Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА**

 **«ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ**

**ім. В.Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

**ШУМЕЙКО ОЛЕКСІЙ ГРИГОРОВИЧ**

**УДК 616.379-008.64:594.124:57.085**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЕКСТРАКТУ З МІДІЇ ЧОРНОМОРСЬКОЇ *(Mytilus galloprovincialis Lam.)***

**У КОМПЛЕКСНІЙ ТЕРАПІЇ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

14.01.14 - ендокринологія

**Автореферат**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата медичних наук**

Харків - 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Державній установі «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського Академії медичних наук України»

**Науковий керівник**  доктор медичних наук, професор **Полторак Вікторія Віталіївна,** Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського Академії медичних наук України», завідувачка відділу експериментальної ендокринології

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Бобирьова Людмила Єгорівна,** ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія МОЗ України», завідувачка кафедри ендокринології з лікувальною фізкультурою та спортивною медициною

доктор медичних наук, професор **Кравчун Нонна Олександрівна,** Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського Академії медичних наук України», завідувачка відділення фармакотерапії ендокринних захворювань

Захист відбудеться « 03 » грудня 2009 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.564.01 при Державній установі «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського Академії медичних наук України» (61002, м. Харків, вул. Артема,10).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського Академії медичних наук України» (61002, м. Харків, вул. Артема,10.)

Автореферат розісланий « 02 » листопада 2009 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

к.мед.н. Т.М.Тихонова

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

 **Актуальність теми.** Цукровий діабет 2 типу – хронічне метаболічне захворювання, підґрунтям якого є ІР (інсулінорезистентність) печінки та периферичних тканин і функціональна недостатність β-клітин підшлункової залози відносно синтезу та секреції інсуліну, що реалізується у збільшення концентрації глюкози в крові, ліпідний дисбаланс і поступовий розвиток судинних ускладнень (Kahn C.R. et al., 2006; American Association of Clinical Endocrinologists, **2007**). В Україні на початок 2008 року на обліку було 1 138 120 хворих на цукровий діабет, з них 86-90 % – ЦД (цукровий діабет) 2 типу (Тронько М.Д., Чернобров А.Д., 2008).

Незалежно від конкретної причини загибелі β-клітин за умов ЦД обох типів (1 тип – цитотоксичність аутоімунного ґенеза, 2 тип – глюко- і ліпотоксичність (Cnop M. et al., 2005)), реалізуючим механізмом, що призводить до прогресуючого зниження маси інсулін-продукуючих клітин, є активація апоптозу на тлі збільшення генерації АМО (активні метаболіти оксисену) (Pearl-Yafe M. et al., 2007). Клінічні й експериментальні дані засвідчують важливу роль оксидативного стресу у розвитку ЦД 2 типу і його ускладнень (Evans J.L. et al., 2002; Haidara M.A. et al., 2006; [Robertson R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Robertson%20R%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus). et al., 2007). Так, показано активацію продукції АМО, насамперед пов'язану з особливостями роботи мітохондрій, у різних тканинах при діабеті (Duchen M.R., 2004; Raza H. et al., 2004; Fariss M.W. et al., 2005; Yu T., Robotham J.L., Yoon Y., 2006; Lopes J.P. et al., 2008.). Відомо, що вільнорадикальне ушкодження біополімерів здатне призводити до утворення імуногенних форм білків, мутацій у ДНК і посилення аутоімунних процесів (Maassen J.A. et al., 2004; Corvera S. -Y. et al., 2006; Maechler P. et al., 2006), а пошкодження біомембран ускладнює гормон-рецепторну взаємодію на рівні клітин-мішеней інсуліну, посилюючи інсулінорезистентність (Pessler D. et al., 2001). Крім того доведено, що за участі АМО відбувається руйнування внутрішньої мітохондріальної мембрани, вихід з неї цитохрому С, фрагментація мітохондрій та індукція апоптозу (Green D.R. et al., 2004; Yi M. et al., 2005; Aliron E. et al., 2006; [Lee S.C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Lee%20SC%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus). et al., 2007). Тому особливу увагу натепер приділяють пошуку таких фармакологічних засобів різної природи, що здатні знижувати продукцію АМО саме у мітохондріях (Fontana M. et al., 2001; Moosmann B. et al., 2002; Chew G.T. et al., 2004; Green K. et al., 2004; Zhao K. et al., 2004; Szeto H.H., 2006). Серед підходів до лікування діабету є і такий, що пов'язаний з фізіологічною здатністю деяких амінокислот підвищувати секрецію інсуліну β-клітинами, причому один з молекулярних механізмів цього ефекту також базується на поліпшенні стану мітохондрій (Li C. et al., 2004; Meijer A.J. et al., 2004; Newsholme P. et al., 2005). У зв'язку з вищевикладеним, першорядне завдання при терапії ЦД ­– подолання гіперглікемії – необхідно вирішувати в комплексі з ефективним ослабленням оксидативного стресу, насамперед, за рахунок посилення антиоксидантного статусу за допомогою сучасних засобів, а також поліпшення енергетичного забезпечення підшлункової залози та печінки, що, у свою чергу зменшує прояви інсулінорезистентності гепатоцитів.

Велику кількість світових і вітчизняних досліджень присвячено розробці нових способів лікування ЦД за урахуванням його патогенетичних механізмів (Finegood D.T. et al., 2001; Chiassom J.L., 2005; Sturmvoll M., 2005; Горбенко Н.І. та співавт., 2005; Полторак В.В. та співавт., 2005; Leiter L. A., 2006; [Massi-Benedetti M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Massi-Benedetti%20M%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus)., 2008). Можливість збільшення ендокринної пластичності підшлункової залози, тобто здатності органа адаптувати масу β-клітин до потреби в інсуліні за рахунок зниження їх ушкоджень та/або відновлення функціональної маси стає головною метою терапії ЦД і являє собою нову стратегію лікування (Wajchenberg [B. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Wajchenberg%20BL%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus)., 2007; Meier J.J., 2008). Для досягнення цієї мети необхідно штучне формування в організмі пулу субстратів – амінокислот, ненасичених жирних кислот – для відновлення клітинних структур, що метаболічно ускладнено через порушення пластичного обміну за умов ЦД (Зайчик А.Ш. та співавт., 2001). Таким чином, сучасні способи фармакологічної корекції ЦД повинні ґрунтуватися на комплексному подоланні порушень метаболізму.

Незважаючи на широкий спектр антидіабетичних засобів, абсолютної компенсації хворих на ЦД 2 типу не досягається – відносно повний метаболічний контроль відзначено тільки у 16 % пацієнтів, що отримували антидіабетичну терапію (NHANES III, 2007). На цей час метформін вважають препаратом першого вибору для лікування ЦД 2 типу. Разом з тим, призначення цього лікарського засобу обмежено для хворих на ЦД 2 типу із супутніми захворюваннями печінки та гіпоксичними станами (наприклад, ішемія міокарда) (Karunakaran S. et al., 1997; Carvalho C. et al., 2007), що потребує розробки удосконаленої тактики застосування метформіну шляхом зниження його несприятливих побічних ефектів за рахунок доповнення нетоксичним, ефективним за умов ЦД 2 типу засобом, переважно природного походження. У зв’язку з вищевикладеним, увагу привернув екстракт із мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.).* Переваги даного екстракту над природними препаратами, які використовуються для терапії ЦД і мають аналогічні, у тому числі, антиоксидантні та цукрознижуючі ефекти, полягають у тому, що він поєднує в собі позитивні якості, властиві різним препаратам (Бітютська О.Є. та співавт., 2003; Овсяннікова Т.М. та співавт., 2004; Poltorack V. et al., 2007). Це – антиоксидантна дія, відсутність токсичності, цукрознижуючий та виразний гепатопротекторний ефекти, наявність у складі біологічно активних поліненасичених жирних кислот, повного набору амінокислот, включаючи незамінні, що є збалансованою сумішшю субстратів для синтезу клітинних структур (наприклад, біомембран), пептидів і білків, у тому числі, антиоксидантних ферментів і низькомолекулярних антиоксидантів типу глутатіону та убіхінону. Все це дозволяє припустити, що екстракт буде ефективним для терапії ЦД у плані зменшення проявів інсулінової недостатності та інсулінорезистентності, як і асоційованих з ними метаболічних порушень.

