

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ САХАРИДОВ НА ФУРЬЕ-СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Нечипоренко А.П.¹, Везо О.С.², Нечипоренко У.Ю.³, Плотникова Л.В.²,
Ситникова В.Е.¹, Плотников П.П.²

¹ Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики
Кронверкский пр., 49, г. Санкт-Петербург, 197101, РФ

² Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская набережная, 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: ljusja@mail.ru

³ Независимая лаборатория «ИНВИТРО СПб.»
ул. Благодатная, 18, г. Санкт-Петербург, 196106, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2021

Аннотация. Методами ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения и биохимического анализа исследовано влияние меда разного ботанического вида, пищевых сахаров и растительного подсластителя "Стевиозид" (в качестве провоцирующей нагрузки) на толерантность организма к глюкозе и скорость вывода ее из кровотока. Исследование плазмы крови на содержание глюкозы проводилось методом гликемических (сахарных) кривых по 4 точкам забора крови у женщины-пациента, прошедшей медикаментозный курс лечения на начальной стадии заболевания диабетом второго типа. Предварительное исследование методами рефрактометрии и биохимического анализа препаратов моносахаридов (глюкоза, фруктоза), пищевых дисахаридов (свекловичный и тростниковый сахара) и медов с разным соотношением моносахаридов (степной, гречишный, каштановый, акации белой) позволило идентифицировать проявление в ИК-спектрах плазмы крови полос, обусловленных глюкозой и фруктозой, и проявление метаболической памяти человеческого организма на состав пищевой диеты.

Ключевые слова: плазма крови человека, мед, сахараиды, Фурье ИК- спектроскопия

Как известно, глюкоза играет важнейшую роль в обеспечении энергией всех тканей организма человека и в клеточном дыхании. Клетки скелетных мышц, нервной системы, сердца и головного мозга, больше всего нуждающихся в энергии, в первую очередь страдают при ее длительном понижении (гипогликемия) или повышении (гипергликемия), что приводит к серьезным последствиям. Для человеческого организма крайне важно, чтобы количество глюкозы поддерживалось на постоянном нормальном уровне. Поэтому медики придают большое значение контролю уровня глюкозы в крови, являющегося основным интегральным показателем состояния углеводного обмена. Это важно для диагностики и лечения таких эндокринных заболеваний как сахарный диабет, функции печени, надпочечников и др. [1-3].

Сахарный диабет второго типа обусловлен нарушением восприимчивости клеток организма к гормону инсулину, который вырабатывается поджелудочной железой, и неспособностью клеток использовать глюкозу. В результате инсулин не может доставлять в клетки основной источник энергии – глюкозу, что приводит к повышению ее концентрации в крови [4-7]. В медицинской терминологии это называется инсулинорезистентностью. Сегодня диабет второго типа стал проблемой мирового масштаба, которая занимает третье место среди причин смертности после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. По данным Всемирной организации здравоохранения в последние годы тенденции к регрессу заболеваемости не только не наблюдается, но есть немало свидетельств того, что болезнь помолодела и уже не редкость встретить сахарный диабет у детей и подростков [8–10]. Многие специалисты занимаются ей на протяжении десятилетий, но на сегодняшний день нет метода, позволяющего излечить его полностью. Из-за чего возникает сахарный диабет второго типа ученым еще неизвестно, нередко имеет место не одна предпосылка, а целый комплекс причин. Тактика лечения направлена на медикаментозное восстановление чувствительности клеток к инсулину и снижение уровня глюкозы безуглеводной диетой. В качестве заменителя сахарозы при сахарном диабете второго типа рекомендуют фруктозу, которая не зависит от инсулина и медленно выводится из кровотока, природные и синтетические подсластители, а также мед с повышенным содержанием фруктозы [6, 11-14].

Мёд – естественный природный продукт растительно-животного происхождения, еще не до конца изученный и понятый, содержит микро- и макроэлементы, витамины, аминокислоты, органические кислоты, ароматические вещества, которые легко усваиваются организмом и обеспечивают его энергией. На протяжении многих столетий единственным сладким продуктом, который употреблял человек, был мёд. Сахар – "голый" углевод научились производить всего лишь пару столетия назад. Химический состав меда весьма сложный (содержит до 300–400 различных компонентов), непостоянен и зависит от вида растений, с каких собирался нектар, структуры и состава почвы, на которой растут медоносы, района их произрастания, времени сбора нектара пчелами и их породы, погодных и климатических условий, срока хранения, зрелости меда и пр. [15, 16].

Основную часть меда составляют сахара (глюкоза, фруктоза, мальтоза, трегалоза, сахароза и др.), общее содержание которых может достигать 80%. Но основную долю составляют глюкоза и фруктоза – до 80-90% от суммы всех сахаров, их доля зависит от активности ферментов и вида растительного источника нектара. Сахароза гидролизуется под действием фермента инвертазы, расщепляясь на глюкозу и фруктозу, которые в итоге

представляют сумму инвертированных моносахаров. Два абсолютно разных по своим свойствам углевода и усваиваются организмом по-разному. Безусловное преимущество фруктозы состоит в том, что она усваивается медленно, не вызывает быстрых выбросов сахара в кровь, служит источником так называемой «медленной энергии» и не требует участия инсулина вообще. Это свойство используют при создании сладкой пищевой продукции для больных сахарным диабетом. Глюкоза, в отличие от фруктозы, усваивается моментально и гликемический индекс продуктов определяется по содержанию в них глюкозы.

Именно глюкоза и фруктоза и их соотношение в составе разных видов меда определяют их свойства. Больше фруктозы – слаще мед. Больше глюкозы – продукт быстрее кристаллизуется. Большая концентрация этих основных компонентов – свидетельство пищевой ценности меда. От содержания фруктозы зависит гликемический индекс меда. Чем фруктозы больше, тем он ниже. Фруктоза перерабатывается организмом без участия инсулина и является оптимальным решением для людей с сахарным диабетом. Так, химический состав меда белой акации, считающегося самым жидким видом меда, и процентное соотношение этих сахаров, делают его предпочтительным для диабетиков. Больным с гипергликемией рекомендуется откорректировать режим питания, ограничив поступление углеводов с пищей (сахаросодержащие продукты, белый хлеб, макароны, картофель и пр.). Следует отметить, многие авторы считают, что низкоуглеводная диета – первое лекарство при диабете [17, 18]. Хорошо известно, что до изобретения современных препаратов, случаи диабета лечили только диетой и голоданием.

Обзор литературных данных показал, что публикаций по применению метода Фурье-ИК-спектроскопии (ИКС НПВО) к исследованию одноразовой пробы сыворотки крови людей и животных, больных диабетом второго типа, взятой натощак, крайне мало [18, 20]. Следует отметить, что в медицинских лабораториях для диагностики инструментальные методы практически не используются. Основными методами лабораторного тестирования заболевания к настоящему времени являются биохимические [21-23], среди которых наиболее информативным считается расширенный тест на толерантность к глюкозе – метод гликемических (сахарных) кривых по трем-четырем контрольным точкам забора крови, как ответ организма на провоцирующую нагрузку глюкозой. Метод дает представление о скорости выхода ее из кровотока, что важно при курировании процесса лечения данного заболевания.

