

# ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

## ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ПАНЦИРЯ МОРСКИХ ЕЖЕЙ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ И ПАРАМЕТРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА

М. А. Ковалева, С. А. Иванова, М. Н. Макарова, О. Н. Пожарицкая,  
А. Н. Шиков, В. Г. Макаров<sup>1</sup>

В экспериментальных исследованиях, проведенных на мышах, впервые установлено, что комплекс полигидроксинафтохиноновых пигментов и минералов из панциря морских ежей способствует снижению концентрации глюкозы в крови, стимулирует синтез фосфолипидов печени и проявляет антиоксидантные свойства на модели стрептозотоцинового диабета в дозе 1,8 мг/кг при внутрибрюшинном введении в течение 10 суток.

**Ключевые слова:** комплекс полигидроксинафтохиноновых пигментов и минералов, диабет, экспериментальная фармакология

### ВВЕДЕНИЕ

В последние 3 десятилетия наблюдается значительный рост заболеваемости сахарным диабетом (СД) в большинстве экономически развитых стран [7]. Распространенность СД занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. По данным ведущих экспертов ВОЗ, к 2025 г. количество больных СД на земном шаре достигнет 300 млн. человек. Доминирующим является СД II типа, доля которого среди всех форм диабета составляет 85 – 90 %. Уровень распространенности СД II типа в настоящее время характеризуется как эпидемия, в значительной степени связанная с социально-экономическими изменениями [3].

В настоящее время целевыми задачами терапии СД являются достижение стабильной компенсации, предотвращение развития осложнений и поиск способов профилактики. В последние десятилетия доказано, что применение антиоксидантов (токоферола ацетат, таурин,  $\alpha$ -липоевая кислота и др.) приводит к улучшению метаболического контроля, показателей гликемии и способствует снижению прогрессирования осложнений сахарного диабета [1]. Многочисленными исследованиями при СД и, в частности, при СД II типа, показано, что помимо дефицита антиоксидантов, в различной степени выраженности имеется недостаточность микроэлементов (цинк, железо, медь, хром, марганец и др.) [4]. Актуален дальнейший поиск веществ, проявляющих гипогликемические свойства, регулирующих метаболические процессы и активность системы антиоксидантной защиты. Одной их групп

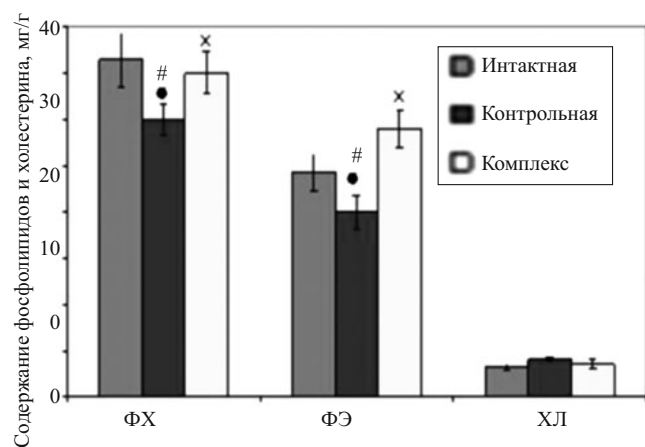
соединений, перспективных в указанном аспекте являются полигидроксинафтохиноновые пигменты (ПГНХ) панцирей и игл морских ежей – спинохромы. В отличие от эндогенных антиоксидантов, таких как витамин Е и убихинон, нафтохиноны способны нейтрализовать действие основных инициаторов ферментативного процесса окисления мембранных липидов — катионов железа, накапливающихся в зоне ишемического повреждения ткани. Такие особенности механизма действия выделяют спинохромы из ряда известных биоантиоксидантов и открывают перспективу для создания на их основе лекарственных препаратов нового поколения.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования являлось изучение антидиабетической активности комплекса полигидроксинафтохиноновых пигментов и минералов из панциря морских ежей (ПГНХМ) на экспериментальной модели сахарного диабета II типа.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 30 белых нелинейных мышах-самцах массой 19 – 22 г (Питомник лабораторных животных РАМН “Рапполово”), которых содержали в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009) и одобрены на заседании биоэтической комиссии С.-Петербургского института фармации.

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт фармации, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47/5.  
E-mail: makarov@ipharm.sp.ru



**Рис. 1.** Содержание фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтанолamina (ФЭ) и холестерина (ХЛ) в печени животных различных групп.

# — различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента); x — различия статистически значимы по сравнению с группой Контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

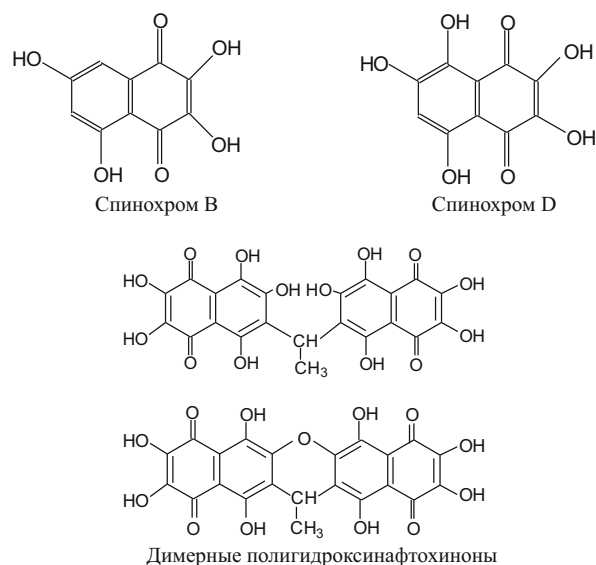
Животные были разделены на 3 группы по 10 в каждой: 1 группа — интактная (животные без моделируемой патологии и без лечения), 2 группа — контроль (животные с моделируемой патологией, без лечения), 3 группа — комплекс (животные с моделируемой патологией и 10 дневным лечением комплексом ПГНХМ, полученных из панциря морского ежа). Препарат вводили внутривентриально в дозе 1,8 мг/кг в виде водного раствора 1 раз в сутки с 11 по 20 день исследования. Комплекс ПГНХМ содержал 0,025 % суммы полигидроксинафтохиноновых пигментов (спектрофотометрически, в пересчете на спинохром В) и минеральную составляющую панциря в форме органических солей, лактатов.

Негенетическую форму экспериментального СД II типа воспроизводили по S. Islam и H. Choi [9] и моделировали стрептозотоцином (“Sigma”, США) (внутрибрюшинно — 60 мг/кг) с предварительным (за 15 мин) введением никотинамида (внутрибрюшинно — 210 мг/кг). Количественное определение глюкозы в крови проводили на 11, 15, 20-е сутки после введения цитотоксина.

**Таблица 1.** Концентрация глюкозы в периферической крови мышей-самцов ( $M \pm m$ , ммоль/л)

Группа	Сутки от начала исследования		
	11-е	15-е	20-е
Интактная	4,7 ± 0,3	4,6 ± 0,4	4,8 ± 0,2
Контроль (диабет + плацебо)	6,9 ± 0,5 <sup>#</sup>	8,5 ± 0,4 <sup>#</sup>	7,7 ± 0,4 <sup>#</sup>
Комплекс (диабет + ПГНХМ)	5,9 ± 0,5 <sup>#</sup>	6,5 ± 0,4 <sup>#x</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>#x</sup>

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы по сравнению: <sup>#</sup> — с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента); <sup>x</sup> — с группой Контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).



**Рис. 2.** Структуры полигидроксинафтохиноновых пигментов комплекса из панцирей морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*.

Уровень глюкозы в крови определяли при помощи глюкометра OneTouch Horizon (“Lifescan”, США). Концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ), ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида — МДА) и уровень стабильных метаболитов оксида азота (СМОА) определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PharmaSpec 1700 (Shimadzu Corporation, Япония) на 20-е сутки эксперимента. Состав липидов печени мышей изучали с применением метода инструментальной тонкослойной хроматографии (ТСХ). Лиофильно-высушенную печень экспериментальных животных экстрагировали реактивом Фолча в соотношении 1/10. По 2 мкл растворов наносили на готовые ТСХ пластины Silicagel 60 F254 (“Merck”, Германия) с использованием полуавтоматического аппликатора Linomat V (“Camag”, Швейцария). Пластины элюировали в системе растворителей хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода (7/2/0,8/0,5) [8]. Окрашивание пластин осуществляли методом погружения в 2 % раствор фосфорномолибденовой кислоты в метиловом спирте на 5 сек с последующим нагреванием пластин при 100 °С в течение 5 мин (TLC Plate Heater III, Camag, Швейцария). Де-

**Таблица 2.** Влияние комплекса полигидроксинафтохиноновых пигментов и минералов из панциря морских ежей на антиоксидантную систему на фоне стрептозотоцинового диабета ( $M \pm m$ )

Группа	Восстановленный глутатион, ммоль/мл	Малоновый диальдегид, мкмоль/л
Интактная	0,60 ± 0,04	11,1 ± 0,4
Контроль (диабет + плацебо)	0,26 ± 0,06 <sup>#</sup>	19,0 ± 1,3 <sup>#</sup>
Комплекс (диабет + ПГНХМ)	0,66 ± 0,05 <sup>x</sup>	9,4 ± 0,6 <sup>#x</sup>

тектирование пластин проводили при 500 нм (TLC Scanner 36, Camag, Швейцария). Рассчитывали содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и холестерина в мг/г ткани методом сравнения с внешним стандартом, используя растворы перечисленных стандартных образцов (все “Sigma-Aldrich”) в метило-вом спирте в концентрации 1 мг/мл (фосфолипиды) и 0,2 мг/мл (холестерин).