Таким чином, актуальність розв'язуваної проблеми складається з необхідності патогенетичного обґрунтування розробки нових лікарських засобів з комплексними властивостями, які сприяють максимально тривалому збереженню функції інсулін-продукуючого апарата підшлункової залози, підвищенню ефективності відновлення порушених за умов ЦД ланок метаболізму в інших тканинах, а також оптимізують терапевтичний ефект традиційних антидіабетичних препаратів.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України» і є фрагментом теми «Пошук біологічно активних речовин, що впливають на основні патогенетичні ланки цукрового діабету, серед сполук з гуанідиновим та тіазолідиновим фрагментами» (№ держреєстрації 0107U000424).

**Мета і завдання дослідження**. Мета роботи – експериментально обґрунтувати доцільність застосування екстракту з мідії чорноморської для зменшення метаболічних і структурно-функціональних проявів інсулінової недостатності та інсулінорезистентності.

Для досягнення зазначеної мети в роботі поставлено низку таких завдань:

1. Вивчити вплив екстракту з мідії чорноморської на показники глікемічного контролю, про/антиоксидантний баланс підшлункової залози, печінки та крові лабораторних тварин з експериментально індукованими моделями абсолютної та відносної інсулінової недостатності на тлі первинної та/або вторинної інсулінорезистентності.

2. Провести дослідження біоенергетичних властивостей (дихальної активності) мітохондрій печінки та гомогенатів підшлункової залози щурів з експериментально індукованою інсуліновою недостатністю, а також дії на ці показники застосування екстракту з мідії чорноморської.

3. Визначити вплив довготривалого вживання екстракту з мідії чорноморської на інтенсивність апоптозу у клітинах печінки та підшлункової залози кролів з дитизоновим діабетом.

4. Охарактеризувати гістоструктуру підшлункової залози (панкреатичних острівців і екзокриноцитів) у щурів з експериментально індукованою моделлю цукрового діабету 2 типу (відносна інсулінова недостатність з первинною та вторинною інсулінорезистентністю) за умов використання екстракту з мідії чорноморської.

5. Дослідити ефект екстракту з мідії чорноморської на стабільність мембрани еритроцитів та її фізико-хімічні властивості у тварин з експериментально індукованою відносною та абсолютної інсуліновою недостатністю.

6. Обґрунтувати доцільність сполученого використання екстракту з мідії чорноморської з метформіном на експериментально індукованій моделі цукрового діабету 2 типу у щурів з метою досягнення адитивного терапевтичного ефекту.

*Об’єкт дослідження -* корекція метаболічних порушень за умов інсулінової недостатності та інсулінорезистентності.

*Предмет дослідження* **-** про/антиоксидантний баланс, біоенергетичні процеси, вуглеводний та ліпідний обмін у тварин, структурно-функціональний стан еритроцитів, апоптоз клітин печінки та підшлункової залози, морфо-функціональний стан інсулін-продукуючого апарату підшлункової залози у тварин з інсуліновою недостатністю та інсулінорезистентністю за умов використання екстракту з мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.).*

*Методи дослідження***:** фізіологічні, біохімічні, біофізичні, молекулярно-біологічні, гістологічні, морфометричні, полярографічні та статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше визначено комплексне корегування за допомогою використання екстракту з мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* метаболічних ланок, які порушені за умов експериментального створення абсолютної і відносної інсулінової недостатності та інсулінорезистентності.

Визначено цукрознижуючі та антиоксидантні властивості екстракту з мідії чорноморської за умов різних режимів терапії.

Встановлено ефективність застосування екстракту з мідії чорноморської з метою підвищення чутливості до інсуліну та ослаблення інших метаболічних проявів інсулінорезистетності.

Продемонстровано поліпшення гістоструктури підшлункової залози (панкреатичних острівців і екзокриноцитів) у щурів з експериментально індукованою інсуліновою недостатністю та інсулінорезистентністю за умов використання екстракту з мідії чорноморської.

Патогенетично обґрунтовано доцільність використання екстракту з мідії чорноморськоїдля метаболічного захисту підшлункової залози та печінки від пошкоджень діабетогенними хімічними чинниками та підвищення загальної виживаності їх клітин.

На експериментально індукованих моделях інсулінової недостатності обґрунтована доцільність сполученого застосування екстракту з мідії чорноморської з метформіном з метою досягнення адитивного терапевтичного впливу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати експериментального дослідження щодо перспективності застосування екстракту з мідії чорноморської для зменшення проявів відносної і абсолютної інсулінової недостатності, інсулінорезистентності та компенсації метаболічних процесів, ушкоджених за наявності цукрового діабету, стануть підґрунтям для розробки нових комплексних методів лікування цукрового діабету 1 та 2 типів, спрямованих на збереження функціональної активності панкреатичних β-клітин та гепатоцитів. Оформлюється патент на нові біологічні властивості екстракту з мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.).*

**Особистий внесок здобувача.** Автором проведені патентно-інформаційні дослідження по заданій темі, узагальнені дані літератури. Під керівництвом д.мед.н., проф. В.В. Полторак були визначені мета та завдання роботи, сплановані експериментальні дослідження, інтерпретовані отримані результати та зроблені остаточні висновки. Відтворення експериментальних моделей ЦД та оцінку глюкозного гомеостазу проведено разом із к.мед.н., с.н.с. О. І. Гладких. Автор безпосередньо брав участь у визначенні біоенергетичних властивостей мітохондрій печінки та гомогенатів підшлункової залози щурів, дослідженні гістоструктури підшлункової залози, про/антиоксидантного балансу підшлункової залози, печінки та крові щурів та кролів. Автором виконаний первинний аналіз результатів і зроблені попередні висновки. Автором самостійно були узагальнені результати досліджень, сформульовані основні теоретичні й практичні положення, проведено оформлення їх у вигляді дисертаційної роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати та положення дисертаційної роботи були повідомлені та обговорені на 5-й та 6-й Міжнародних конференціях «Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Antioxidants and Human Health» (Смоленськ, Росія, 2007; 2009), 43-му конгресі Європейської асоціації з вивчення цукрового діабету (Амстердам, Нідерланди, 2007), Сьомих Данилевських читаннях «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Харків, 2008), ІІІ Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2008), Міжнародному міждисциплінарному симпозіумі «Від експериментальної біології до превентивної та інтегральної медицини» (Судак, 2008), І Міжнародній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2009).

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 11 наукових праць, у тому числі у фахових медичних виданнях, затверджених ВАК України – 4 (1 - самостійна), у матеріалах з'їздів та конференцій – 7.

**Структура та обсяг дисертації.** Робота викладена на 153 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, огляду літератури, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку літератури, що містить 225 джерел та займає 24 сторінки. Робота ілюстрована 29 таблицею та 18 рисунками.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали та методи дослідження.** У роботі було використано 320 статевозрілих самців щурів лінії Вістар та 18 кролів породи Шиншила з віварію ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України», а також 60 статевозрілих самиць щурів лінії Вістар із віварію Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

Тварин утримували в стандартних умовах віварію при природному освітленні та харчовому режимі, рекомендованому для даного виду тварин. Дослідження проводилися відповідно до національних „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985).