В связи с этим, целью работы являлось: выявление потенциальных возможностей метода ИКС НПВО в исследовании проявлений глюкозы и фруктозы в спектрах плазмы крови, полученной методом сахарных кривых, с использованием в качестве провоцирующей нагрузки медов с разным соотношением моносахаридов; влияние сезонного состава пищевой диеты на характер и динамику изменения оптических характеристик плазмы крови.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись:

1. Плазма крови женщины-пациента, прошедшей в течение года курс медикаментозного лечения на начальной стадии заболевания диабетом второго типа на фоне безуглеводной диеты [24]. В исследовании забор венозной крови осуществлялся 4 раза (4 контрольные точки). Первый забор крови делался натощак (контрольная точка 1). После этого пациент сразу выпивал сладкий напиток, и с интервалом 40 мин делались последующие заборы крови (контрольные точки 2–4). При этом анализировалось изменение уровня глюкозы в плазме. До начала программы исследования получена «холодная» сахарная кривая – плазма крови пациента без провоцирующей нагрузки (сахарная кривая № 1). Уровень глюкозы измерялся для 4 контрольных точек сахарных кривых плазмы крови с провоцирующей нагрузкой чашкой кофе (150 мл) с 2 чайными ложками различных углеводов (сахарные кривые №№ 2–9).

В качестве провоцирующей нагрузки использованы 4 вида меда, свекловичный и тростниковый сахара и порошок экстракта растительного подсластителя "Стевиозид". Плазму получали сепарированием цельной венозной крови – отделением центрифугированием жидкой части от форменных элементов в вакуумных пробирках (вакутейнерах) с антикоагулянтным покрытием (калиевая соль этилендиаминтерауксусной кислоты – ЭДТА) [5, 21]. Плазма исследовалась на общее содержание белка, осажденного трехкратным избытком этанола (96 %). Разделение глобулинов и альбуминов плазмы проводилось последовательным высаливанием сульфатом натрия Na_2SO_4 [25].

2. Меды разного ботанического вида: монофлерные – гречишный (Оренбургская обл.), каштановый, акации белой (Краснодарский край) и полифлерный – степной (Саратовская обл.).

3. Вспомогательные объекты – сухие препараты моносахаридов: глюкоза (Химреактив Моск. обл.), фруктоза ("Sigma"); пищевые дисахариды – свекловичный (Россия) и тростниковый (Канада) сахара, а также "Стевиозид" (Малайзия), зарегистрированный в качестве пищевой добавки E960 как безуглеводный подсластитель.

Содержание глюкозы в образцах плазмы крови и меда определялось в медицинском центре «ИНВИТРО СПб.» на биохимическом анализаторе ВА-400 (Испания) глюкозооксидазным методом с реактивами Biosystems. Данные по результатам биохимического анализа на содержание глюкозы в четырех медах приведены в таблице 1. Содержание глюкозы в плазме крови для 9 сахарных кривых представляет таблица 2.

Колебательные спектры (32 скана) образцов получали на Фурье-спектрометре Tensor 37 (Bruker, Германия) с алмазным НПВО элементом в диапазоне волновых чисел $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ [26, 27]. Сушку образцов плазмы крови и выделенных из нее белков для получения ИК-спектров проводили на предметных стеклах воздушным путем при

Таблица 1. Измеренные биохимические и рефрактометрические показатели мёдов

№	Мед	Глюкоза (б/х), % масс	nD	Инвертир. сахара, % масс	Фруктоза, % масс	Влажность, % масс
1	Степной	44,35	1,48545	79,94	35,59	20,40
2	Гречишный	42,07	1,48776	80,90	38,83	19,47
3	Каштановый	34,76	1,49350	83,24	48,48	17,20
4	Акации белой	31,24	1,49686	84,61	53,51	15,87

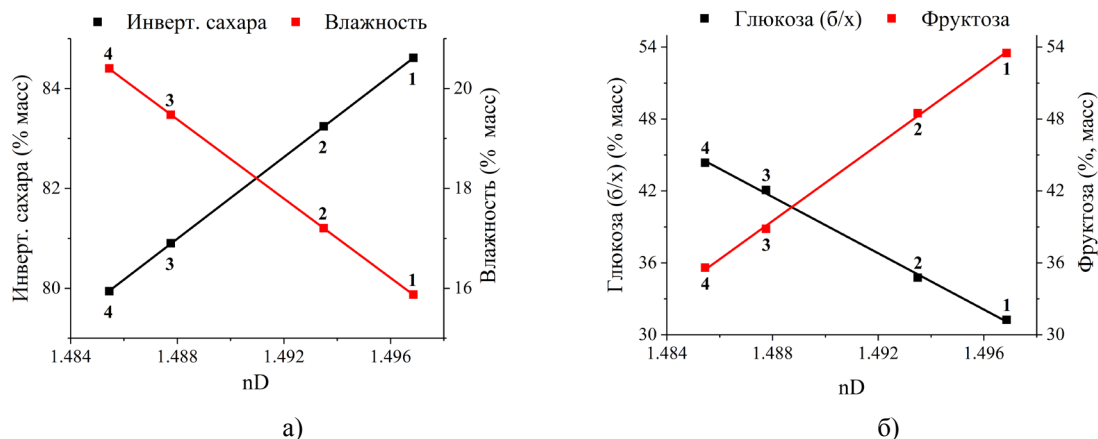


Рисунок 1. Зависимости: а) Рефрактометрических показателей: инвертированный сахар и влажность; б) содержания фруктозы и глюкозы от показателя преломления мёда: 1 – степного; 2 – гречишного; 3 – каштанового; 4 – акации белой

20-22°C в течение 4–6 часов. Рефрактометрические показатели образцов мёда (показатель преломления, инвертированные сахара, влажность) снимали на цифровом рефрактометре Abbemat MW/WR (Anton Paar, Австрия) при длине волны 589,3 нм («Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники», Научный парк СПбГУ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральному исследованию плазмы крови пациента с провоцирующими нагрузками предшествовал анализ мёдов рефрактометрическим (определение содержания инвертированных сахаров, показателя преломления – nD, влажности) и биохимическим (определение содержания глюкозы) методами. Содержание фруктозы оценивали по разности содержания инвертированных сахаров и глюкозы. Предварительные исследования серии мёдов (60 образцов) позволили разделить монофлерные мёды на две основные группы по соотношению глюкозы и фруктозы и идентифицировать полосы, обусловленные их поглощением в ИК-спектрах. Для дальнейших исследований выбраны наиболее доступные и используемые монофлерные мёды: гречишный (группа I с повышенным содержанием глюкозы), каштановый и акации белой (группа II с повышенным содержанием фруктозы) и полифлерный степной мед. Результаты рефрактометрических измерений и биохимического анализа выбранных образцов мёдов приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Полученные данные показали линейные зависимости между тремя рефрактометрическими показателями (рис. 1а) исследуемых мёдов. А также линейную связь содержания в них глюкозы и фруктозы с показателем преломления мёда (рис. 1б).

Результаты исследования плазмы крови методом сахарных кривых с разными провоцирующими нагрузками приведены в таблице 2. Помимо четырех мёдов, разного ботанического вида, для сравнительного исследования были использованы промышленные сахара: свекловичный и тростниковый (дисахариды, представляющие эквимолекулярную композицию α -глюкозы и β -фруктозы). Кроме того, интерес представляло включение в программу исследования экстракта растительного подсластителя "Стевиозид", полученного из листьев травы стевия и считающегося сегодня одним из лучших заменителей сахарозы для людей с заболеванием диабетом.

Первое, на что следует обратить внимание, – периодический характер изменения содержания нативной глюкозы в кровотоке для "холостой" сахарной кривой № 1 (без провоцирующей нагрузки) в интервале 5,13–5,60 ммоль/л. Это указывает на то, что первый забор крови при снятии серии сахарных кривых должен производиться в одно и то же время. И второе, – нестабильность (5,13–5,68 ммоль/л) показателя уровня глюкозы для первых контрольных точек сахарных кривых, несмотря на то, что забор крови проводился в одно и то же время (7 часов) натощак. Нормой считается концентрация глюкозы в плазме крови 4,0–5,9 ммоль/л. Значения этого показателя в пределах 6,1–7,0 ммоль/л свидетельствуют о преддиабете, а значения выше 7,0 ммоль/л – о сахарном диабете [6]. Таким образом, показатели уровня глюкозы в плазме крови пациента натощак, для первых контрольных точек, полученных в течение 9 месяцев с интервалом 3–5 недель отвечают норме. Однако через два

Таблица 2. Биохимический анализ плазмы крови на содержание глюкозы, ммоль/л

№ кривой	Провоцирующий агент	Контрольные точки сахарных кривых			
		1	2	3	4
1*	–	5,13	5,52	5,60	5,12
2	Сахар свекловичный	5,18	11,75	7,03	6,58
3	Мед степной	5,32	10,65	6,22	5,08
4	Мед гречишный	5,68	10,48	6,58	5,56
5	Мед каштановый	5,46	9,21	5,35	5,22
6	Мед акации белой-1	5,26	8,52	5,20	4,94
7	Тростниковый сахар	5,15	11,47	6,81	5,83
8**	Мед акации белой-2	5,43	12,18	6,82	4,85
9	Стевиозид	5,15	5,84	6,07	6,09

*без провоцирующей нагрузки, ** с двойной провоцирующей нагрузкой

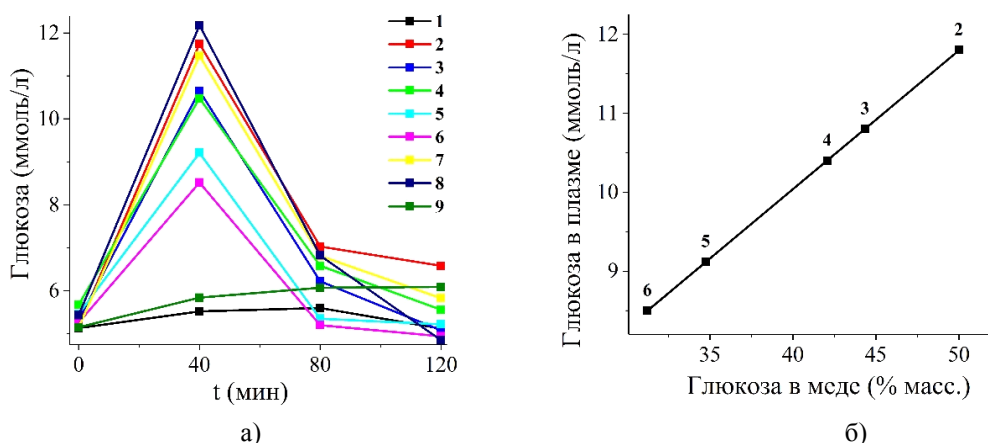


Рисунок 2. Графическое представление: а) сахарных кривых без (1) и с провоцирующей нагрузкой (2-9); б) зависимостей содержания глюкозы в плазме крови от ее содержания в меде (цифрой обозначена нагрузка в соответствие с таблицей 2)

часа (контрольная точка 4) более высокие значения по глюкозе в кровотоке показало применение в качестве провоцирующей нагрузки обоих сахаров (сахарные кривые № 2 и № 7) и гречишного меда (сахарная кривая № 4). При контроле на наличие признаков диабета второго типа большое значение имеет характер сахарной кривой, показывающий скорость выхода глюкозы из кровотока после провоцирующей нагрузки.

Более наглядное представление о динамике изменении уровня глюкозы в плазме крови дает графическое представление экспериментальных данных (рис. 2). Их анализ позволяет отметить, что через 40 минут после приема меда-провокаатора (контрольная точка 2) минимальные значения по уровню глюкозы в кровотоке показало применение в качестве провоцирующей нагрузки монофлерных медов – каштанового (№ 5) и акации белой (№ 6). При их приеме глюкоза быстрее выводится из кровотока (контрольная точка 3), по сравнению с остальными провокаторами. Сахарная кривая № 8, описывающая динамику изменения глюкозы в плазме для удвоенной дозы меда акации, несмотря на существенно более высокое значение в точке 2 (40 мин) по сравнению с сахарной кривой № 6, через два часа показывает даже несколько более низкое значение, что говорит о ее быстром выходе из кровотока по сравнению с глюкозой из сахаров (№ 2, № 7) и гречишного меда (№ 4).

Совершенно иную картину представляет сахарная кривая №9 с натуральным подсластителем несахарной природы "Стевиозид" в качестве провоцирующей нагрузки. Она близка к сахарной кривой № 1 в первых двух контрольных точках, но в последующих третьей и четвертой показывает небольшой прирост показателя уровня глюкозы. Самое высокое содержание глюкозы в плазме регистрируется при приеме равнозначного количества свекловичного сахара (№ 2). Глюкоза при его приеме дольше задерживается в кровотоке. Рисунок 2б иллюстрирует изменение уровня глюкозы в плазме крови через 40 минут после приема провоцирующей нагрузки (контрольная точка 2), в зависимости от содержания глюкозы в образце меда. Полученная зависимость показывает повышение уровня глюкозы в кровотоке с увеличением ее содержания в составе меда.

С целью идентификации полос, указывающих на спектральное проявление моносахаридов в медах и плазме крови, методом ИКС НПВО были исследованы сухие химические препараты D-глюкозы, L-фруктозы, свекловичного и тростникового сахаров. На рисунке 3 представлены фрагменты углеводной области их ИК-спектров. Сопоставление ИК-спектров, приведенных на рисунке 3а, показывает, что индивидуальными для глюкозы являются полосы 1154, 1108 см^{-1} и дублет полос 1020/1010 см^{-1} . Спектр фруктозы заметно отличается

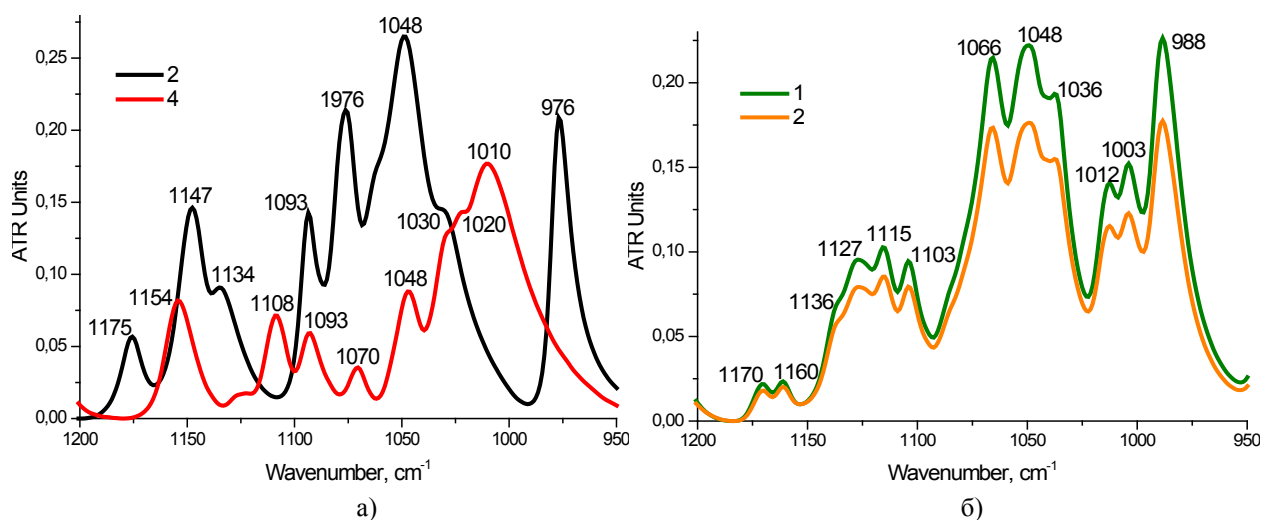


Рисунок 3. Фрагменты углеводной области (1200-950 cm^{-1}) ИК-спектров сухих сахаридов: а) 1 – глюкозы; 2 – фруктозы; б) 1 – свековичного; 2 – тростникового сахаров

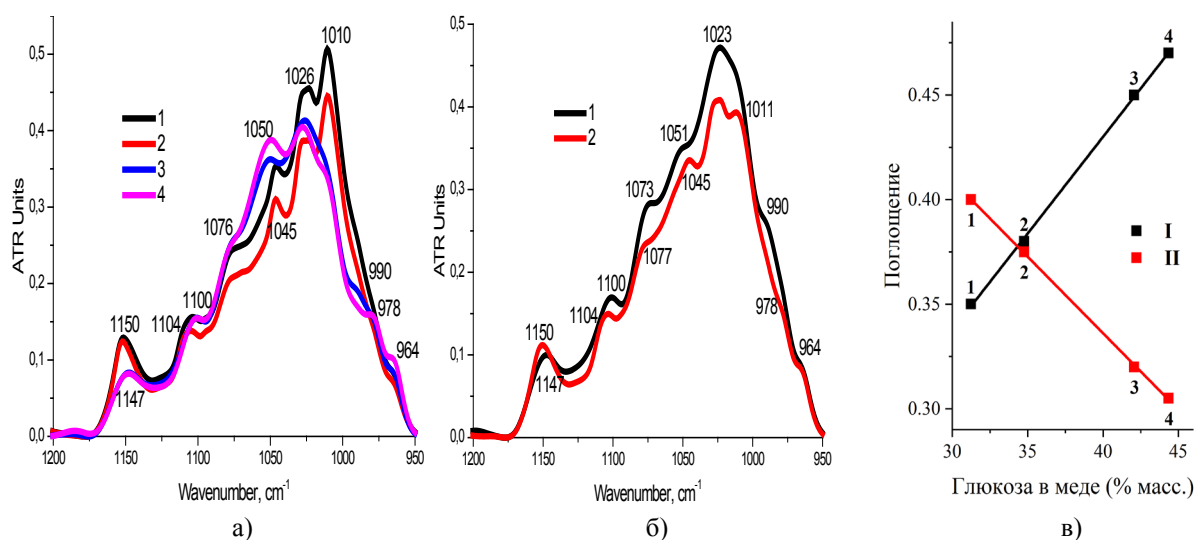


Рисунок 4. Фрагменты углеводной области ИК-спектров мёдов: а) 1, 2 – гречишный, 3 – каштановый, 4 – акации; б) степной мёд: 1 – жидкий, 2 – закристаллизованный; в) Зависимость интенсивности полос поглощения: I – 1010 cm^{-1} (глюкозы), II – 1050-1045 cm^{-1} (фруктозы) от содержания глюкозы в мёде: 1 – акации, 2 – каштановый, 3 – гречишный, 4 – степной

от ее спектра. В спектре фруктозы регистрируются характеристические полосы: 1175, 1076, 976 cm^{-1} и дублет полос 1147/1134 cm^{-1} . Остальные полосы в спектрах глюкозы и фруктозы очень близки по положению, либо накладываются друг на друга.

Следует отметить, что в отличие от моносахаридов, ИК-спектры дисахаридов (рис. 3б) очень близки по сложной фактуре рисунка и отличаются, в основном, интенсивностью полос. Формирование структуры дисахарида во многом нивелирует индивидуальность оптических свойств обоих моносахаридов, которые проявляются в основном в составе сложных тройных полос и дублетов.

Для ИК-спектров обоих сахаров характерны два дублета 1170/1160 и 1012/1003 cm^{-1} , две тройные полосы в области 1125 и 1050 cm^{-1} и полоса 988 cm^{-1} . Их анализ показывает, что в ИК-спектрах сахаров полосы глюкозы и фруктозы могут входить как в состав тройных полос в области 1050 и 1125 cm^{-1} , так и сложной полосы области 1000 cm^{-1} . Следует отметить, что полоса 1048–1050 cm^{-1} является общей для всех сахаридов. Рисунок 4 иллюстрирует фрагменты углеводной области ИК-спектров образцов исследуемых мёдов, представляющих собой сложные многокомпонентные гетерополисахаридные системы растительно-животного происхождения, основу которых на 80–90 % составляют природные комплексы глюкозы и фруктозы.

И, как следует из сопоставления с рисунками 3а и 3б, их ИК-спектры кардинально отличаются от спектров как моно, так и дисахаридов. Однако физическая природа моносахаридов, несмотря на заметные сдвиги полос, адекватно проявляется в спектрах мёдов положением соответствующих им характеристических полос. На рисунке 4а представлены спектры двух основных групп монофлерных мёдов: кривые 1 и 2 – гречишные мёды разного районирования, группа I с повышенным содержанием глюкозы; каштановый (кр. 3) и акации белой (кр. 4), отнесенные к группе II с характерным преобладанием фруктозы в составе.

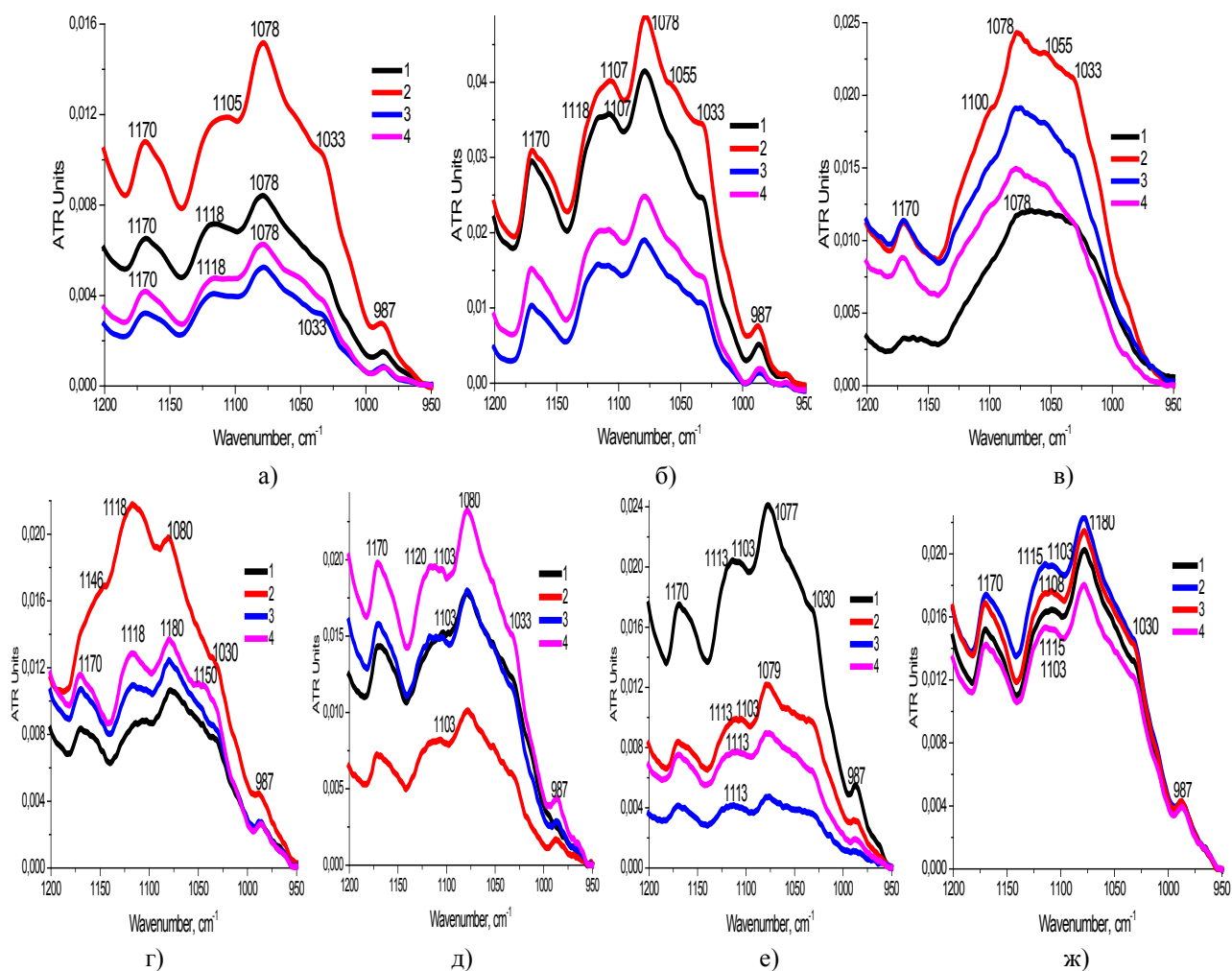


Рисунок 5. Фрагменты углеводной области ($1200\text{--}950\text{ см}^{-1}$) ИК-спектров сахарных кривых плазмы крови с провоцирующей нагрузкой: а) свекловичный сахар, №2; мед: б) степной, №3; в) гречишный, №4; г) каштановый, №5; д) акации-2, № 8; е) "холостая", №1; ж) Стевиазид, №9 (цифрами 1-4 обозначены номера контрольных точек)

По характеру спектров обоих гречишных мёдов, отличающихся только интенсивностью полос, видно, что глюкоза проявляет себя наиболее интенсивной полосой при 1010 см^{-1} , которая в спектрах каштанового и акациевого мёдов отсутствует, но на правой ветви их углеводной полосы в этой области имеются прогибы в виде плеча. Для фруктозы в составе мёда характерна полоса $1048\text{--}1050\text{ см}^{-1}$. Она присутствует в спектрах обоих мёдов второй группы. В спектрах гречишных мёдов полоса фруктозы тоже достаточно хорошо проявлена, но она смещена в более низкочастотную область (в положение 1045 см^{-1}) и меньше по интенсивности. В области $1020\text{--}1030\text{ см}^{-1}$ находится плавающая полоса, присутствующая в спектрах всех мёдов, обусловленная валентными колебаниями С-О-группировок, и являющаяся характерной для всех полисахаридов растительного и животного происхождения [28, 29].

Исследование влияния процесса кристаллизации на изменение оптических свойств показано на примере степного мёда (рис. 4б). Сопоставление спектральных кривых 1 и 2 показывает, что в результате кристаллизации полоса с максимумом 1023 см^{-1} (С-О) дифференцируется с образованием полосы 1011 см^{-1} (С-О-С-связи) характерной для циклической формы кристаллической α -D-глюкозы. При этом становится более проявленной полоса фруктозы при 1045 см^{-1} , что наблюдалось и в спектрах обоих закристаллизованных гречишных мёдов. Обращает на себя внимание то, что на правой ветви углеводной полосы в спектрах всех исследуемых мёдов в виде небольших плечей проявляют себя глюкоза (990 см^{-1}) и фруктоза (978 и 964 см^{-1}). На линейную связь интенсивности полос, идентифицированных для моносахаридов, от содержания глюкозы в мёде указывают зависимости, представленные на рисунке 4в.

Фрагменты углеводной области ИК-спектров плазмы крови для сахарных кривых с различными провоцирующими нагрузками, полученных в разное время года, представлены на рисунке 5.

Как следует из представленных данных, общий характер спектральных кривых заметно отличается от спектров мёдов. Однако структура правой ветви углеводной полосы, независимо от природы и агрегатного состояния провоцирующей нагрузки, отвечает ее структуре, характерной для жидких мёдов (рис. 4б) – во всех случаях полоса глюкозы ($1009\text{--}1011\text{ см}^{-1}$) оказывается сглаженной. Различия в форме и интенсивности полосы для контрольных точек 1 (спектральные кривые 1) всех сахарных кривых также указывает на заметную разницу

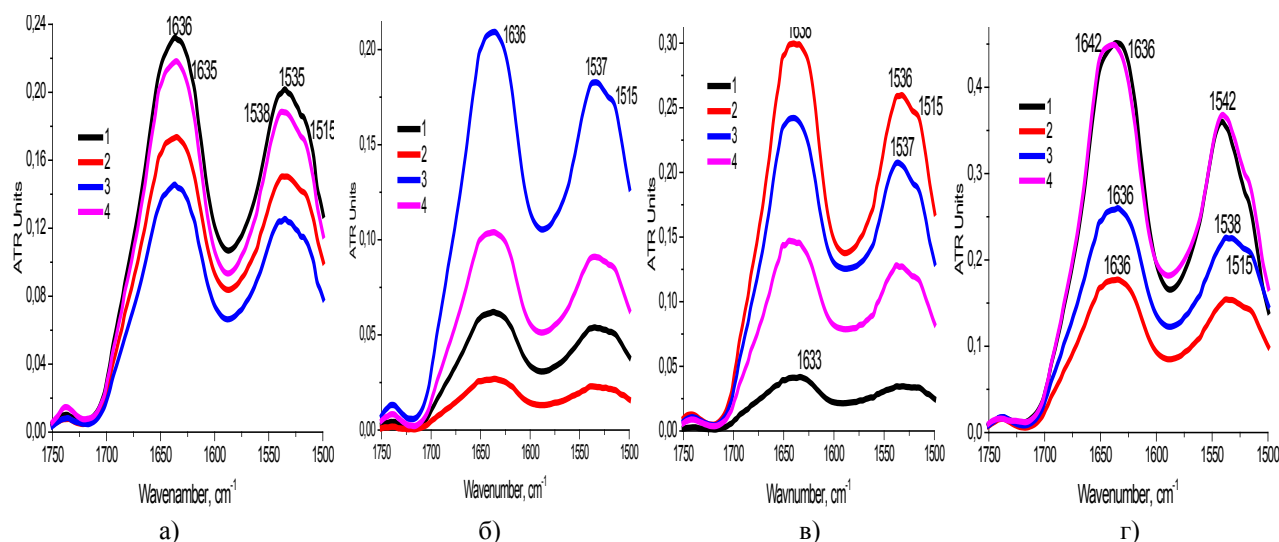


Рисунок 6. Фрагменты протеиновой области ($1750\text{--}1500\text{ см}^{-1}$) ИК-спектров общих белков для сахарных кривых: а) свековчнный сахар, № 2, б) мед каштановый, № 5, в) медакации, № 8, г) "Стевиозид", № 9 (цифрами 1-4 обозначены номера контрольных точек)

в количественном составе компонентов плазмы крови, взятой натощак, что, возможно, отчасти и проявляется в спектрах последующих точек (2–4), завися, по-видимому, не только от типа провоцирующей нагрузки, но и от состава немного ослабленной пищевой диеты.

Сахарные кривые с нагрузкой свековичным сахаром (рис. 5а) и полифлерным степным медом (рис. 5б) получены в осенний период (сентябрь–ноябрь), через три месяца после окончания медикаментозного лечения [24] с соблюдением безуглеводной диеты. Несмотря на близость рисунка спектральных кривых и последовательности их расположения, в зависимости от принадлежности к соответствующей контрольной точке, динамика в изменении их интенсивности разная. В обоих случаях прием нагрузки (контрольная точка 2) приводит к изменению формы полосы при 1125 см^{-1} и смещению ее максимума в положение 1110 см^{-1} , отвечающего проявлению глюкозы. В спектрах плазмы крови для последующих контрольных точек 3 и 4 максимум полосы снова смещается в более длинноволновую область – 1125 см^{-1} . Это можно объяснить удалением через 80 минут из кровотока глюкозы и более выраженным проявлением фруктозы. Сахарные кривые при нагрузке монофлерными гречишным (рис. 5в, № 4) и каштановым (рис. 5г, № 5) медами, снятые в период с февраля по апрель на ослабленной безуглеводной диете, более заметно отличаются как от полифлерного меда, так и между собой. Для сахарной кривой № 4 отмечен резкий подъем спектра после приема нагрузки и затем плавное его снижение. Необычную форму имеют и сами спектральные кривые, обусловленные сглаженной полосой глюкозы. Для сахарной кривой № 5 (каштановый мед, рис. 5г) также наблюдался резкий подъем спектра в контрольной точке 2, но с формированием интенсивного максимума при 1140 см^{-1} , который принадлежит фруктозе и сохраняется при последующем снижении интенсивности всей углеводной полосы. Следует отметить, что, в отличие от сахарной кривой № 4 (рис. 5в), все спектры для контрольных точек 1, 3 и 4 сахарной кривой № 5 имели обычную форму.

Сахарная кривая № 8, с медом акации-2 в качестве нагрузки (рис. 5д), была получена на той же диете, но с введением в утренний рацион (за 2 месяца до ее снятия) обязательной чашки кофе с ложкой меда ("метаболический тренинг"), в расчете на метаболическую память организма. Можно полагать, что ожидания в определенной мере оправдались. Прием в качестве провоцирующей нагрузки удвоенной порции меда акации, резким снижением интенсивности углеводной полосы во второй точке сахарной кривой № 8 показал высокую скорость выхода ее из кровотока.

Спектры сахарной кривой без провоцирующей нагрузки № 1 (рис. 5е) также показали периодичность в изменении содержания углеводов в плазме крови, хотя не отвечали периодичности изменения уровня глюкозы, полученной при биохимическом анализе. Структура углеводной полосы, в общем, отвечала рассмотренным ранее кривым с провоцирующими нагрузками. Характер изменения ИК-спектров сахарной кривой № 9 со Стевиозидом (рис. 5ж), близкой по данным биохимического анализа к кривой № 1, указывает на то, что применение безуглеводного подсластителя влияет на обменные процессы, стабилизируя углеводный состав плазмы крови.

Менее наглядно проявляется влияние природы продукта-провокатора и в спектральных характеристиках общего белка, выделенного из плазмы осаждением 96 % этанолом (рис. 6). Отмечено, что экстремальный характер изменения интенсивности полос, обусловленных колебаниями карбонильных групп пептидной связи белков Амид-I (1660 см^{-1}) и Амид-II (1540 см^{-1}) [27], для рассмотренных сахарных кривых практически не воспроизводится по положению положительных и отрицательных экстремумов в контрольных точках 2–4. Также не замечено связи в динамике изменения интенсивности белковых (рис. 5а, г, д, ж) и углеводных полос в спектре плазмы для этих же сахарных кривых.

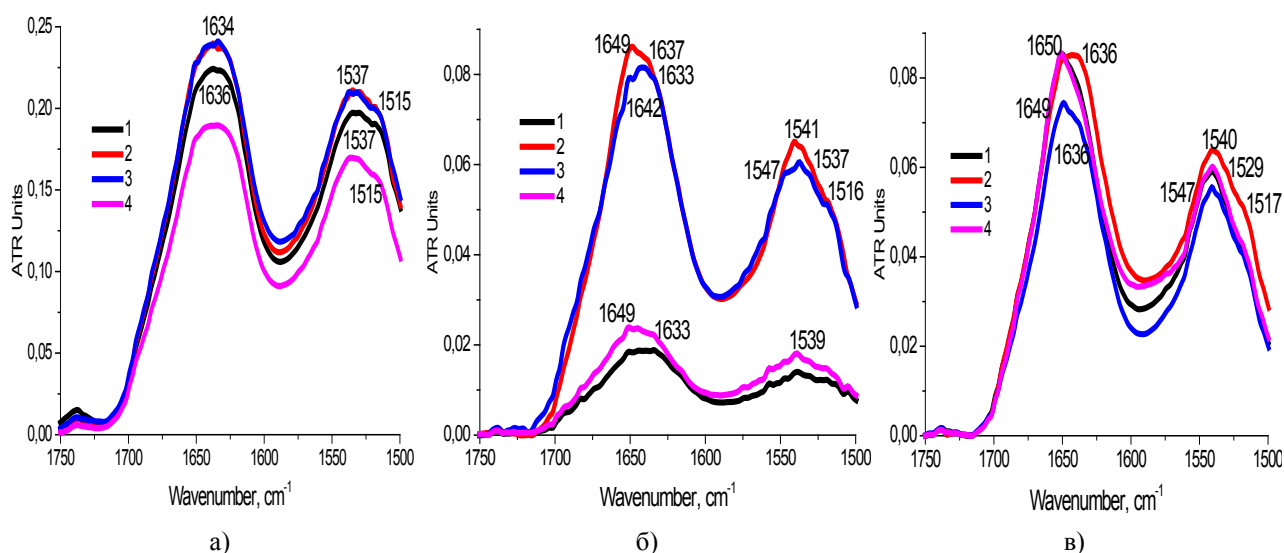


Рисунок 7. Фрагменты протеиновой области (1750–1500 cm^{-1}) ИК-спектров белков сахарной кривой № 1: а) общий белок, б) глобулины, в) альбумины (цифрами 1-4 обозначены номера контрольных точек)

Менее выраженная, чем у углеводов, информативность ИК-спектров суммарных белков в определенной мере может быть связана с разной скоростью обменных процессов для белков разных категорий и их периодичностью, а также соотношением разных белковых фракций в составе плазмы в определенный момент времени, поскольку полосы белков Амид-I и Амид-II спектрально представляют их пул. Так как сахарные кривые снимались в течение 9 месяцев, очевидно не следует забывать и о том, что обновление разных белков, как и других компонентов тканей и органов, происходит постоянно и с разной периодичностью.

Известно [30], что гормон инсулин, вырабатываемый в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, имеет белково-полипептидную природу. Его мономер состоит из двух полипептидных цепей А и В, связанных дисульфидными мостиками. Сродство инсулина к рецептору определяет вторичная структура обеих цепочек. В плазме инсулин находится как в свободном, так и в двух формах связанного с белками состояниях, отличающихся скоростью метаболизма. Свободный инсулин действует на все инсулинчувствительные ткани, связанный – только на жировую и мышечную ткани, увеличивая проницаемость клеточных мембран для глюкозы. Активность обеих форм, обусловленная структурно-конформационными различиями, предопределяет разнообразное участие инсулина в биохимических процессах всех органов и тканей, но главной его функцией является регулирование поглощения глюкозы клетками.

В связи с этим, представляло интерес оценить возможность регистрации спектрального проявления инсулина без мешающего влияния провоцирующей нагрузки. Рисунок 7 иллюстрирует фрагменты протеиновой области ИК-спектров суммарных белков, осажденных этанолом (а), а также глобулинов (б) и альбуминов (в), выделенных последовательным высаливанием Na_2SO_4 из плазмы крови "холостой" сахарной кривой № 1. Анализ фрагмента "а" рисунка показывает максимальное содержание суммарных белков во второй и третьей точке сахарной кривой, что отвечает кинетике изменения уровня глюкозы (табл. 2, рис. 2 сахарная кривая № 1) без изменения положения и формы широкой полосы Амид-I (1634-1636 cm^{-1}) и структурированной полосы Амид-II (1537 и 1515 cm^{-1}). Разделение глобулинов (б) и альбуминов (в) позволяет отметить различие в динамике изменения их содержания в плазме крови. Более стабильное для альбуминов и резкое изменение для глобулинов в зависимости от времени забора крови, которое также соответствует динамике изменения уровня глюкозы для сахарной кривой № 1, подтверждая известный факт, что основными переносчиками углеводов являются глобулины.

Обращает на себя внимание положение и форма максимумов для спектральных кривых второй точки на обоих фрагментах рисунка (б, в). В спектре глобулинов асимметричный максимум полосы Амид-I смещен в положение 1650 cm^{-1} . Поскольку такую форму полоса белков может приобретать в присутствии полипептидных структур [28], есть основания пролагать, что таким образом проявляется пептидная природа инсулина, осаждаемого совместно с глобулинами плазмы. Напротив, в спектре альбуминов (в) для второй точки сахарной кривой, уширенный максимум Амид-I смещен из положения 1650 в положение 1637 cm^{-1} . Для остальных точек сахарной кривой его положение отвечает 1650 cm^{-1} . Уширение максимума, в данном случае, можно объяснить присутствием инсулина, связанного с альбуминами, одной из основных функций которого является транспорт длинноцепочечных жирных кислот. Следует заметить, что профиль действия инсулина подвержен значительным колебаниям как у различных людей, так и у одного и того же человека.

ВЫВОДЫ

Данные, полученные при проведении параллельных исследований методами рефрактометрии, биохимического анализа и ИКС НПВО серии мёдов разного ботанического вида, препаратов моносахаридов и

природных пищевых дисахаридов, позволило идентифицировать полосы поглощения, обусловленные проявлением глюкозы и фруктозы в ИК-спектрах плазме крови человека, полученной методом сахарных кривых с использованием в качестве провоцирующей нагрузки моно и полифлерных видов меда и свекловичного сахара. Показано, что регулярное применение в небольших количествах меда с повышенным содержанием фруктозы оказывает эффект "тренировки" поджелудочной железы и клеточных рецепторов на присутствие глюкозы в "мягкой" провоцирующей нагрузке, отражая пролонгированную метаболическую память организма, что важно при диагностировании и постмедикаментозного лечения диабета второго типа.

Список литературы / References:

1. Агаджанян Н.А., Тель Л.З., Циркин В.И., Чеснокова С.А. *Физиология человека*. М.: Медицинская книга; Н. Новгород: Издательство НГМА, 2003, 526 с. [Agadzhanyan N.A., Tel L.Z., Tsikin V.I., Chesnokova S.A. *Human Physiology*. M.: Meditsinskaya kniga; N. Novgorod: Publishing House of NGMA, 2003, 526 p. (In Russ.)]
2. *Физиологические системы организма человека: справочное пособие*. Под ред. проф. Г.И. Козинца. М.: Триада-Х, 2000, 336 с. [*Physiological systems of the human body: a reference guide*. Edited by prof. G.I. Kozinets. M.: Triada-X, 2000, 336 p. (In Russ.)]
3. *Патофизиология крови*. Пер. с англ. М.; СПб.: «Издательство БИНОМ»-«Невский Диалект», 2000, 448 с. [*Blood pathophysiology*. Per. s engl. M.; St. Petersburg: "Publishing House BINOM" - "Nevsky Dialect", 2000, 448 p. (In Russ.)]
4. Фадеев П.А. *Сахарный диабет*. М.: ООО «Издательство Оникс», 2009, 208 с. [Fadeev P.A. *Sakharny diabet*. M.: ООО "Onyx Publishing House", 2009, 208 p. (In Russ.)]
5. Wu S.L. Staging of 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res.*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 2118-2120.
6. Дедов И., Шестакова М. *Сахарный диабет. Диагностика. Лечение. Профилактика*. М.: Медицинское информационное агентство, 2011, 808 с. [Dedov I., Shestakova M. *Diabetes mellitus. Diagnostics. Treatment. Prevention*. M.: Medical Information Agency, 2011, 808 p. (In Russ.)]
7. Vlassaua H., Cai W., Tripp E., Pyzik R., Yee K. et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Diabetologia*, 2016, vol. 59, no. 10, pp. 2181-2192.
8. Дедов И.И. Сахарный диабет опаснейший вызов мировому сообществу. *Вестник Российской академии медицинских наук*, 2012, № 1. с. 7-13. [Dedov I.I. Diabetes mellitus is the most dangerous challenge to the world community. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 1, pp. 7-13. (In Russ.)]
9. Нечипасова Д.И., Зацепина Е.Е., Ивашев М.Н. Сахарный диабет 2-го типа или пандемия XXI века. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2013, № 6, с. 73-74. [Nechipasova D.I., Zatsepina E.E., Ivashov M.N. Type 2 diabetes mellitus or the pandemic of the XXI century. *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2013, no. 6, pp. 73-74. (In Russ.)]
10. Сунцов Ю.И., Болотская Л.Л., Маслова О.В. и др. Эпидемиология сахарного диабета и прогноз его распространенности в Российской Федерации. *Сахарный диабет*, 2011, № 1, с. 15-18. [Suntsov Yu.I., Bolotskaya L.L., Maslova O.V., etc. Epidemiology of diabetes mellitus and prognosis of its prevalence in the Russian Federation. *Diabetes mellitus*, 2011, no. 1, pp. 15-18. (In Russ.)]
11. Гурьева И.В. Общее руководство международной диабетической федерации по сахарному диабету 2 типа (краткое изложение). *Сахарный диабет*, 2007, № 4, с. 54-56. [Guryeva I.V. General Guidelines of the International Diabetes Federation on Type 2 Diabetes mellitus (summary). *Diabetes mellitus*, 2007, no. 4, pp. 54-56. (In Russ.)]
12. Бирюкова Е.В. Сахарный диабет 2 типа: от сахароснижающей терапии к редотвращению развития осложнений. *Эффективная фармакотерапия*, 2014, № 46, с. 16-21. [Biryukova E.V. Type 2 diabetes mellitus: from hypoglycemic therapy to prevent the development of complications. *Effective pharmacotherapy*, 2014, no. 46, pp. 16-21. (In Russ.)]
13. Wu S.L. Staging of 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res.*, 2015, vol.14, no. 1, pp. 2118-2120.
14. Аметов А. *Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения*. Учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, том 5, 288 с. [Ametov A. *Type 2 diabetes mellitus. Problems and solutions*. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2016, vol. 5, 288 p. (In Russ.)]
15. Унижук В.И., Унижук Н.А. *Лечение мёдом*. М.: Издательский дом МСП, 2006, 128 с. [Unizhuk V.I., Unizhuk N.A. *Treatment with honey*. M.: Publishing House of MSP, 2006, 128 p. (In Russ.)]
16. Хорн Х., Люлльманн К. *Всё о мёде: производство, получение, экологическая чистота и сбыт*. М.: АСТ: Астрель; 2011, 316 с. [Horn H., Lullmann K. *All about honey: production, production, ecological purity and sales*. Moscow: AST: Astrel; 2011, 316 p. (In Russ.)]
17. Никонова Л.В., Тишковский С.В., Гулинская О.В., Дорошкевич И.П. *Диетотерапия при сахарном диабете. Пособие для студентов лечебного, медико-психологического, медико-диагностического факультетов и врачей*. Гродно: ГрГМУ, 2011, 96 с. [Nikonova L.V., Tishkovsky S.V., Gulinskaya O.V., Doroshkevich I.P. Diet therapy for diabetes. A manual for students of medical, medical-psychological, medical-diagnostic faculties and doctors. Grodno: GRSMU, 2011, 96 p. (In Russ.)]
18. Sarmiento R.A., Antonio J.P., de Miranda I.L., Nicoletto B.V., de Almeida C.J. Eating patterns and health outcomes in patients with type 2 diabetes. *Endocrins Society*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 42-52.

19. Srividya P., Renuga Devi T.S., Gunasekaran S. FTIR spectral study on diabetic blood samples-mono the rapy and combination therapy. *OJP*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 17-26.
20. Носенко Т.Н., Ситникова В.Е., Олехнович Р.О., Успенская М.В. Выявление сахарного диабета II типа методами инфракрасной спектроскопии и мультивариантного анализа сыворотки крови. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*, 2019, т. 19, № 2, с. 202-208. [Nosenko T.N., Sitnikova V.E., Olekhovich R.O., Uspenskaya M.V. Detection of type II diabetes mellitus by methods of infrared spectroscopy and multivariate analysis of blood serum. *Scientific and Technical Bulletin of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2019, vol. 19, no. 2, pp. 202-208. (In Russ.)]
21. Кишкун А.А. *Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 976 с. [Kishkun A.A. *Clinical laboratory diagnostics: textbook*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 976 p. (In Russ.)]
22. Корякина И.Ю., Эммануэль Ю.В. Лабораторные диагностики и мониторинг сахарного диабета. *Клиническая лабораторная диагностика*. М.: Медицина, 2002, № 5, с. 25-35. [Koryakina I.Yu., