

УДК 577.126:57.042

Загайко А.Л., Красильникова О.А., Кравченко А.Б.,
Филимоненко В.П., Шира Е.Н.

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ НА СИСТЕМУ ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков,
e-mail: andrey.zagayko@gmail.com

Ключевые слова: сахарный диабет, стевия, стевиозид, оксид азота, аргинин.

Сахарный диабет 2-го типа (СД2, инсулиннезависимый диабет) – метаболическое заболевание, характеризующееся хронической гипергликемией, развивающейся в результате нарушения секреции инсулина или механизмов его взаимодействия с клетками тканей [11]. Основной причиной смерти при СД 2 являются сердечно-сосудистые осложнения, обусловленные развитием микро- и макроангиопатий [5]. Главная роль в развитии этих осложнений СД принадлежит гипергликемии, которая запускает ряд патологических механизмов. Основные механизмы, определяющие развитие микро- и макроангиопатий, – это эндотелиальная дисфункция, оксидативный стресс и нарушение реологических свойств крови [12]. Гипергликемия приводит к интенсивному образованию свободных радикалов, которые могут соединяться с молекулами липидов, что способствует раннему развитию атеросклероза. Кроме того, свободные радикалы связывают молекулы оксида азота (NO), секретируемого эндотелием сосудов и являющегося мощным вазодилататором, ингибируют его действие, что еще более усугубляет эндотелиальную дисфункцию, которая ускоряет развитие макроангиопатий [2]. Поскольку нарушение функционирования системы генерации оксида азота и снижение образования NO приводит к нарушению микроциркуляции крови, изучение участия NO и ферментов его обмена в патогенезе сахарного диабета является чрезвычайно актуальным вопросом [18, 19].

Традиционная терапия сахарного диабета основана на применении сахароснижающих препаратов и инсулина [25]. В тоже время, поступление ксенобиотиков в организм человека является мощным активатором процессов микросомального и

свободнорадикального окисления, поэтому растет интерес к поиску веществ природного, в особенности растительного происхождения.

Сте́вия (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – многолетнее растение семейства Астровые, или Сложноцветные. Листья данного растения содержат дитерпеновые гликозиды, которые придают листьям сладкий вкус, в 30-50 раз слаще сахара. В ряде стран используют стевию в качестве сахарозаменителя [6]. В последнее время было установлено, что компоненты листьев стевии (стевиозид и ребаудиозид) обладают гипогликемическим, гипертензивным, противовоспалительным, диуретическим, иммуномодулирующим действием [6, 15]. Экстракт листьев стевии снижает уровень глюкозы, гликированного гемоглобина в крови, усиливая синтез гликогена в печени у пациентов с СД1 и СД2 [9]. На экспериментальной модели инсулинорезистентности у мышей было показано, что стевиозид повышает секрецию инсулина, стимулированную глюкозой, а также чувствительность клеток организма к действию инсулина [3, 7]. Стевиозид снижает артериальное давление, стимулирует диурез, натри- и калиурез [16], повышает чувствительность клеток миокарда к верапамилу [21]. Высказано предположение, что действие стевиозида на изолированных участках аорты опосредовано вовлечением NO-синтазы и гуанилатциклазы [27].

Учитывая вышеизложенное целью настоящей работы было изучение влияния гликозидов стевии на систему генерации оксида азота у крыс в условиях моделирования сахарного диабета 2-го типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на самцах крыс линии Wistar массой 140-200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. СД2 моделировали содержанием животных на диете с высоким уровнем фруктозы (60 г/на 100 г диеты) в течение 60 дней [20]. Водный раствор гликозидов стевии вводили внутривентрикулярно в дозе 20 мг/кг массы животного в течение 30 дней, начиная с 30 дня эксперимента [7]. Контрольные животные получали аналогичную дозу воды.

Исследованные показатели определяли в сыворотке крови. Содержание глюкозы крови измеряли с помощью стандартного набора реактивов фирмы Felicit. Содержание инсулина в сыворотке крыс определяли радиоиммунным методом с использованием стандартных наборов реактивов Инсулин ELISA (DRG, USA). Содержание аргинина определяли по реакции Сакагуччи [14], цитруллина - по методу Горнола и Хантера [1]. Уровень NO оценивали по образованию нитратов+нитритов с помощью реактива Грисса [19].

Статистическую обработку данных проводили с использованием вариационной статистики (ANOVA). Статистически достоверные результаты принимали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Как видно из представленных данных (табл. 1, рис. 2) при длительном содержании животных на рационе, обогащенном фруктозой, в крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, инсулина, в тоже время содержание аргинина, цитруллина, а также нитратов+нитритов достоверно снижалось.

Таблица 1. Влияние гликозидов стевии на содержание глюкозы и инсулина в крови крыс ($M \pm m$, $n = 7$).

Содержание метаболитов	Интакт	Контроль	СД2	СД2+ Стевия	Стевия
Глюкоза, ммоль/л	4,5 ± 0,5	4,3 ± 0,6	12,5 ± 3,9*	7,8 ± 1,6	4,0 ± 0,4
Инсулин, мкМоль/л	0,61 ± 0,03	0,61 ± 0,08	1,05 ± 0,4*	0,76 ± 0,05	0,63 ± 0,09

* – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Снижение содержание аргинина в крови крыс при экспериментальном СД2 может быть связано с его активной утилизацией. Аргинин служит необходимым предшественником для синтеза белков и многих биологически важных молекул, таких как орнитин, пролин, полиамины, креатин и агматин. Однако главная роль аргинина в организме человека – быть субстратом для синтеза NO. В физиологических условиях синтез NO из L-аргинина происходит с помощью ферментов NO-синтаз (NOS), вторым продуктом реакции является L-цитруллин [22]. В тоже время аргинин является субстратом для аргиназы, которая образует аминокислоту орнитин и мочевину [19]. Падение уровня нитратов+нитритов может объясняться усилением расщепления аргинина под действием аргиназы, что подтверждается данными литературы [18].

Повышение концентрации глюкозы в крови и в клетках различных тканей (эндотелий сосудов, нейроны) при СД становится причиной постоянного образования свободных радикалов, которые повреждают липидные и белковые компоненты клеток, способствуют образованию и накоплению высокотоксичных липоперекисных соединений, усиливающих процессы дестабилизации клеточных мембран [26]. Согласно данным литературы, активация процессов свободнорадикального окисления может сопровождаться снижением содержания ВН4 – кофермента, который принимает участие во

взаимодействии данного фермента с субстратом, и, как следствие, снижением сродства фермента к своему субстрату – аргинину [4]. Таким образом, наблюдаемое в наших условиях торможение образования NO в сыворотке крови, может быть, таким образом, также обусловлено снижением сродства аргинина к NOS.

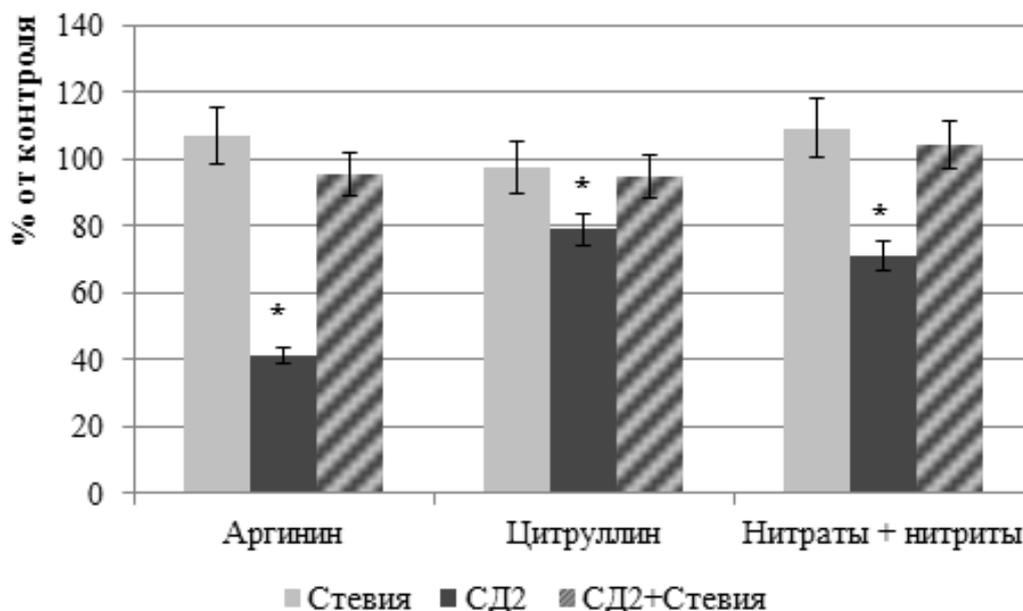


Рис. 1. Влияние гликозидов стевии на содержание аргинина, цитруллина и нитратов+нитритов в сыворотке крови контрольных крыс и в условиях экспериментального СД2 ($M \pm m$, $n = 7$, * – $p < 0,05$ по отношению к контролю со стевией).

Наблюдаемое работе состояние гипергликемии, которое сопровождается повышением содержанием инсулина, что свидетельствует о развитии состояния резистентности к инсулину. На клеточном уровне инсулинорезистентность характеризуется нарушением передачи инсулинового сигнала на уровне фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы Akt, участие которых необходимо для транслокации GLUT4 и генерации NO. Нарушение активности Akt инактивирует дигидроптеринредуктазу и GTP-циклогидролазу, что приводит к снижению содержания BH4 [4].

Введение животным гликозидов стевии в значительной степени снижало содержание глюкозы в крови, нормализовало содержание аргинина, концентрацию метаболитов оксида азота и цитруллина, сопровождающие экспериментальный СД2 (табл. 1, рис. 1) согласно данным литературы снижение уровня глюкозы на модели СД обоих типов может быть связана с торможением процесса глюконеогенеза (путем регуляции активности пируваткарбоксилазы) [23], повышением чувствительности клеток-мишеней к инсулину [8].

Нормализация уровня NO, аргинина и цитруллина в сыворотке крови крыс после применения гликозидов стевии, по-видимому, обусловлена, в первую очередь, их гипогликемической активностью, которая, показана в данной работе (табл. 1) и подтверждается данными литературы [3, 7, 9].

Нормализация уровня инсулина может быть обусловлено нормализующим влиянием гликозидов стевии на инсулинпродуцирующие клетки, а также нормализацией утилизации инсулина [13]. Повышение уровня метаболитов NO, что свидетельствует об усилении образования данного соединения, может быть опосредовано усилением образования адипонектина [10], поскольку полагают, что именно гипoadипонектинемия является важной причиной снижения активности NO-синтазы в мышечных клетках животных с экспериментальным СД2 [17]. Также имеются данные литературы о вовлечении адипонектина в регуляцию инсулинового сигналинга на уровне фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы Akt [24].

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о развитии нарушений в системе генерации оксида азота при экспериментальном СД2. Гликозиды стевии оказывают гипогликемическое действие, а также нормализующее действие на систему генерации оксида азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В.С. Биохимическая фотометрия. – М.: Изд-во АН СССР, 1957. – 654 с.
2. Головченко Ю.И., Трещинская М.А. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции // *Concilium medicum Ukraina*. – 2008. – № 11. – С. 38–40.
3. Abudula R., Jeppesen P.B., Rolfsen S.E. [et al.] Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency // *Metabolism*. – 2004. – Vol. 53, N10. – P. 1378–1381.
4. Akamine E.H., Kawamoto E.M., Scavone C. et al. Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin // *J. Vasc. Res.* – 2006. – Vol. 43, №4. – P. 309–320.
5. Anfossi G., Russo I., Doronzo G., Trovati M. Contribution of insulin resistance to vascular dysfunction // *Arch.Physiol.Biochem.* – 2009. – Vol. 115, №4. – P. 199–217.
6. Anton S.D., Martin C. K., Han H. et al. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels // *Appetite*. – 2010. – Vol. 55, №1. – P. 37–43.
7. Chang J.C., Wu M.C., Liu I.M., Cheng J.T. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats // *Horm. Metab. Res.* – 2005. – Vol. 37, №10. – P. 610–616.

8. Chen J., Jeppesen P.B., Nordentoft I., Hermansen K. Stevioside improves pancreatic beta-cell function during glucotoxicity via regulation of acetyl-CoA carboxylase // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 292, №6. – P. E1906–E1916.
9. Chen T.H., Chen S.C., Chan P. et al. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana* // *Planta Med.* – 2005. – Vol. 71, №2. – P. 108–113.
10. Cusi K., Maezono K., Osman A. et al. Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase and MAP kinase-mediated signaling in human muscle // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 105. – P. 311–320.
11. Davidson M. A review of the current status of the management of mixed dyslipidemia associated with diabetes mellitus and metabolic syndrome // *Am. J. Cardiol.* – 2008. – Vol.22, №102. – P. 19L–27L.
12. Friederich M., Hansell P., Palm F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function // *Curr. Diabetes. Rev.* – 2009. – Vol.5, №2. – P. 120–144.
13. Geeraert B., Crombé F., Hulsmans M. et al. Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice // *Int. J. Obes. (Lond).* – 2010. – vol. 34, N3. – P. 569–577.
14. Gilboe D.D., Williams J. N. Jr. Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1956. – Vol. 91, №4. – P. 535–536.
15. Gregersen S., Jeppesen P.B., Holst J.J., Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects // *Metabolism.* – 2004. – 53, N 1. – P. 73–76.
16. Jeppesen P.B., Gregersen S., Rolfsen S.E. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat // *Metabolism.* – 2003. – Vol. 52, №3. – P. 372–378.
17. Kashyap S.R., Roman L.J., Mandarino L. et al. Hypoadiponectinemia is closely associated with impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* – 2010 – Vol. 8, №5. – P. 459–463.
18. Kashyap S.R., Lara A., Zhang R. et al. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients // *Diabetes Care.* – 2008. – Vol. 31, №1. – P. 134–139.
19. Kim F., Pham M., Maloney E. et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28, №11. – P. 1982–1988.
20. Maiztegui B., Borelli M.I., Raschia M.A. et al. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion // *J. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 200, №2. – P. 139–149.
21. Melis M.S., Sainati A.R. Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside // *J. Ethnopharmacol.* – 1991. – Vol. – 33, №3. – P. 257–262.
22. Mori M., Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection // *J. Nutr.* – 2004. – Vol. 134, 10 Suppl. – P. 2820S–2825S.
23. Roberts A., Renwick A.G. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats // *Food Chem. Toxicol.* – 2008. – Vol. 46, Suppl 7. – P. S31–S39.
24. Smith C.C., Yellon D.M. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection // *Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 129, №. – P. 206–219.

25. Standards of Medical Care in Diabetes — 2010 / American Diabetes Association / Diabetes Care. – 2010. – Vol. 33, №1. – P. S11–S61.
26. Wei W., Liu Q., Tan Y. et al. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications // Hemoglobin. – 2009. – Vol. 33, №5. – P. 370–377.
27. Wong K.L., P. Chan, Yang H.Y. Isosteviol acts on potassium channels to relax isolated aortic strips of Wistar rat. // Life Sci. – 2004. – Vol. 74, №19. – P. 2379–2387.

**Загайко А.Л., Красильникова О.А., Кравченко А.Б.,
Филимоненко В.П., Шира Е.Н.**

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ НА СИСТЕМУ ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Ключевые слова: сахарный диабет, стевия, стевииозид, оксид азота, аргинин.

Целью настоящей работы было изучение влияния гликозидов стевии на систему генерации оксида азота у крыс в условиях моделирования сахарного диабета 2-го типа (СД2). СД2 моделировали содержанием животных на диете с высоким уровнем фруктозы. При СД2, в крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, инсулина, в тоже время содержание аргинина, цитруллина, а также метаболитов оксида азота достоверно снижалось.

Введение животным гликозидов стевии в значительной степени снижало содержание глюкозы в крови, нормализовало содержание аргинина, концентрацию метаболитов оксида азота и цитруллина, сопровождающие экспериментальный СД2. Нормализация уровня NO, аргинина и цитруллина в сыворотке крови крыс после применения гликозидов стевии, по-видимому, обусловлена, в первую очередь, их гипогликемической активностью, которая, показана в данной работе.

**Zagayko A.L., Krasilnikov O.A., Kravchenko A.B.,
Filimonenko V.P., Shira E.N.**

EFFECT OF STEVIA GLYCOSIDES ON THE SYSTEM OF NITRIC OXIDE GENERATION IN MODELING DIABETES MELLITUS IN RATS

Keywords: diabetes, stevia, stevioside, nitric oxide, arginine.

The aim of this work was to study the effect of stevia glycosides on the system of nitric oxide generation in rats while modeling type 2 diabetes mellitus (DM2). DM2 was simulated by putting animals on a diet with high fructose levels. Under type 2 diabetes, blood glucose and insulin levels significantly increase; at the same time, the amounts of arginine, citrulline, and nitric oxide metabolites are significantly reduced.

The administration of stevia glycosides to the rats significantly decreased blood glucose levels, normalized arginine amount, as well as the concentration of nitric oxide metabolites and citrulline accompanying the experimental type 2 diabetes. The normal levels of NO, arginine and citrulline in the blood serum of rats after administering stevia glycosides suggest their hypoglycemic effect shown in this paper.