У роботі досліджували екстракт із мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.)*, що був вироблений у відділі біотехнологічних досліджень Південного НДІ морського рибного господарства та океанографії (м. Керч). Екстракт являє собою в'язку субстанцію шоколадного кольору з характерним смаком і виглядом, є розчинним у воді та органічних розчинниках. За результатами дослідження його гострої токсичності встановлено, що він відноситься до практично нетоксичних речовин (п’ятий клас токсичності) (Устенко Н. В. та співавт., 2008). Експериментальним тваринам екстракт надавали перорально в дозі 400 мг на кг маси тіла (мінімальна доза з максимальним терапевтичним ефектом) (Бітютська О.Є. та співавт., 2003), в якості препарату порівняння використовували метформін у дозі 50 мг на кг маси тіла.

Дослідження антидіабетичних властивостей екстракту із мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* проводили на хімічно-індукованих моделях інсулінової недостатності та інсулінорезистентності різного ґенеза: 1) алоксановий діабет у щурів (абсолютна інсулінова недостатність загального цитотоксичного ґенеза) (Полторак В.В., Горбенко Н. І., 2001); 2) високодозовий стрептозотоциновий діабет у щурів (абсолютна інсулінова недостатність прямого бета-цитотоксичного ґенеза) (Rakieten N. et al., 1969); 3) дитизоновий діабет у кролів (абсолютна інсулінова недостатність прямого бета-цитотоксичного ґенеза) (Okamoto H., 1981); 4) експериментальний ЦД 2 типу у щурів (відносна інсулінова недостатність, сполучена з первинною та вторинною інсуліно-резистентністю) – модель відтворюється фінальним введенням стрептозотоцину на тлі хронічної жирової дієти (Гладких О.І. та співавт., 2009).

Глюкозний гомеостаз у щурів оцінювали за рівнем глікемії (базальної та під час ВЧТТГ (внутрішньочеревний тест толерантності до глюкози)). Кров для аналізу брали з хвостової вени після попереднього 4-годинного голодування, а також через 30, 60 і 120 хв після введення глюкози (3 г/кг маси тіла). Проводили інсуліновий тест (0,2 МОд/кг, взяття крові натще та через 15, 30, 60 та 120 хв після підшкірного введення гормону) (Akinmokun A. et al., 1992). Стан глюкозного гомеостазу кролів з дитизоновим діабетом оцінювали за динамікою базальної глікемії та глікемії під час ВВТТГ (внутрішньовенний тест толерантності до глюкози) (500 мг/кг маси тіла, взяття крові у вихідному стані, через 5, 10, 30 та 60 хв). Площу під глікемічними кривими (ПГК, концентрація-час) при проведенні ВЧТТГ і ВВТТГ та показник сумарної базальної глікемії, розрахований за даними 1, 10, 20 та 30 доби експерименту, обчислювали за допомогою комп'ютерної програми "Mathlab". Вміст глюкози в крові оцінювали глюкозооксидазним методом за допомогою ферментативного аналізатора глюкози «Ексан-Г» (Литва), а також фотоколориметричним методом із використанням наборів реактивів «Глюкоза-ФДК», виробництво ТОВ «Фармацевтика и клиническая диагностика» (Росія).

Оксидативний стрес характеризували за показниками первинних продуктів ПОЛ (перекисне окислення ліпідів) ‑ кон'югатів жирних кислот: ДіК (дієнові), ТК (трієнові), ОДК (оксодієнові), ТЕТ (тетраєнові), вміст яких вимірювали спектрофотометрично (Гаврилова В.Б. та співавт., 1983; Параніч А.В. та співавт., 1990). Рівень вторинних продуктів ПОЛ – МДА (малоновий діальдегід) (Владіміров Ю.А. та співавт., 1975); гідроперекисів ліпідів (Asakawa T., Matsushita S., 1980) – вимірювали фотоколориметрично. Антиоксидантний статус оцінювали за активністю антиоксидантних ферментів: ГПО (глутатіонпероксидаза) (Ланкін В.З. та співав., 1980) та
Г-S-Т (глутатіон-S-трансфераза) (Kraus P., 1980). Усі вищевказані показники вимірювали в гомогенатах печінки, підшлункової залози, у мітохондріях печінки та у крові.

Концентрацію тригліцеридів визначали ферментативним методом за допомогою стандартних наборів фірми «Lahema» (Чеська республіка).

Біоенергетичні показники оцінювали за функціональним станом мітохондрій. Мітохондрії виділяли з гомогенатів печінки щурів методом диференційного центрифугування (Лємешко В.В. та співавт., 1980). Швидкість дихання V3 (фосфорилюючих) та V4 (нефосфорилюючих) мітохондрій реєстрували за допомогою полярографічного методу з використанням закритого електроду Кларка (Сєвєрин С.Є. та співавт., 1980).

Ідентификацію апоптозу клітин печінки та підшлункової залози кролів проводили за допомогою методу електрофорезу ДНК в 2 % агарозному гелі, який заснований на верифікації кінцевого етапу деградації ДНК. На електрофореграмах апоптотична фрагментація ДНК виявляється у вигляді «драбинки» із фрагментів ДНК різної довжини. Некроз клітин обумовлює «розмазаний» характер зони міграції ДНК. Виділення ДНК проводили з використанням набору Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Німеччина). В якості стандарту застосовували маркер O’GeneRulerTM 1kb DNA Ladder (Fermentas, Німеччина). Смуга свічення інтактної ДНК знаходилася в районі старту. Візуалізація та фотографування електрофореграм фрагментованої ДНК проводилася в ультрафіолетовому спектрі з використанням етидіум броміду.

Для вивчення резистентності еритроцитів використовували диференційний метод визначення якісного складу крові за допомогою агрегометра-фотометра Shapemeter-01В. Еритрограми, що були отримані в результаті комп'ютерної обробки даних кінетики кислотного гемолізу еритроцитів, характеризують відсотковий розподіл еритроцитів зразка крові за стійкістю та формою еритроцитів (Rudenko S. V. et al., 1998) за допомогою показника швидкості гемолізу tg α:

tg α = *∆Е* /*∆Т*

де *∆Е –* зміна оптичної густини;

*∆Т* - проміжок часу

та lag-періоду - часу затримки гемолізу з моменту додавання гемолітика, а також - індексу форми еритроцитів (зміна максимальної амплітуди сигналу фотометра, яка відповідає дискоїдній формі, до мінімальної, яка відповідає сферуляції клітини). Тримірні зображення еритроцитів були отримані за допомогою цифрового голографічного інтерференційного мікроскопа (Tishko T. V. et al., 2005).

Статистичний аналіз даних здійснено за допомогою стандартних пакетів програм Ехеl (версія 7) та Віоstat (Гланц С., 1999). Перевірку розподілу даних на відповідність закону Гауса (закон нормального розподілу) проводили, використовуючи середнє арифметичне і стандартне відхилення. Оскільки розподіл дат значущо не відрізнявся від нормального, викорисовували параметричну статистику. Для порівняння незалежних груп використовували класичний критерій *t* Ст'юдента. При порівнянні пов'язаних груп використовували критерій *t* Ст'юдента для залежних груп. За наявності трьох і більшої кількості груп вводили поправку Бонфероні. При порівнянні двох груп з розподілом ознаки, відмінним від нормального (дані щодо апоптозу в печінці та підшлунковій залозі), використовували непараметричний U-критерій Манна-Уітні. Висновок відносно статистичних гіпотез проводили на рівні значущості Р < 0,05 (Атрамєнтова Л.А. та співавт., 2008).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати досліджень на щурах та кролях з експериментальними моделями ЦД довели наявність у екстракту з мідій значущого цукрознижуючого ефекту за умов різних режимів застосування.

