 дня после последней инъекции стрептозотоцина оценивали уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крысы, на приборе для измерения уровня глюкозы крови «Gamma Mini» (Gamma, Великобритания). Основной критерий включения крыс в экспериментальную группу — уровень глюкозы крови более 15 мМоль/л, таковых оказалось 33 головы. Для получения лечения в течение 6 дней (недели) были сформированы следующие группы животных: a) интактные (n=3) b) контроль (модель диабета), получавшие ежедневно по 0,5 мл воды интрагастрально, n=5; c) группа сравнения, получавшие ежедневно 300 мг/кг метформина (в виде суспензии в 0,5 мл воды) интрагастрально, n=5; d) группа, получавшая экстракт клюквы ежедневно по 0,5 мл интрагастрально, n=6; e) группа, получавшая экстракт брусники ежедневно по 0,5 мл интрагастрально, n=6; f) группа, получавшая экстракт черники ежедневно по 0,5 мл интрагастрально, n=6; g) группа, получавшая экстракт голубики ежедневно по 0,5 мл интрагастрально, n=5.

Во всех экспериментах присутствовали интактные крысы такого же возраста, массы тела и пола, как и участвующие в моделировании.

Через 24 часа после окончания периода моделирования проведен тест толерантности к инсулину для подтверждения наличия диабета II типа. Тест толерантности к инсулину выполняли следующим образом. Раствор кристаллического инсулина (30 МЕ/100 г массы тела, LILLY) вводили подкожно. Образцы крови собирали через 30, 60 и 120 мин. в пробирки с гепарином и 25 мкл аликвоты были использованы для определения концентрации глюкозы глюкозо-оксидазным методом. Одного разреза на кончике хвоста было достаточно, чтобы собрать все образцы крови. На графике концентрация/время строили фармакокинетическую кривую глюкозы в крови. С помощью компьютерной программы Bordgia 1.03 рассчитывали AUC (интегральная площадь под фармакокинетической кривой), по методу наименьших квадратов проводили анализ кривой содержания глюкозы в крови от 0 до 120 минут [9].

Уровень глюкозы определяли через 72 часа после введения аллоксана и на шестые сутки от начала введения исследуемых экстрактов в крови, взятой из хвостовой вены, на приборе для измерения уровня глюкозы крови «Gamma Mini» (Gamma, Великобритания).

При исследовании уровня экспрессии CRP, IL-6 и TNF-α крыс с моделью диабета mРНК из печени и жировой ткани (паранефральный жир) выделяли, ре-транскрибировали ДНК и подвергали двухстадийной амплификации с помощью обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени с использованием специфических праймеров для генов CRP, IL-6 и TNF-α с использованием мини-набора RNeasy

Lipid Tissue (Qiagen # 74804) для жировой ткани, в то время как мРНК из печени выделяли с использованием мини-набора RNeasy (Qiagen # 74104). Качество и количество выделенной мРНК определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 260 нм и 280 нм в кюветах, прозрачных для УФ-излучения. Обратная транскрипция к ДНК и удаление геномной ДНК были выполнены с использованием QuantiTect Reverse. Комплект для транскрипции (Qiagen # 205313). Продукт обратной транскрипции подвергали воздействию ОТ-ПЦР в системе количественной ПЦР (Bio-Rad CFX96) с использованием мастер-смеси Sybr Green (SSoFastEvaGreen, Bio Rad # 172-5202) и праймеров (F – прямых, R –обратных) специфичных для крыс:

TNFα-F: 5′-GGGACAGTGACCTGGACTGT-3′.
TNFα-R: 5′-TTCGGAAAGCCCATTTGAGT-3′.
IL6-F: 5′-TCTATACCACTTCACAAGTCGGA-3′.
IL6-R: 5′-GAATTGCCATTGCACAACTCTTT-3′.
CRP-F: 5′-TTCCCAAGGAGTCAGATACTTCC-3′.
CRP-R: 5′-TCAGAGCAGTGTAGAAATGGAGA-3′.

Для каждого праймера и ткани (печени или жировой ткани) анализ проводили в трех повторностях с реакционным объемом 20 мкл на лунку (SybrGreen Mix 1×, праймеры прямые и обратные 0,2 мкМ, продукт обратной транскрипции 1,5 мкл). После стадии активации фермента (95°C в течение 30 с), 45 циклов амплификации проводилось (денатурация при 95°C в течение 2 с, отжиг/удлинение при 60°C в течение 5 с), затем следует кривая плавления (75–95°C при увеличении на 0,5°C, 2с на шаг) для обеспечения специфики амплификации. Относительная экспрессия генов была определена методом ΔΔCt, как описано Livak и Schmittgen [10] относительно гена домашнего хозяйства (бета-актин) и выражается в виде кратной вариации по сравнению с контрольными животными.