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с использованием общепринятых методов параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики при помощи пакета статистических программ Statistica 6.0 (Statsoft, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На модели экспериментального СД II типа у мышей (группы Контроль), спустя 11 дней после моделирования патологии, наблюдали нарушение углеводного обмена и антиоксидантной системы по сравнению с интактной группой. Так, концентрация глюкозы в периферической крови на протяжении всего эксперимента была статистически значимо выше, чем у интактных в среднем на 64 % (табл. 1).

В группе мышей, получавших исследуемый препарат (группа Комплекс), концентрация глюкозы была ниже, чем у животных группы Контроль в среднем на 17,5 %.

Одним из важных факторов нарушений метаболизма при СД является развитие окислительного стресса, что в свою очередь приводит к периферическим сосудистым нарушениям [5] и развитию гипоксических изменений, как общего, так и местного характера. Что в свою очередь приводит к развитию ретинопатии, микроангиопатии, нейродегенеративных изменений. Ранее нами было установлено, что исследуемый комплекс обладает выраженной антирадикальной активностью [10].

На фоне экспериментального стрептозотоцинового диабета в группе Контроль наблюдали уменьшение концентрации ВГ в 2,3 раза и увеличение МДА в 1,7 раза (табл. 2), что свидетельствует о наличии окислительного стресса у животных.

Выраженность изменения вторичных продуктов перекисного окисления липидов — МДА под действием исследуемого препарата на фоне экспериментального СД II типа, относительно стрептозотозин-индуцированных животных снизилась в крови в 2 раза, а уровень ВГ увеличился в 2,5 раза. Таким образом, на фоне 10 дневного применения препарата ПГНХМ происходит нормализация оксидантного статуса, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых отличий концентраций ВГ и МДА от группы интактных животных, причем нормализация данных показателей коррелирует со снижением сахара в крови животных.

Установлено, что комплекс ПГНХМ вызывает увеличение концентрации СМОА почти в 2 раза по отношению к животным группы Контроль: с  $137 \pm$

10 мкмоль/л в группе Контроль до  $267 \pm 22$  мкмоль/л в группе, леченой ПГНХМ ( $p < 0,05$ ). Известно, что оксид азота стимулирует синтез простагландинов за счет активации циклооксигеназ, усиливает антиоксидантную защиту, активируя продукцию глутатиона и супероксиддисмутазы [12]. При СД (вследствие дисфункции эндотелия) образование оксида азота снижается, что облегчает функционирование механизмов, приводящих к ускоренному образованию всех тех структурных изменений в сосудистой стенке, которые характерны для ангиопатий. Окислительный стресс и активирование процессов перекисного окисления липидов сопровождается ингибированием синтеза эндотелиального оксида азота. Ликвидация окислительного стресса у больных СД и применение антиоксидантов сопровождается повышением уровня оксида азота в сыворотке крови, снижением степени выраженности клинических симптомов, обусловленных дисфункцией эндотелия.

Изменение содержания индивидуальных фосфолипидов и холестерина в ткани печени экспериментальных животных представлено на рис. 1.

Из данных представленных на рис. 1 видно, что на фоне применения исследуемого комплекса ПГНХМ отмечено увеличение количества фосфолипидов в ткани печени.

Вещества морского происхождения часто оказывают больший эффект, чем вещества из растений и животных суши, поскольку морские организмы, существуя в жесткой и агрессивной морской среде, вынуждены продуцировать вещества с огромным спектром биологической активности [6].

В основе получения комплекса полигидроксинафтохиноновых пигментов лежит технология переработки морских биоресурсов, а именно — панцирей зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*. Панцирь морских ежей осуществляет механическую барьерную и защитные функции: антимикробную, противовоспалительную, иммунную и антиоксидантную.

Панцирь представляет известковое образование. Различную окраску панцирю придают пигменты — полигидроксинафтохиноны (ПГНХ). Установлено, что полигидроксинафтохиноновые соединения панцирей морских ежей являются сильными антиоксидантами [11].

Долгое время ПГНХ, которые являются минорными соединениями, были приоритетным объектом изучения панцирей морских ежей. Их антиоксидантные свойства изучены на моделях иницированного окисления алкилбензолов, термического автоокисления метиллинолеата, окисления минеральных и растительных масел. Наиболее ярко антиоксидантное действие ПГНХ проявляют в модели железо-аскорбат индуцированного окисления липосом из яичного фосфатидилхолина, где антиоксидантное действие ПГНХ намного превосходит действие фенольных антиоксидантов, таких как ионол и альфа-токоферол [2].

В составе панциря морских ежей ПГНХ находятся в форме хелатных кальциевых и магниевых комплексов. Мы предполагаем, что защитные фармакологические функции панциря обуславливают не столько ПГНХ в чистом виде, сколько нативные соединения их с ионами металлов. Известно, что соли кальция ПГНХ так же обладают фармакологической (противовоспалительной и противоаллергической) активностью и мембраностабилизирующим действием.

Методами тонкослойной и высокоэффективной хроматографии с *micro*TOF-Q масс-спектрометрией установлено, что полигидроксинафтохиноновые пигменты комплекса представлены тетра- и пентагидроксинафтохинонами — спинохромами В и D, а так же бинафтохинонами – димерными полигидроксинафтохиноновыми соединениями [13]. Структуры пигментов представлены на рис. 2. Методом атомной абсорбционной спектроскопии установлено превалирующее содержание ионов кальция и магния в комплексе.

Препарат из панцирей морских ежей, представляющий собой комплекс полигидроксинафтохиноновых пигментов и минералов, продемонстрировал антидиабетическое, гипогликемическое действие на экспериментальной модели СД II типа.

Одним из механизмов антидиабетической активности комплекса полигидроксинафтохиноновых пигментов, полученных из панциря морских ежей, являются их антиоксидантные свойства.

## ВЫВОДЫ

1. Комплекс полигидроксинафтохиноновых пигментов и минералов из панциря морских ежей оказывает

сахароснижающее (стабилизирующее), антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие на модели стрептозотоцинового сахарного диабета II типа у мышей.

2. Одним из механизмов действия комплекса является наличие антиоксидантных свойств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. И. Балаболкин, *Сахарный диабет*, № 4, 8 – 16 (2002).
2. А. В. Лебедев, Л. В. Богуславская, Д. О. Левицкий, О. Б. Максимов, *Биохимия*, № 53, 598 – 603 (1988).
3. Н. С. Шишкина, Ю. И. Сунцов, Л. Л. Болотская и др., *Сахарный диабет*, № 2, 7 – 8 (2005).
4. J. W. Bayens, S. R. Thorpe, *Oxidative stress in diabetes. In Antioxidants in Diabetes Management L. Packer (eds). M. Dekker, New York (2000).*
5. P. J. Beisswenger, K. S. Drummond, R. G. Nelson, et al., *Diabetes*, **54**, 3274 – 3281 (2005).
6. D. S. Bhakuni, D. S. Rawat, *Bioactive marine natural products*, Anamaya Publishers, New Delhi (2005).
7. M. W. Ealovega, B. P. Tabaei, M. Brandle, et al., *Diabetes Care*, **27**(1), 9 – 12 (2004).
8. S. Essig, K. A. Kovar, *J. AOAC Int.*, **84**(4), 1283 – 1286 (2001).
9. S. Islam, H. Choi, *Pharmacology*, **79**, 243 – 249 (2007).
10. S. A. Ivanova, O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, V. G. Makarov, *Proceedings of International Symposium HPTLC*, Basel (2011), 68.
11. R. Kuwahara, H. Hatate, T. Yuki, et al., *LWT — Food Sci. Technol.*, **42**, 1296 – 1300 (2009).
12. S. Moncada, *Verk Kon. Acad. Genelsk Belg.*, **62**(3), 171 – 179 (2000).
13. A. N. Shikov, V. I. Ossipov, O. Martiskainen, et al., *J. Chrom. A.*, **1218**, 9111 – 9114 (2011).

Поступила 07.11.12

## EFFECT OF A COMPLEX PREPARATION OF SEA URCHIN SHELLS ON BLOOD GLUCOSE LEVEL AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN TYPE II DIABETES MODEL

M. A. Kovaleva, S. A. Ivanova, M. N. Makarova, O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, and V. G. Makarov\*

St. Petersburg State Medical Academy, Piskarevskii prosp. 47/5, St. Petersburg, 195067, Russia

\* e-mail: makarov@ipharm.sp.ru

The experimental preclinical study on mice showed that a complex of polyhydroxylated naphthoquinone pigments and minerals from shells of sea urchins decreases the concentration of glucose, stimulates the synthesis of phospholipids in liver, and has antioxidant properties. On the model of streptozotocin-nicotinamide-induced type II diabetes, this complex of polyhydroxylated naphthoquinone pigments and minerals from sea urchin shells exhibited activity after administration for 10 days in a dose of 1.8 mg/kg.

**Keywords:** complex of polyhydroxylated naphthoquinone pigments and minerals from shells of sea urchins; type II diabetes model; experimental pharmacology