Так, тварини з алоксановим діабетом одержували екстракт, починаючи з ранньої стадії розвитку ЦД (на другий день після введення хімічного діабетогенного агента) протягом 10 діб. При цьому на 14 добу експерименту рівень глюкози в сироватці крові щурів з ЦД, які одержували екстракт, був значно нижчим ((8,3±1,8) ммоль/л), ніж у щурів з ЦД, які отримували плацебо (воду) ((22,8±2,5) ммоль/л, Р < 0,01), що свідчить про виразний протективний/реабілітуючий ефект досліджуваного екстракту відносно деструктивного впливу діабетогенного чинника. Показники базальної глікемії у контрольних щурів внаслідок прийому екстракту не змінювалися (5,0±0,4 та (5,4±0,3) ммоль/л, відповідно).

За умов високодозового стрептозотоцинового діабету щури отримували екстракт після маніфестації ЦД протягом 10 діб. Базальна глікемія у щурів з діабетом, які одержували плацебо, наприкінці експерименту не відрізнялася від вихідної (16,1±1,5 проти (15,4±1,6) ммоль/л), тоді як у діабетичних щурів, які вживали екстракт, вона була достовірно знижена (10,7±0,5 проти (15,5±1,1) ммоль/л, Р < 0,05), хоча й не сягала показників контролю ((4,0±0,2) ммоль/л).

Проблема збереження пластичних властивостей підшлункової залози й інших органів за умов ЦД може бути вирішена не тільки за допомогою нормалізації глікемічного статусу організму, але й за допомогою надання йому засобів відновлення ушкоджених клітинних структур – субстратів білкового та інших синтезів. Слід відзначити, що щури, які входили в експерименти з моделювання діабету, були рандомізовані по масі тіла, але наприкінці дослідження верифіковано розходження за цим показником між двома діабетичними групами. Маса тіла щурів із алоксановим та стрептозотоциновим діабетом, які не отримували екстракт, суттєво не змінилася до кінця досліду, тоді як маса щурів, що отримували на тлі діабету екстракт, збільшилася (Р < 0,03). Подібну зміну маси експериментальних тварин можна пояснити не тільки зменшенням глюкозного дисбалансу, але й позитивним впливом застосованого екстракту на пластичні процеси в організмі за рахунок його складу, багатого на амінокислоти та інші попередники біополімерів.

Під час експерименту на кролях з дитизоновим діабетом (тварини отримували екстракт протягом місяця, починаючи з сьомої доби моделювання ЦД) доведено, що використання досліджуваного екстракту, як і метформіну, протягом 30 діб помірно, але значуще (P < 0,05) знижувало глікемію натще у діабетичних кролів порівняно з показниками групи тварин, які отримували плацебо (рис.). 30-добове вживання досліджуваних засобів призводило також до вірогідного зменшення глюкозної інтолерантності
(P < 0,01), що було доведено протягом ВВТТГ (рис. 1).



**0**

**5**

**10**

**15**

**20**

**25**

**30**

**35**

**0**

**5**

**10**

**30**

**60**

**Час, хв**

**Глюкоза**

**крові,**

**ммоль/л**

**Інтактний контроль**

**Діабет+плацебо**

**Діабет+метформін**

**Діабет+екстракт із**

**мідій**

# **Рис. 1. Динаміка глікемії протягом ВВТТГ у кролів з дитизоновим діабетом за умов перорального введення екстракту із мідій або метформіну протягом 30 діб.**

Слід зазначити, що екстракт із мідій виявився навіть більш ефективним, ніж препарат порівняння, про що свідчать дані глікемії на 5 та 10 хвилину тесту (P < 0,05).

Доцільним було встановити вплив екстракту з мідій, який позитивно зарекомендував себе в експериментах з абсолютною інсуліновою недостатністю, також за умов відносної інсулінової недостатності, зіставивши та поєднавши ефекти з дією метформіну. Проведений експеримент довів, що двотижневе ізольоване застосування досліджуваних засобів (метформін, екстракт із мідій), як і їх комбінації, у щурів на тлі моделі ЦД 2 типу (ожиріння, відносна інсулінова недостатність, первинна та вторинна інсулінорезистентність) призводило за результатами інсулінового тесту до подібного поліпшення чутливості до інсуліну: площа під глікемічною кривою склала, відповідно, 750,3±35,0; 826,9±34,3 та (754,6±24,3) ммоль/л/хв. Вищеозначені показники відрізнялися значуще від показників тварин групи «діабет+плацебо» ((1592,3±28,4 ммоль/л/хв (Р < 0,002)), але не досягали рівня інтактного контролю ((390,6±22,8 ммоль/л/хв (Р < 0,002)).

Верифіковано також зниження (але не до контрольних рівнів) базальної гіперглікемії та підвищення глюкозної толерантності (табл. 1).

Слід зазначити, що максимальний цукрознижуючий ефект у діабетичних тварин був отриманий для комплексу метформін+екстракт із мідій у порівнянні з групами діабет+метформін (Р < 0,005), діабет+екстракт із мідій (Р < 0,005), що може бути наслідком сполучення різноспрямованої дії складових, а саме, зниження ендогенної продукції глюкози печінкою, активації переносників глюкози периферичних тканин, гальмування глюконеогенезу і розпаду глікогену під впливом метформіну (Ashokkumar N. еt. al., 2006), стимуляції секреції інсуліну деякими амінокислотами зі складу екстракту (Newsholme P. et al., 2006) та потенційним загально-відновлюючим впливом екстракту на метаболізм.

*Таблиця 1*

**Площа під глікемічною кривою протягом ВЧТТГ у щурів з цукровим діабетом 2 типу за умов перорального введення**

**екстракту із мідій та метформіну, (±)**

|  |  |
| --- | --- |
| Група,кількість тварин | Площа під глікемічною кривою, ммоль/л/хв |
| Вихідний рівень | Через 14 діб |
| Інтактний контрольn =7 | 588,33±23,81 | 625,44±16,56 |
| Діабет+плацебоn=5 | 1954,0±56,95Р1 < 0,005 | 2092,25±60,48Р1 < 0,005 |
| Діабет+метформинn=6 | 1868,40±44,83Р1 < 0,005 | 1467,96±47,35Р1 < 0,005Р2 < 0,005Р3 < 0,005 |
| Діабет+ екстракт із мідійn=6 | 1942,25±20,29Р1 < 0,005 | 1351,40±35,20Р1 < 0,005Р2 < 0,005Р3 < 0,005 |
| Діабет+метформін +екстракт із мідійn=7 | 1936,50±68,31 Р1 < 0,005 | 1191,85±35,34 Р1 < 0,005Р2 < 0,005Р3 < 0,005 |

Примітки:

1. P1 – значущість змін порівняно з групою "Контроль+плацебо".

2. Р2 – значущість змін порівняно з групою "Діабет+плацебо".

3. Р3 – значущість змін порівняно з вихідним рівнем.

Таким чином, екстракт із мідій, особливо у комплексі з метформіном, показав достеменний цукрознижуючий ефект в експериментах з моделювання абсолютної та відносної інсулінової недостатності різного ґенеза на щурах.

Надмірна інтенсифікація вільнорадикальних процесів є провідною в патогенезі ЦД та його ускладненьт у людини (Green K. еt al., 2004; Van Houten B., Orrenius S., 2005). Причому, одним із джерел АМО є дихальний ланцюг мітохондрій клітин органів з підвищеним темпом метаболізму глюкози за наявності діабету, що запускає замкнуте коло змін, які загрожують клітині апоптозом. У зв'язку з цим, корекція мітохондріальних порушень є актуальним завданням діабетології. В мітохондріях печінки щурів з високодозовим стрептозотоциновим діабетом (абсолютна інсулінова недостатність) показано порушення сполучення процесів дихання та фосфорилювання. Підтвердженням служить зменшення в групі щурів з ЦД такого показника, як коефіцієнт дихального контролю (3,35±0,11 проти 4,68±0,45 у інтактних тварин (Р < 0,05). Десяти-добове надання екстракту з мідій відновлювало вищезазначений функціональний параметр 5,85±0,31, можливо, за рахунок регуляції пластичних процесів у печінці внаслідок надходження додаткових субстратів ззовні.

Дослідження, проведені на щурах з експериментальним ЦД 2 типу, довели, що двотижневе застосування екстракту з мідій та препарату порівняння метформіну призводило до повного відновлення функціональних характеристик мітохондрій печінки, а застосування комплексу цих засобів достовірно підвищувало дихальний контроль мітохондрій у порівнянні з визначеним у інтактних тварин (Р < 0,05) (табл. 2).

*Таблиця 2*

**Вплив екстракту з мідій та метформіну на функціональні показники мітохондрій печінки щурів з цукровим діабетом 2 типу, (±)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Група,кількість тварин | Швидкість дихання(нмоль оксигену на 1 мг білка за 1 хв) | Дихальний контроль (V3/V4) |
| V4 | V3 |
| Інтактний контрольn =7 | 14,96±0,67 | 57,52±4,80 | 3,85±0,24 |
| Діабет+плацебоn =5 | 13,28±4,20 | 30,01±4,47Р1<0,03 | 2,19±0,12Р1<0,03 |
| Діабет+метформинn =6 | 14,81±0,60 | 54,60±2,74Р2<0,05 | 3,70±0,31Р2<0,05 |
| Діабет+екстракт із мідійn =6 | 14,24±0,52 | 76,30±8,31Р2<0,003 | 5,38±0,77Р2<0,003 |
| Діабет+метформін+ екстракт із мідійn =7 | 13,23±0,56 | 73,15±2,27Р1<0,05Р2<0,003 | 5,54±0,36Р1<0,05Р2<0,003 |

Примітки:

1. P1 – значущість змін порівняно з групою "інтактний контроль";

2. Р2 – значущість змін порівняно з групою "діабет+плацебо".

Останнє може засвідчувати кращу стійкість мітохондрій печінки щурів цієї групи до несприятливих чинників.

Дослідження дихальної активності гомогенатів підшлункової залози щурів з експериментальним ЦД 2 типу також показало зрушення спряженості процесів дихання та окисного фосфорилювання, що виявлялося в зниженні коефіцієнта дихального контролю (1,38±0,17 проти 2,01±0,05 у інтактних тварин, Р < 0,05). Застосування екстракту як окремо, так і у комплексі з метформіном, на противагу ізольованому використанню бігуаніду, відновлювало дихальний коефіцієнт (2,03±0,05 та 2,00±0,02, відповідно, проти 1,60±0,10 для метформіну). Останнє обґрунтовує потенційні можливості екстракту із мідій у якості пакреатопротекторного засобу.

Порушення функціонування мітохондрій може бути пусковим чинником оксидативного стресу на рівні печінки та підшлункової залози. Дійсно, були визначені різноспрямовані зміни концентрації продуктів ПОЛ – ДіК, ТК, ОДК та ТЕТ в печінці та підшлунковій залозі при ЦД 2 типу, які нівелювалися застосуванням екстракту із мідій. Так, у печінці діабетичних тварин верифіковано підвищений вміст ДіК, ТК, ОДК та ТЕТ – (7,87±0,49) нмоль/мг білка (Р < 0,02), (4,54±0,20) нмоль/мг білка (Р < 0,02), (6,48±0,63) нмоль/мг білка (Р < 0,01), (0,012±0,0025) Од/мг білка (Р < 0,02) проти (2,71±0,26) нмоль/мг білка, (2,46±0,30) нмоль/мг білка, (3,02±0,031) нмоль/мг білка, (0,006±0,0007) Од/мг білка у контролі, відповідно до переліку. Після застосування екстракту їх концентрація суттєво знижувалась порівняно з визначеною у діабетичних тварин, що отримували плацебо, і склала (5,29±0,41) нмоль/мг білка (Р < 0,05), (2,43±0,16) нмоль/мг білка (Р < 0,05), (2,94±0,17) нмоль/мг білка (Р < 0,002), (0,0068±0,0005) Од/мг білка ( Р <0,02), відповідно, досягаючи (за виключенням ДіК) контрольного рівня.

У підшлунковій залозі за наявності ЦД 2 типу рівень ДіК знижувався ((2,96±0,44) нмоль/мг білка проти контролю – (7,07±0,46) нмоль/мг білка,
Р < 0,002), що поряд із збільшеним рівнем ОДК ((3,99±0,22) нмоль/мг білка проти контролю – (1,97±0,20) нмоль/мг білка, Р < 0,002) та ТЕТ ((0,0078±0,0001) Од/мг білка проти контролю – (0,0043±0,0004) Од/мг білка, Р < 0,002) свідчить про перехід первинних продуктів ПОЛ у вторинні й дозволяє зробити висновок про загальне зменшення вмісту неушкоджених жирних кислот із подвійними зв'язками в мембранах панкреатичних клітин за даних умов. Після застосування екстракту концентрація продуктів ПОЛ змінювалося у напрямку контрольних показників, але досягала їх тільки для ОДК ((2,62±0,23 нмоль/мг білка, Р < 0,05 у порівнянні з діабетом+плацебо). Зменшений за умов діабету рівень ДіК підвищувався ((9,81±0,70) нмоль/мг білка, Р < 0,002), перевершуючи навіть контрольні показники (Р < 0,05), а підвищений за умов діабету рівень ТЕТ знижувався ((0,0066±0,0006) Од/мг білка, Р < 0,05; але не досягав контролю, Р < 0,05).

Відомо, що рівень продуктів ПОЛ обумовлюється такими чинниками, як жирнокислотний склад мембран біооб’єкту, вміст в ньому АМО та стан антиоксидантної системи. У зв'язку з виразною активацією процесів ПОЛ за наявності ЦД антиоксидантний захист організму набуває особливого значення. Його збереження можна досягти введенням компонентів цієї системи або їх попередників ззовні. Основним антиоксидантним ферментом у більшості клітин організму є ГПО (Меньщикова О.Б., 2006). Виявлено зниження цього ферменту в печінці щурів з алоксановим діабетом (209,8±26,2) нмоль НАДФН/хв/ мг білка) проти ((323,6±21,1) нмоль НАДФН/хв/мг білка у інтактних тварин, Р < 0,01), яке повністю відверталося вживанням екстракту з мідій ((309,2±36,2) нмоль НАДФН/хв/мг білка,
 Р < 0,05).

Експериментальний ЦД 2 типу також призводив до зниження активності ГПО поряд з виразним підвищенням Г-S-Т у гепатоцитах щурів (табл. 3).

*Таблиця 3*

**Вплив екстракту з мідій та метформіну**

**на активність антиоксидантних глутатіон-залежних**

**ферментів печінки щурів з цукровим діабетом 2 типу, (±)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Група, кількість тварин | ГПО,нмоль НАДФН/ хв/мг білка | Г-S-Т,нмоль 1-хлор-2,4-динітробензолу/ хв/мг білка |
| Інтактнийконтрольn =7 | 132,30±6,57 | 551,32±177,32 |
| Діабет+плацебоn =5 | 88,50±3,55Р1 < 0,02 | 1278,94±155,76Р1 < 0,02 |
| Діабет+метформинn =6 | 119,60±11,45Р1 < 0,05Р2 < 0,05 | 1052,84±152,74Р1 < 0,05 |
| Діабет+екстрактіз мідійn =6 | 123,73±17,33Р2 < 0,02 | 664,49±110,58Р2 < 0,05 |
| Діабет+метформін+ екстракт із мідійn =7 | 129,9573±8,10Р2 < 0,02 | 1048,10±138,11Р1 < 0,05 |

Примітки:

1. P1 – значущість змін порівняно з групою "інтактний контроль";

2. Р2 – значущість змін порівняно з групою "діабет+плацебо".

Двотижневе вживання метформіну не відновлювало повністю знижену активність одного з провідних антиоксидантних ферментів, а саме – ГПО, що, можливо, пов'язано з властивістю цього препарату окислювати тіолові групи (Liu Z. еt аl., 2008). Застосування екстракту із мідій на тлі діабету відвертало зсуви антиоксидантних показників, індуковані діабетом (до рівня контрольних величин) (див. табл. 3). В той же час, за умов використання комплексу засобів верифіковано достеменне зменшення нормалізуючого впливу екстракту з мідій на активність Г-S-Т, підвищену за умов діабету. Збільшення активності Г-S-Т при застосуванні комплексу засобів при ЦД, швидше за все, було пов'язано з впливом метформіну. Метаболічне перетворення бігуаніду потребує участі цього ферменту в інактивації та виведенні його з печінки.

Відомо, що підшлункова залоза за фізіологічних умов характеризується відносно низьким антиоксидантним захистом порівняно до інших тканин (Tiedge M., et al., 1997). У цьому зв’язку слід акцентувати, що у щурів з ЦД 2 типу спостерігалося виразне падіння (майже удвічі) активності головного захисного ферменту – ГПО ((4,55±0,52) проти (8,03±1,37) нмоль НАДФН/хв/мг білка, Р <  0,02), яке не відверталося повністю метформіном ((6,93±1,05) нмоль НАДФН/хв/мг білка) або екстрактом із мідій ((6,87±0,73) нмоль НАДФН/хв/мг білка) при окремому їх вживанні. В той же час, застосування комплексу речовин відновлювало активність ГПО ((7,54±1,03) нмоль НАДФН/хв/мг білка).

Таким чином, одним з механізмів терапевтичної дії екстракту з мідій за умов експериментально індукованої абсолютної та відносної інсулінової недостатності є відновлення глутатіон-залежної антиоксидантної захищеності клітин підшлункової залози та печінки щурів. Максимальний антиоксидантний захист щодо підшлункової залози визначено за умов комплексного введення екстракту з мідій і метформіну.

Відомо, що мітохондріальна дисфункція та інтенсивний оксидативний стрес здатні активувати апоптоз клітин. Доцільним було визначення впливу екстракту із мідій та препарату порівняння метформіну за умов їх найбільш довготривалого вживання (30 діб) на інтенсивність апоптозу у клітинах печінки та підшлункової залози на моделі дитизонового діабету у кролів. У досліджуваних тварин із діабетом спостерігалася стимуляція апоптозу як у тканині печінки (11,67±1,33 проти (8,50±0,50) ум. од., Р < 0,05), так і у підшлунковій залозі (11,67±0,67 проти (3,50±2,50) ум. од., Р < 0,05). Визначено, що ДНК гепатоцитів у діабетичних кролів, які отримували екстракт, деградована менше (від 2000 до 500 пар нуклеотидів; (8,75±0,25) ум. од., P < 0,045), ніж у тварин, що отримували плацебо (від 700 до 250 пар нуклеотидів), в той час, як метформін не поліпшував цей показник у кролів з діабетом ((11,00±1,15) ум. од.). Подібне за спрямованістю, але більш виразне гальмування апоптозу (до рівня інтактного контролю) спостерігалося у підшлунковій залозі діабетичних тварин за умов використання екстракту із мідій (на противагу метформіну, який не виказував реабілітуючого впливу). Це свідчить про можливість збереження маси панкреатичних β-клітин та клітин печінки за допомогою екстракту з мідій.

Дослідження структурно-функціональних властивостей еритроцитів довело значні зміни у еритроцитарній мембрані за умов різних експериментальних моделей ЦД. Це віддзеркалено в кількісних показниках отриманих еритрограм. Так, при ЦД 2 типу коротшав lag-період гемолізу
(Р < 0,01) та змінювався індекс форми клітин (Р < 0,01), спостерігалась тенденція до посилення швидкості гемолізу (0,05 < Р < 0,1) (табл. 4).

*Таблиця 4*

**Вплив екстракту з мідій та метформіну на структурно-функціональні характеристики еритроцитів щурів з цукровим діабетом 2 типу, (±)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Група, кількість тварин | Швидкість гемолізу(tg α10) | lag–період,сек | Індекс форми еритроцитів,відсоток дискоїдності |
| Інтактнийконтрольn =7 | 2,54±016 | 143,9± 2,85 | 100 |
| Діабет+плацебоn =5 | 3,05±0,25 | 106,51±3,8 | 45 |
| Діабет+екстракт із мідійn =6 | 2,22 | 162,46±1,35 | 88 |
| Діабет+метформинn =6 | 2,6±0,24 | 140,39±1,92 | 77 |
| Діабет+метформін+ екстрактіз мідійn =7 | 1,9±0,30 | 141,13±3,86 | 92 |

Ізольоване введення метформіну відновлювало lag–період до показників інтактного контролю та достеменно підвищувало відсоток нормальних дискоїдних еритроцитів (Р < 0,01), який однак не досягав рівня інтактного контролю (Р < 0,05). Ізольоване застосування екстракту з мідій призводило до зростання відсотка нормальних дискоїдних форм еритроцитів (Р < 0,05) та збільшення lag-періоду їх еритрограм (Р < 0,01) порівняно до інтактного контролю.

Повне співпадіння досліджуваних показників з інтактним контролем визначено у діабетичних тварин за умов сполученного введення комплексу метформіну та екстракту із мідій. Привертає увагу достеменне зменшення у діабетичних тварин за цих умов швидкості гемолізу порівнянно до діабетичного контролю (Р < 0,01).

Подібні сприятливі зсуви щодо швидкості гемолізу, тривалості
lag–періоду та показників дискоїдності верифіковано при використанні екстракту з мідій на моделі абсолютної інсулінової недостатності (кролі з дитизоновим

діабетом). Візуалізація позитивного впливу екстракту з мідій на архітектоніку еритроцитів за умов модельованої абсолютної та відносної інсулінової недостатності досягнута також за допомогою голографічних світлин мазків крові.

Достатня кількість біологічних субстратів (незамінних амінокислот і жирних кислот) для відновлення ушкоджених клітинних структур дозволяє пом'якшити негативний ефект глюко- і ліпотоксичності та захистити не тільки еритрон, але й функціонуючий інсулін-продукуючий апарат. Гістологічний аналіз морфоструктури підшлункової залози щурів з відносною інсуліновою недостатністю з первинною та вторинною інсулінорезистентністю (модель ЦД 2 типу) підтвердив, що у тварин, які отримували екстракт із мідій, як окремо, так і в комплексі з метформіном, морфоструктура екзо- та ендокринної частин підшлункової залози була змінена меншою мірою порівняно з діабетичним контролем (плацебо).

Таким чином, отримані результати обґрунтовують перспективність використання екстракту із мідій в якості компонента комплексної цукрознижуючої та антиоксидантної терапії цукрового діабету за наявності інсулінової недостатності різного генезу та виразності, а також в якості панкреато- та гепатопротекторного засобу.

**ВИСНОВКИ**

У дисертації експериментально обґрунтована доцільність використання екстракту із мідії чорноморської в комплексній терапії цукрового діабету 1 та 2 типів в якості нетоксичного цукрознижуючого, антиоксидантного, панкреато- та гепатопротекторного засобу.

1. Встановлена цукрознижуюча дія екстракту із мідії чорноморської за умов відносної та абсолютної інсулінової недостатності у щурів та кролів при використанні як превентивних, так і реабілітаційних режимів терапії.

2. Застосування екстракту з мідії чорноморської як окремо, так і у комплексі з метформіном, суттєво зменшувало виразність інсулінорезистентності у щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу.

3. Екстракт із мідії чорноморської відновлював біоенергетичні характеристики (дихальний контроль) мітохондрій печінки та підшлункової залози щурів з різними експериментальними моделями діабету.

4. Вживання екстракту із мідії чорноморської знижувало ступінь оксидативного стресу в печінці та підшлунковій залозі щурів завдяки посиленню антиоксидантного захисту (підвищення активності глутатіон-залежної ланки).

5. Довготривале застосування екстракту із мідій відвертало стимуляцію апоптозу в печінці та підшлунковій залозі за умов абсолютної інсулінової недостатності (дитизоновий діабет у кролів).

6. Екстракт із мідії чорноморської стабілізував мембрану еритроцитів кролів і щурів з експериментальним діабетом, відновлюючи їх порушену архітектоніку та функціональні показники (дискоїдність та динаміку індукованого гемолізу, відповідно).

7. Під дією екстракту із мідії чорноморської, як при ізольованому використанні, так і у сполученні з метформіном, спостерігалася регенерація ацинарної та острівцевої частин підшлункової залози, ушкоджених за умов експериментального ЦД 2 типу.

8. Обґрунтована доцільність комбінованого застосування екстракту з мідій та метформіну у тварин з експериментальним цукровим діабетом різного ґенеза для потенціювання цукрознижуючої дії бігуаніду, а також для зменшення метаболічних зсувів, які не відновлюються метформіном, (активність глутатіон-пероксидази підшлункової залози, стійкість мітохондрій печінки та підшлункової залози щурів за показником дихального контролю, дискоїдність еритроцитів, інтенсивність апоптозу).

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Коррекция свойств мембраны эритроцитов крыс с экспериментальным сахарным диабетом с помощью экстракта из мидий [Текст] / А.Г. Шумейко, Т.Н. Овсянникова, И.А. Забелина, В.С. Буркина, Д.Н. Тишко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2008. – Т.8, вып.4(24). – С. 150-154. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто проводив біофізичні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз.)

2. Подавление оксидативного стресса в митохондриях печени крыс при стрептозотоциновом сахарном диабете с помощью экстракта из мидий [Текст] / А.Г. Шумейко, В.В. Полторак, Т.Н. Овсянникова, И.А. Забелина, А.И. Гладких // Проблеми екології та медицини. – 2008. – Т.12, №5-6. –
С. 48–51. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто проводив дослідження біоенергетичних властивостей мітохондрій, статистичну обробку даних та їх аналіз.)

3. Влияние экстракта из мидий на репаративные процессы в поджелудочной железе крыс при экспериментальном сахарном диабете [Текст] / А.Г. Шумейко, Т.Н. Овсянникова, Н.С. Красова, А.И. Гладких, Н.И. Гойденко // Світ медицини та біології. – 2009. – №1. – С. 99-103. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто проводив статистичну обробку даних та їх аналіз.)

4. Шумейко, А.Г. Защитный эффект экстракта из мидии черноморской *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* при моделировании аллоксанового диабета у крыс [Текст] / А.Г. Шумейко // Проблеми ендокринної патології. – 2008. –№3. – С. 49-55.

5. Supplementation with complex from mussels ameliorated oxidative processes in streptozotocin-induced diabetic rat’s liver mitochondria [Text] / V. Poltorak, A. Shumeyko, T. Ovsyannikova, О. Bityutska, А. Gladkih // Diabetologia. – 2007. – Vol.50, Suppl. 1. – Р. 360. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто досліджував антиоксидантні властивості екстракту з мідії, виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

6. Коррекция окислительных процессов в митохондриях с помощью гидролизата из мидии черноморской [Текст] / А.Г. Шумейко, Т.Н. Овсян-никова, В.В. Полторак, О.Е. Битютская, А.И. Гладких // Реактивные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: материалы пятой национальной научно-практической конференции с международным участием, Смоленськ, 2007 г. – Смоленск: ФГУ „Смоленский ЦНТИ”, 2007. – С.141-142. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту, особисто досліджував окисні процеси в мітохондріях та використовував методику їх корекції, виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

7. Влияние экстракта из мидий *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* на содержание продуктов перекисного окисления липидов в печени и поджелудочной железе крыс со стрептозотоциновым диабетом [Текст] /
Т.Н. Овсянникова, А.Г. Шумейко, В.В.Полторак, Н.С. Красова, А.И. Гладких, О.Е. Битютская, Л.П. Пивоваревич // От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине: материалы Международного Междисциплинарного симпозиума, Судак, 19-30 сентября 2008 г. – Судак, 2008. – С. 100-103. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто досліджував зміни вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів при використанні екстракту з мідії, виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

8. Уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов в поджелудочной железе и печени крыс с моделированным диабетом 2 типа [Текст] / А. Г. Шумейко, В. В. Полторак, Т. Н. Овсянникова, Н.С. Красова, А.И. Гладких, О.А. Реутина // Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи (Сьомі Данилевські читання): матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 21-22 лютого 2008 р. – Харків, 2008. – С. 146-147. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто досліджував рівень продуктів перекисного окислення ліпідів, виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

9.  Шумейко, А.Г. Влияние экстракта из мидий на структуру поджелудочной железы крыс с экспериментальным сахарным диабетом [Текст] / А. Г. Шумейко, Н.И. Гойденко, В. В. Полторак // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали ІІІ Міжнародної конференції молодих науковців, Харків, 18-21 листопада 2008 р. – Харків,2008. – С. 134-135. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

10.  Реутина, О.А. Изучение антиоксидантного статуса печени крыс при модельном сахарном диабете [Текст] / О.А. Реутина, А.Г. Шумейко, Т.Н. Овсянникова // Матеріали І міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології», Донецьк, 23 – 26 лютого 2009 р. – Донецьк, 2009. – С. 168-169. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто досліджував антиоксидантну систему, виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

11.  Effect of mussel extract on the lipid peroxidations in liver and pancreas of type 2 diabetes rats [Text] / T. Ovsyannikova, A. Shumeyko, N. Krasova, I. Zabelina, L. Pyvovarevich, V. Poltorack // Reactive oxygen and nitrogen species antioxidants and human health: VI Inter. Conf, Smolensk, 2009 y. – Smolensk, Russia, 2009. – Р. 65-66. (Дисертант приймав участь в проведенні експерименту та особисто досліджував рівень продуктів перекисного окислення ліпідів при використанні екстракту з мідії, виконував статистичну обробку даних та їх аналіз.)

**АНОТАЦІЯ**

**Шумейко О. Г.** Експериментальне обґрунтування застосування екстракту з мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* у комплексній терапії цукрового діабету. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.14–ендокринологія – ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України», Харків, 2009.

Дисертація присвячена вивченню антидіабетичних властивостей екстракту з мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* за умов експериментальної інсулінової недостатності різного ґенеза.

Встановлені цукрознижуючі властивості екстракту із мідії чорноморської в дозі 400 мг на кг маси тіла за умов абсолютної та відносної інсулінової недостатності у щурів та кролів при використанні як превентивних, так і реабілітаційних режимів терапії. Доведено, що вживання екстракту з мідії чорноморської гальмувало розвиток інсулінорезистентності у тварин з експериментальним цукровим діабетом 2 типу. Показано, що надання діабетичним тваринам екстракту з мідії чорноморської запобігало розвитку оксидативного стресу в печінці та підшлунковій залозі за рахунок нормалізації активності глутатіон-залежних ферментів, поліпшення біоенергетичних характеристик мітохондрій. Вживання діабетичними тваринами екстракту з мідії чорноморської позитивно впливало на форму еритроцита, архітектоніку еритроцитарної мембрани та її стійкість до кислотного гемолізу. Під впливом екстракту з мідії чорноморської спостерігалася репаративна регенерація підшлункової залози щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу. Ряд антидіабетичних властивостей екстракту максимально виявлялося при його сполученому вживанні з метформіном, що дозволяє рекомендувати екстракт із мідії чорноморської *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* в якості компонента комплексної цукрознижуючої, антиоксидантної, панкреато- та гепатопротекторної терапії цукрового діабету.

**Ключові слова**: цукровий діабет,екстракт з мідії, оксидативний стрес, інсулінова недостатність, інсулінорезистентність,мітохондрії.

**АННОТАЦИЯ**

**Шумейко А.Г.** Экспериментальное обоснование применения экстракта из мидии черноморской *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* в комплексной терапии сахарного диабета. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.14–эндокринология – ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины», Харьков, 2009.

Диссертация посвящена изучению антидиабетических свойств экстракта из мидии черноморской *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* в условиях экспериментальной инсулиновой недостаточности различного генеза. Выбор экстракта из мидий для расширенных доклинических исследований в качестве антидиабетического средства был сделан на основании ранее показанной антиоксидантной активности, а также с учетом его качественного состава, богатого аминокислотами и эссенциальными жирными кислотами, способными участвовать в пластических регенеративных клеточных процессах.

Установлено, что экстракт из мидий обладает сахароснижающим эффектом в дозе 400 мг на кг массы тела в условиях абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности при введении животным как на стадии формирования диабета, так и после его манифестации. Максимальный сахароснижающий эффект у крыс с СД 2 типа получен для комплекса метформина с экстрактом из мидий.

Выявлено, что прием экстракта позитивно влиял на изменение массы тела диабетических животных с абсолютной инсулиновой недостаточностью.

Доказано, что введение экстракта из мидий тормозило развитие инсулинорезистентности у крыс с экспериментальным СД 2 типа, возникающей вследствие токсического действия гипергликемии и гиперлипидемии. Двухнедельное применение экстракта из мидий и метформина, как по отдельности, так их сочетания, у крыс на фоне модели СД 2 типа (ожирение, относительная инсулиновая недостаточность, первичная и вторичная инсулинорезистентность) приводило по результатам инсулинового теста к улучшению чувствительности к инсулину, не достигая уровня интактного контроля, но значимо отличаясь от показателей животных с диабетом, получавших плацебо.

Прием экстракта из мидий предотвращал развитие оксидативного стресса в печени и поджелудочной железе животных с экспериментальным сахарным диабетом за счет улучшения биоэнергетических характеристик митохондрий, нормализации активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Исследования, проведенные на крысах с экспериментальным СД 2 типа, показали, что двухнедельное применение экстракта из мидий и препарата сравнения метформина приводило к полному восстановлению функциональных характеристик митохондрий печени, а комплекс этих средств достоверно повышал дыхательный контроль митохондрий по сравнению с показателем у интактных животных. Дыхательный контроль поджелудочной железы при этом максимально восстанавливался с помощью экстракта из мидий и его комплекса с метформином, но не нормализовался при самостоятельном использовании бигуанида. Активность основного глутатион-зависимого антиоксидантного фермента ГПО нормализовалась на фоне СД 2 типа после приема экстракта из мидий: в печени – как при самостоятельном его использовании, так и в сочетании с метформином; в поджелудочной железе комплекс этих средств был более эффективен в данном отношении.

Нарушение функционирования митохондрий и снижение антиоксидантной активности печени и поджелудочной железы при СД может служить пусковым механизмом оксидативного стресса. Действительно, на уровне этих органов были установлены разнонаправленные изменения концентрации продуктов ПОЛ – ДиК, ТК, ОДК та ТЕТ при СД 2 типа, которые нивелировались применением экстракта из мидий.

По критериям стимуляции апоптоза выявлено, что длительное применение экстракта из мидий улучшало общую выживаемость клеток печени и поджелудочной железы кроликов с дитизоновым диабетом.

Получение диабетическими животными с моделями абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности экстракта из мидий позитивно влияло на архитектонику эритроцитарной мембраны, ее устойчивость к действию кислотного гемолитика и форму эритроцита.

Под действием экстракта из мидий наблюдалась репаративная регенерация поджелудочной железы при СД 2 типа.

Ряд антидиабетических свойств экстракта максимально проявлялись у животных с экспериментальным сахарным диабетом разного генеза при его приеме в сочетании с метформином (а именно, потенцирование сахароснижающего действия бигуанида, уменьшение полностью не восстанавливаемых метформином метаболических нарушений – активность глутатион-пероксидазы поджелудочной железы, стойкость митохондрий печени и поджелудочной железы по показателям дыхательного контроля, дискоидность эритроцитов, интенсивность апоптоза). Это позволяет рекомендовать экстракт из мидий черноморской *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* в качестве компонента комплексной сахароснижающей, антиоксидантной, панкреато- и гепатопротекторной терапии сахарного диабета.

**Ключевые слова**: сахарный диабет, экстракт из мидии, оксидативный стресс, инсулиновая недостаточность, инсулинорезистентность, митохондрии.

**ANNOTATION**

**Shumeyko O.G.** Experimental basis of mussel *(Mytilus galloprovincialis Lam.)* extract as applied to complex therapy of diabetes mellitus. – Manuscript.

Thesis for the Degree of Candidate of Medical Sciences by speciality 14.01.14–endocrinology – V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems at AMS of Ukraine, Kharkiv, 2009.

The thesis is devoted to the study of antidiabetic properties of musselextract in different experimental insulin deficiency states. The mussel extract supplementation (400 mg/kg b.w. per os) in animals with the absolute and relative insulin deficiencies produced the glucose-lowering effect during diabetes formation as well as after manifestation of diabetes. It was proved that mussel extract prevented development of the oxidative stress in liver and pancreas rats with diabetes. The thesis represented that it was bound up with glutathione-dependent antioxidant enzymes normalization and bioenergetic mitochondrial characteristics amelioration. The mussel extract supplementation had a positive influence on the erythrocytes structures and their stability to the acid haemolysis. Supplementation of extract stimulated of pancreas regeneration. Some of antidiabetic properties of musselextract were enhanced in the presence of metformine. The result of our investigation allows to recommend musselextract as a supplementation potential complex agent in the glucose-lowering, antioxidant, pancreas- and hepatoprotective therapy of diabetes.

**Key words**: diabetes mellitus, mussel extract, oxidative stress, insulin deficiency, insulin resistance, mitochondrias.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ**

|  |  |
| --- | --- |
| АМОВВТТГВЧТТГ | - активні метаболіти оксигену- внутрішньовенний тест толерантності до глюкози - внутрішньочеревний тест толерантності до глюкози |
| ГПО | - глутатіонпероксидаза |
| Г-S-Т | - глутатіон-S-трансфераза |
| ДіК | - дієнові кон’югати |
| ІР | - інсулінорезистентність |
| МДА | - малоновий діальдегід |
| ОДК | - оксодієнові кон’югати |
| ПОЛ | - перекисне окислення ліпідів |
| ТЕТ | - тетраєнові кон’югати |
| ТК | - трієнові кон’югати  |
| ЦД | - цукровий діабет |
| ЦД 2 | - цукровий діабет 2 типу |



Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>