Исследование оксидативного статуса в плазме крови крыс на 6 сутки от начала введения экстрактов проведено на приборе FRAS 4 — Free Radical Analytical System (Evolvo s.r.l., Italy) с использованием коммерческих наборов Kit REDOX, включающих D-ROMs test (показывает концентрацию активных форм кислорода (АФК) в плазме крови, исчисляется в произвольных единицах, называемых «Carratelli Units» (U. Carr)) и PAT test (характеризует общую антиоксидантную активность плазмы крови в произвольных единицах «Cornelli Unit» (U. Cor)) [11].

Для гистологического исследования были взяты образцы ткани поджелудочной железы крыс, которые фиксировали в 10% формалине при 4°C не менее 24 часов, окрашивали гематоксилином и эозином, анализировали на специализированном аппаратном компьютеризированном комплексе фирмы «Leica microsystems» на микроскопе «Leica DM 1000».

Статистический анализ. Данные были выражены как Me [min; max], где

M — медиана;
min — минимальное значение;
max — максимальное значение.

**Результаты и обсуждение**

Таблица 2

Результаты теста толерантности к инсулину у крыс, получавших экстракты северных ягод Me [Q1; Q3]

| Группы экспериментальных животных | Интегральная площадь под кривой «концентрация-время» (AUC) глюкозы в течение времени 0–120 мин. |
|---|---|
| Интактные крысы (n=3) | 613,7 [485,7-695,7] |
| Контроль (n=5) | 1670,4 [1435,1-1815,6] |
| Экстракт черники (n=6) | 1210,6 *[985,6-1415,5] |
| Экстракт клюквы (n=5) | 1309,0*[1035,5-1455,5] |
| Экстракт брусники (n=5) | 1495,9 *[1215,6-1515,5] |
| Экстракт голубики (n=5) | 1247,0 *[885,6-1388,1] |
| Метформин (n=5) | 938,4 *[698,6-1125,1] |

Примечание: * $p<0,05$ в сравнении с группой контроля (плацебо).

Как видно из таблицы 2, у крыс в контроле и во всех экспериментальных группах значительно увеличивается AUC глюкозы, что может свидетельствовать о наличии выраженной инсулинорезистентности. Однако, достоверные различия с величиной AUC глюкозы получены при введении экстрактов клюквы, брусники, черники и голубики, а также препарата сравнения — метформина. Все экстракты ягод и метформин в определенной степе-

ни уменьшают AUC глюкозы, что является проявлением уменьшения выраженности инсулинорезистентности. Известно, что снижение чувствительности клеток к инсулину, проявляющееся ростом AUC глюкозы является одним из факторов, способствующих развитию СД2 [12]. Инсулинорезистентность приводит к нарушению регуляции углеводного обмена, развитию гипергликемии и воспалительного статуса в тканях, что входит в патогенез СД2 [13]. Зафиксированную в условиях наших экспериментов некоторую коррекцию инсулинорезстентности при введении экстрактов сверных ягод мы склонны рассматривать как потенциально терапевтический.

Результаты исследования влияния экстрактов черники, голубики, брусники и клюквы на содержание глюкозы и некоторые показатели липидного обмена в крови крыс с экспериментальным стрептозотоциновым сахарным диабетом приведены в таблице 3. Наряду с инсулинорезистентностью, зафиксированной по данным таблицы 2, доказательством наличия адекватной модели сахарного диабета II типа служит наличие в контроле гипергликемии, повышенного содержания триглицеридов и повышенного уровня ЛПНП (таблица 3).

Как видно из представленных данных, коррекция гипергликемии в сторону уменьшения произошла как в случае введения стандартного гипогликемического препарата метформин, так и в случае применения экстрактов черники, клюквы, голубики, единственный вариант, когда уменьшение уровня гликемии не достигает статистически значимого уровня — вариант использования брусники. Следует заметить, что уровень снижения глюкозы у крыс с моделью диабета под действием экстракта черники, не отличается от снижения глюкозы, вызываемого препаратом сравнения метформином. Таким образом, водно-спиртовые экстракты клюквы, черники и голубики в условиях данной модели препятствуют гипергликемическому действию стрептозотоцина и имеют гипогликемический эффект, приближающийся по выраженности к эффекту метформина.

Снижение уровня концентрации триглицеридов в крови крыс с моделью СД2 мы нашли в случае применения экстрактов клюквы, черники и голубики (в случае использования метформина и экстракта брусники эффект снижения триглицеридов не достигает уровня достоверности). Уменьшение концентрации ЛПНП установлено нами при применении экстрактов черники и голубики. Не определено влияние исследуемых экстрактов на уровень общего холестерина и ЛПВП.

О вероятности снижения уровня гликемиии на моделях диабета параллельно со снижением уровня триглицеридов и липопротеидов низкой плотности при введении экспериментальным животным антоциан-содержащих субстанций сообщает ряд исследователей [14-16]. Результаты наших экспериментов, в принципе, подтверждают такую возможность для экстрактов северных ягод (преимущественно для экстрактов черники и голубики, которые могут содержать более высокие концентрации антоцианов чем клюква или брусника [17]). Есть сведения, что максимальное содержание антоцианов среди множества ягод и фруктов находится именно в экстракте черники [18].

Учитывая это обстоятельство, мы провели исследование потенциала влияния экстракта черники на биомаркеры воспаления в ткани печени и в жировой ткани крыс с моделью СД2.

Результаты исследования генетической экспрессии молекул, связанных с хроническим воспалением, представлены на рисунках 1-3.

Таблица 3

Результаты исследования терапевтического влияния экстрактов северных ягод на модели сахарного диабета II типа

| Параметры | Варианты исследования | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Интактные крысы n=3 | Контроль n=5 | Препарат сравнения (метформин) n=5 | Экстракт клюквы n=5 | Экстракт брусники n=5 | Экстракт черники n=5 | Экстракт голубики n=5 |
| Глюкоза, мМоль/л | 3,5[2,1-4,4] | 29,4±1,6# [25,6-31,7] | 9,1±0,8* [7,6-11,5] | 18,2 [15,6-20,1] | 22,5 [18,5-25,6] | 13,2±1,4* [8,5-15,6] | 17,2±2,0* [14,1-19,5] |
| Триглицериды, мг/дл | 117,6± 20,4 [100,1-125,6] | 158,1±38,2# [148,1-177,5] | 140,5±21,8 [138,1-160,5] | 128,4±16,6* [115,6-135,5] | 148,5±18,6* [135,1-148,2] | 116,0± 22,4* [98,5-135,1] | 120, 4±27,8* [111,5-131,1] |
| Холестерин, мг/дл | 109,7[91,5-115,6] | 122,9 [110,1-129,6] | 130,3 [121,6-155,1] | 129,0 [119,0-139,5] | 136,9 [128,6-144,5] | 120,8 [101,5-130,6] | 132,8 [115,6-144,5] |
| ЛПНП, мг/дл | 39,6±5,1 [30,1-42,5] | 56,0 [43,0-66,5] | 46,8[41,1-50,2] | 48,3[38,5-51,1] | 40,1[35,1-45,5] | 38,8 [31,1-41,5] | 35,3[30,5-41,1] |
| ЛПВП, мг/дл | 41,9 [38,8-49,5] | 34,4 [29,1-45,5] | 35,3 [21,1-45,5] | 29,6 [21,1-35,5] | 33,8 [27,6-35,5] | 39,5 [34,1-41,1] | 38,5 [31,5-41,8] |

Примечание: * p<0,05 в сравнении с группой контроля; # p<0,05 в сравнении с интактными животными

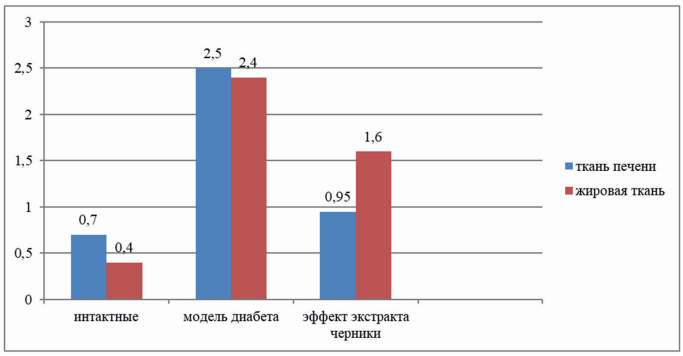



Рисунок 1. Относительная экспрессия гена IL-6, связанного с воспалением у крыс с моделью сахарного диабета (Me выраженные как 2-ΔΔCt, нормализованных к бета-актину).

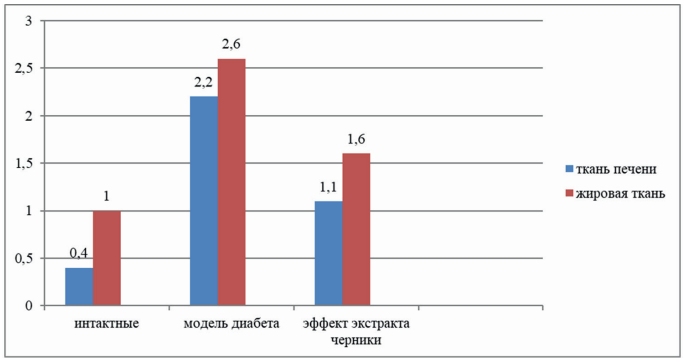



Рисунок 2. Относительная экспрессия гена TNF-α, связанного с воспалением у крыс с моделью сахарного диабета (M±s.e.m, выраженные как 2-ΔΔCt, нормализованных к бета-актину).

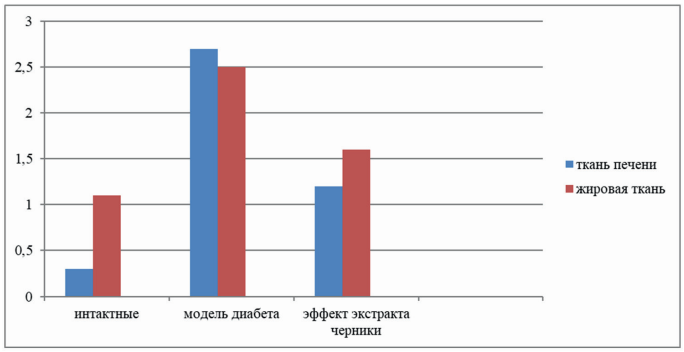



Рисунок 3. Относительная экспрессия гена CRP, связанного с воспалением у крыс с моделью сахарного диабета (M±s.e.m, выраженные как 2-ΔΔCt, нормализованных к бета- актину).

Как видно, и в ткани печени и в жировой ткани крыс с моделью диабета экспрессия IL-6, TNF-α и CRP была значительно выше, чем у интактных крыс, что подтверждает участие хронических воспалительных процессов в патофизиологии диабета II типа. Использование на фоне диабета экстракта черники дает эффект «гашения» экспрессии воспалительных генов цитокинов IL-6, TNF-α и CRP, во всех случаях уровень экспрессии статистически ниже, чем у крыс с моделью диабета в контрольной группе.

Далее мы попытались описать оксидативный статус у крыс с моделью сахарного диабета и определить вероятные эффекты исследуемых экстрактов северных ягод. Данные представлены в таблице 4.

Как видно, оксидативный статус у крыс с моделью диабета характеризовался относительно высоким уровнем концентрации свободных радикалов в плазме крови (D-ROMs test) и пониженным уровнем активности антиоксидантной системы (PAT test), что укладывается в общее представление относительно оксидативных процессов при диабете [1, 3]. Экстракты ягод клюквы, брусники, черники и голубики в этом случае уменьшали активизацию свободных радикалов и повышали антиоксидантную защиту. Экстракты черники и голубики в этом отношении кажутся более привлекательными.


on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

Результаты этого фрагмента работы доказывают, что применение экстрактов северных ягод у крыс с моделью сахарного диабета II типа значительно и положительно влияет на биохимические и эпигенетические характеристики, уменьшая степень инсулинорезистентности, снижая уровень гликемии и нарушений липидного обмена, оксидативного стресса, экспрессии воспалительных генов и, в результате, препятствуя развитию диабета или корректируя его тяжесть.

Таблица 4

Интегральные показатели влияния экстрактов северных ягод на оксидативный статус на фоне модели диабета II типа

| Группы экспериментальных животных, n | Исследуемые параметры | |
|---|---|---|
| | D-ROMs test, U Carr | PAT test, U Cor. |
| Интактные животные, n=5 | 395,2±31,7 355,1-415,6 | 2376±212 2111-2585 |
| Животные с моделью диабета, контроль, n=6 | 911,3±81,4 788,1-1100,5 | 1836±137 1566-1988 |
| Животные с моделью диабета, получавшие экстракт клюквы, n=6 | 564,3±33,1* 488,1-611,5 | 2274±159* 2100-2555 |
| Животные с моделью диабета, получавшие экстракт брусники, n=6 | 582,1±44,2 499,6-650,6 | 2219±150* 1999-2488 |
| Животные с моделью диабета, получавшие экстракт черники, n=6 | 318,8±25,9* 288,5-355,6 | 2405±183* 2115-2685 |
| Животные с моделью диабета, получавшие экстракт голубики, n=6 | 440,0±39,5* 385,0-477,1 | 2574±203* 2288-2795 |

Примечание: * — p≥0,05 с контролем

Это же подтверждают и результаты морфологических исследований, приведенные ниже: на модели сахарного диабета II типа экстракты клюквы, черники, голубики и экстракт брусники (в меньшей степени) препятствуют повреждению структуры поджелудочной железа и островков Лангерганса в частности.

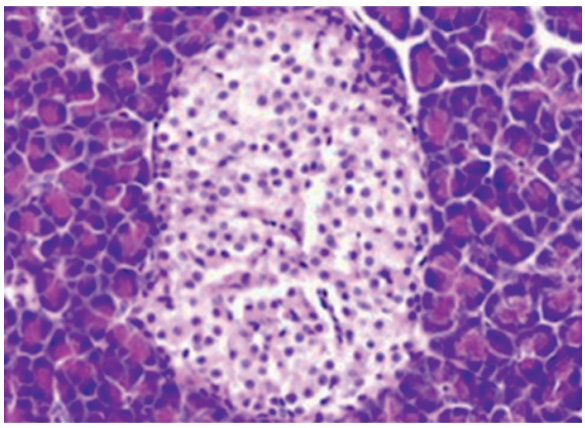


Рисунок 4. Поджелудочная железа (интактные крысы). Нормальная структура поджелудочной железы у контрольных крыс. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×200.

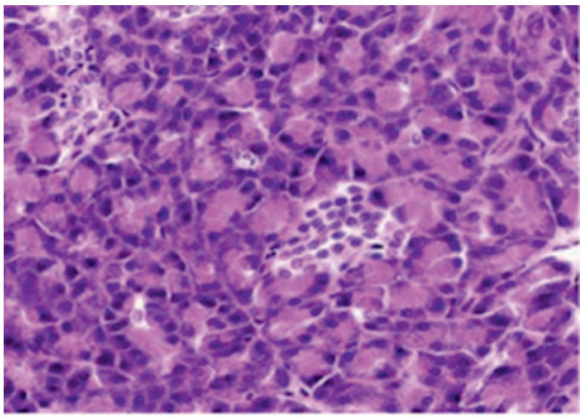


Рисунок 5. Поджелудочная железа (модель диабета). Уменьшение размера островка Лангерганса и множе-

ственная дегенерация. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×200.

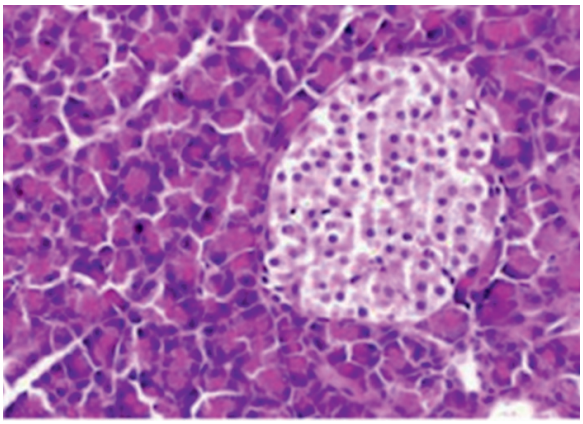


Рисунок 6. Поджелудочная железа (модель диабета, применение экстракта черники). Более сохраненная структура островка Лангерганса по сравнению с рис. 2. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×200.

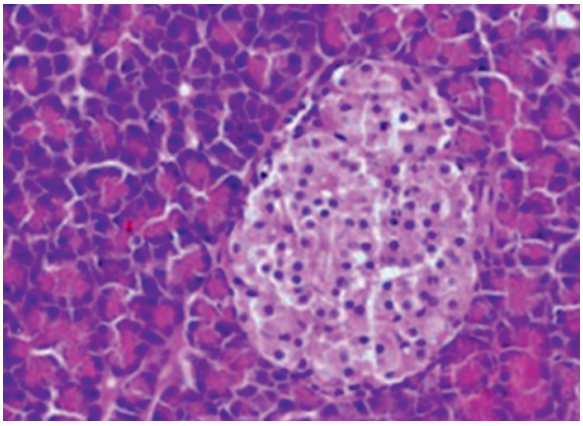


Рисунок 7. Поджелудочная железа (модель диабета, применение экстракта голубики). Более сохраненная структура островка Лангерганса по сравнению с рис. 2. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 200.

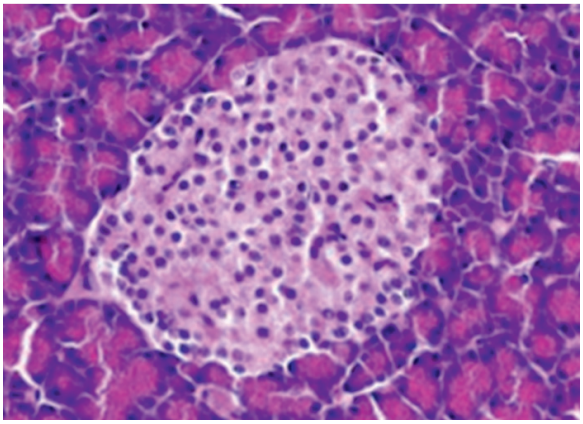


Рисунок 8. Поджелудочная железа (модель диабета, применение экстракта клюквы). Повреждение островка Лангерганса, некоторая деградация, но более сохраненная структура по сравнению с рис. 2. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×200.

Зафиксированные нами эффекты в определенной степени укладываются в ранее описанный механизм антиоксидантного и противовоспалительного действия полифенолов — антоцианов темно-окрашенных ягод, включая клюкву, бруснику, чернику, голубику американского и европейского происхождения [19]. Расширенное (по спектру экстрактов — включение голубики и регионов происхождения — добавление Северо-Западной Сибири) описание эффектов полифенольных экстрактов ягод на модели сахарного диабета II типа может найти общие закономерности и создать основу для будущих клинических исследований. Перспективность такого подхода определяется тем обстоятельством, что сахарный диабет стал одной из основных проблем здравоохранения, а неадекватное регулирование уровня сахара в крови влечет за собой серьезные последствия для здоровья. Мы со-


on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

гласны с утверждением исследователей из 28 университетских центров Европы, Америки и Азии [20], заявляющих о том, что полифенольные экстракты растений, включая северные ягоды, содержашие полифенолы – антоцианы, могут в перспективе выступать в качестве альтернативного источника противодиабетических эффектов.

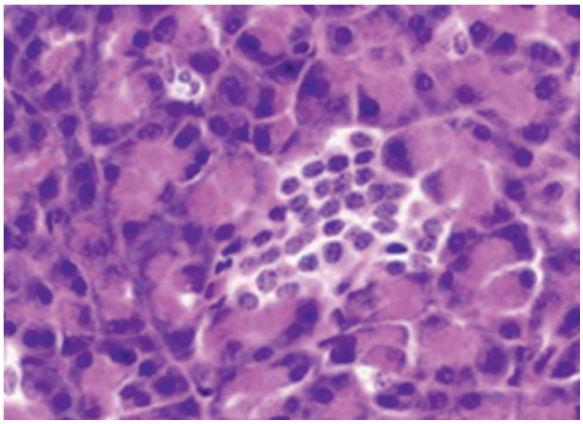


Рисунок 9. Поджелудочная железа (модель диабета, применение экстракта брусники). Повреждение островка Лангерганса, деградация структуры, репаративные процессы выражены слабо, картина сходная с рис 2. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 200.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuo L., Prather E.R., Stetskiv M., et al. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases. From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. Int J Mol Sci. 2019, Sep. 10. Vol.20(18). PII: E4472. DOI: 10.3390/ijms20184472.

2. Jaganjac M., Milkovic L., Gegotek A., Cindric M, Zarkovic K., Skrzydlewska E., Zarkovic N. The relevance of pathophysiological alterations in redox signaling of 4-hydroxynonenal for pharmacological therapies of major stress-associated diseases. Free Radic Biol Med. 2019, Nov. 19. PII: S0891-5849(19)31639-9.

3. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Mel'nikova T.I., Porozov Y.B., Terentiev A.A. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2019, Aug. 14. 3085756. DOI: 10.1155/2019/3085756.

4. Gheibi S., Kashfi K., Ghasemi A. A. Practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin; Biomed Pharmacother; 2017, Nov; 95: 605-613.

5. Mazo V.K., Sidorova Y.S., Zorin S.N., Kochetkova A.A. Streptozotocin induced diabetes rat models; Vopr Pitan; 2016; 85(4):14-21.

6. Stull A.J. Blueberries' Impact on Insulin Resistance and Glucose Intolerance; Antioxidants (Basel); 2016, Nov. 29; 5(4). PII: E44.

7. Roopchand D.E., Kuhn P., Rojo L.E., Lila M.A., Raskin I. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice; Pharmacol Res; 2013, Feb; 68(1):59-67.

8. Kleinert M., Clemmensen C., Hofmann S.M., et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus; Nat Rev Endocrinol; 2018, Mar;14(3):140-162.

9. Bonora E., Moghetti P., Zancanaro C., et al. Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies; J. Clin. Endocrinol. Metab; 1989; 68:374–378.

10. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method; Methods; 2001, Dec; 25(4):402-8.

11. Ito F., Ito H., Suzuki Ch., Yahata T., Ikeda K., Hamaoka K. The Application of a Modified d-ROMs Test for Measurement of Oxidative Stress and Oxidized High-Density Lipoprotein; Int J Mol Sci; 2017, Feb;18(2):454-462.

12. Różańska D., Regulska-Ilow B. Anthocyanins in prevention of type 2 diabetes. Adv Clin Exp Med. 2018; 27(1):135–142.

13. Lutz T.A. Considering our methods: Methodological issues with rodent models of appetite and obesity research; Physiol Behav; 2018, Aug; 1;192:182-187.

14. Ayoub H.M., McDonald M.R., Sullivan J.A., et al. The Effect of Anthocyanin-Rich Purple Vegetable Diets on Metabolic Syndrome in Obese Zucker Rats; J Med Food; 2017, Dec; 20(12):1240-1249.

15. Scazzocchio B., Varì R., Filesi C., et al. Cyanidin-3-O-b-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARγ activity in human omental adipocytes; Diabetes; 2011; 60:2234–2244.

16. Nemes A., Homoki J.R., Kiss R., et al. Effect of Anthocyanin-Rich Tart Cherry Extract on Inflammatory Mediators and Adipokines Involved in Type 2 Diabetes in a High Fat Diet Induced Obesity Mouse Model. Nutrients. 2019, Aug.21; Vol.11(9). PII: E1966. DOI: 10.3390/nu11091966.

17. Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries; Int J Mol Sci; 2015, Oct.16; 16(10):24673-706.

18. Diaconeasa Z., Iuhas C.I., Ayvaz H., et al. Phytochemical Characterization of Commercial Processed Blueberry, Blackberry, Blackcurrant, Cranberry, and Raspberry and Their Antioxidant Activity. Antioxidants (Basel). 2019, Nov.10. Vol. 8(11). PII: E540. DOI: 10.3390/antiox8110540.

19. Kalt W., Cassidy A., Howard L.R., Krikorian R., Stull A.J., Tremblay F., Zamora-Ros R.Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins; Adv Nutr; 2019, Jul.22; PII: nmz065.

20. Salehi B., Ata A., Anil Kumar N., et al. Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components; Biomolecules. 2019, Sep.30. Vol. 9(10). PII: E551. DOI: 10.3390/biom9100551.

Авторы

Кривых Елена Алексеевна

Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия»

Кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой общественного здоровья и здравоохранения

Российская Федерация, 628011, Тюменская область, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, д.40

KrivyhEA@hmgma.ru

Гуляев Александр Евгеньевич

Частное учреждение «National Laboratory Astana» Назарбаев университет

Доктор медицинских наук, профессор, научный консультант РГП «Национальный центр биотехнологии»

Республика Казахстан, 010000, г. Нур-Султан, Кабанбай-батыра, д. 53

akin@mail.ru

Коваленко Людмила Васильевна

Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет»

Доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патофизиологии и общей патологии, директор медицинского института

Российская Федерация, 628412, Тюменская область, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, г. Сургут, ул. Энергетиков, д. 22

medsurdirector@gmail.com

Шульгау Зарина Токтамысовна

«Национальный центр биотехнологии» Республики Казахстан

Кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией токсикологии и фармакологии

Республика Казахстан, 010000, г. Нур-Султан, Кургальжинское шоссе, здание 13/5

shulgau@biocenter.kz

E.A. Krivykh [1], A.E. Gulyaev [2], L.V. Kovalenko [3], Z.T. Shulgau [4]

# ANTIHYPERGLYCEMIC EFFECTS OF THE NORTHERN BERRY EXTRACTS IN THE STREPTOZOTOCIN-INDUCED RAT MODEL OF TYPE II DIABETES MELLITUS

[1] Budgetary institution of higher education of Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug-Ugra «Khanty-Mansiysk state medical Academy», Khanty-Mansiysk, Russian Federation;
[2] Private institution «National Laboratory Astana» Nazarbayev University, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan;
[3] Budgetary institution of higher education of Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug-Yugra «Surgut state University», Surgut, Russian Federation;
[4] Republican state enterprise «National center of biotechnology», Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

**Abstract**. ***The purpose of this study*** was to study the potential therapeutic properties of water-alcohol extracts of bilberry, blueberries, cowberries, cranberries, on the model of experimental streptozotocin diabetes mellitus. ***Research material and methods***. Wild bilberry, cowberries, cranberries and blueberries collected in the summer and autumn of 2018 in the Surgut district of the Khanty-Mansiysk district of the Tyumen region of the Russian Federation were used to obtain polyphenolic water-alcohol extracts of Northern berries. The extracts were concentrated in a vacuum evaporator to the level of polyphenols in 10 mg / ml. the Rats were injected with polyphenol extracts at the rate of 10 mg / kg (the input volume of 0.2-0.3 ml). Results. The concentration of polyphenols in the samples was studied using a commercial set for determining the concentration of polyphenols «Polyphenols folin-ciocalteu (ENOLOGY line by BioSytems. Spain)», in accordance with the instructions of the reagent manufacturer. The results were expressed in the equivalent of Gallic acid, i.e. mg of Gallic acid/ml of berry extract (mgGAE /ml). ***Conclusion***. A model of type II diabetes mellitus obtained in rats with streptozotocin was used to study the effect of extracts of wild bilberry, cowberries, cranberries and blueberries in North-Western Siberia on the level of glycemia and insulin resistance, lipid metabolism, the level of expression of CRP, IL-6 and TNF-α in the liver and adipose tissue of rats, and histopathological changes in pancreatic tissue were also established. Determined that extracts of bilberry, cowberries, cranberries and blueberry on the model of diabetes reduces the severity of insulin resistance such as Metformin, lower blood glucose levels (except lingonberry extract), reduce the concentration of triglycerides (except cowberries extract), reduces the concentration of LDL (except cranberries and cowberries). The use of blueberry extract on the background of diabetes reduces the expression of inflammatory cytokine genes IL-6, TNF-α and CRP. At the same time, extracts of Northern berries in the blood plasma prevent excessive release of free radicals and increase antioxidant activity. Pathomorphological studies of pancreatic tissue document a lower degree of damage to the Langerhans islets against the background of the introduction of Northern berry extracts.

**Keywords**: diabetes model, streptozotocin, extracts of a cranberry, cowberry, bilberry, blueberry, glycemia, insulin resistance, triglycerides, LDL oxidative status, pancreas tissue histology

There is no conflict of interest.
Contact details of the corresponding author:
Elena A. Krivykh
KrivyhEA@hmgma.ru
Received 04.03.2020r
For citation:
Krivykh E.A., Gulyaev A.E., Kovalenko L.V., Shulgau Z.T. Antihyperglycemic effects of the northern berry extracts in the streptozotocin-induced rat model of type II diabetes mellitus. URL: http://vestnikural.ru/article/1138 [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 3, pp. 193–205. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-3-193-205 (In Russ)

REFERENCES

1. Zuo L., Prather E.R., Stetskiv M., et al. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases. From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. Int J Mol Sci. 2019, Sep. 10. Vol.20(18). PII: E4472. DOI: 10.3390/ijms20184472.

2. Jaganjac M., Milkovic L., Gegotek A., Cindric M, Zarkovic K., Skrzydlewska E., Zarkovic N. The relevance of pathophysiological alterations in redox signaling of 4-hydroxynonenal for pharmacological therapies of major stress-associated diseases. Free Radic Biol Med. 2019, Nov. 19. PII: S0891-5849(19)31639-9.

3. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Mel'nikova T.I., Porozov Y.B., Terentiev A.A. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2019, Aug. 14. 3085756. DOI: 10.1155/2019/3085756.

4. Gheibi S., Kashfi K., Ghasemi A. A. Practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin; Biomed Pharmacother; 2017, Nov; 95: 605-613.

5. Mazo V.K., Sidorova Y.S., Zorin S.N., Kochetkova A.A. Streptozotocin induced diabetes rat models; Vopr Pitan; 2016; 85(4):14-21.

6. Stull A.J. Blueberries' Impact on Insulin Resistance and Glucose Intolerance; Antioxidants (Basel); 2016, Nov. 29; 5(4). PII: E44.

7. Roopchand D.E., Kuhn P., Rojo L.E., Lila M.A., Raskin I. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice; Pharmacol Res; 2013, Feb; 68(1):59-67.

8. Kleinert M., Clemmensen C., Hofmann S.M., et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus; Nat Rev Endocrinol; 2018, Mar;14(3):140-162.

9. Bonora E., Moghetti P., Zancanaro C., et al. Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies; J. Clin. Endocrinol. Metab; 1989; 68:374–378.

10. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method; Methods; 2001, Dec; 25(4):402-8.

11. Ito F., Ito H., Suzuki Ch., Yahata T., Ikeda K., Hamaoka K. The Application of a Modified d-ROMs Test for Measurement of Oxidative Stress and Oxidized High-Density Lipoprotein; Int J Mol Sci; 2017, Feb;18(2):454-462.

12. Różańska D., Regulska-Ilow B. Anthocyanins in prevention of type 2 diabetes. Adv Clin Exp Med. 2018; 27(1):135–142.

13. Lutz T.A. Considering our methods: Methodological issues with rodent models of appetite and obesity research; Physiol Behav; 2018, Aug; 1;192:182-187.

14. Ayoub H.M., McDonald M.R., Sullivan J.A., et al. The Effect of Anthocyanin-Rich Purple Vegetable Diets on Metabolic Syndrome in Obese Zucker Rats; J Med Food; 2017, Dec; 20(12):1240-1249.

15. Scazzocchio B., Varì R., Filesi C., et al. Cyanidin-3-O-b-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARγ activity in human omental adipocytes; Diabetes; 2011; 60:2234–2244.

16. Nemes A., Homoki J.R., Kiss R., et al. Effect of Anthocyanin-Rich Tart Cherry Extract on Inflammatory Mediators and Adipokines Involved in Type 2 Diabetes in a High Fat Diet Induced Obesity Mouse Model. Nutrients. 2019, Aug.21; Vol.11(9). PII: E1966. DOI: 10.3390/nu11091966.

17. Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries; Int J Mol Sci; 2015, Oct.16; 16(10):24673-706.

18. Diaconeasa Z., Iuhas C.I., Ayvaz H., et al. Phytochemical Characterization of Commercial Processed Blueberry, Blackberry, Blackcurrant, Cranberry, and Raspberry and Their Antioxidant Activity. Antioxidants (Basel). 2019, Nov.10. Vol. 8(11). PII: E540. DOI: 10.3390/antiox8110540.

19. Kalt W., Cassidy A., Howard L.R., Krikorian R., Stull A.J., Tremblay F., Zamora-Ros R.Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins; Adv Nutr; 2019, Jul.22; PII: nmz065.

20. Salehi B., Ata A., Anil Kumar N., et al. Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components; Biomolecules. 2019, Sep.30. Vol. 9(10). PII: E551. DOI: 10.3390/biom9100551.

Authors

Elena A. Krivykh

Budgetary institution of higher education of Khanty-Mansi Autonomous Okrug-Yugra «Khanty-Mansi state medical Academy»

Candidate of medical Sciences, associate Professor, head of the Department of public health and healthcare

Russian Federation, 628011, Tyumenskaya oblast', Khanty-Mansiyskii avtonomnyi okrug – Yugra, g. Khanty-

Mansiisk, ul. Mira, d.40,
KrivyhEA@hmgma.ru

Aleksandr E. Gulyaev
Private institution «National Laboratory Astana» Nazarbayev University
Doctor of medical Sciences, Professor, scientific consultant of RSE « national center of biotechnology»
Republic of Kazakhstan, 010000, Nur-Sultan, Kabanbaj-batyra, d. 5
akin@mail.ru

Lyudmila V. Kovalenko
Budgetary institution of higher education of Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug-Yugra «Surgut state University»
Doctor of medical Sciences, Professor, head of the Department of pathophysiology and General pathology, Director of the medical Institute
Russian Federation, 628412, Tyumenskaya oblast', Khanty-Mansiyskii avtonomnyi okrug – Yugra, g. Surgut, ul. Energetikov, d. 22
medsurdirector@gmail.com

Zarina T. Shulgau
«National center of biotechnologies» of the Republic of Kazakhstan
Candidate of medical Sciences, head of the laboratory of toxicology and pharmacology
Republic of Kazakhstan, 010000, Nur-Sultan, Kurgal'zhinskoe shosse, 13/5
shulgau@biocenter.kz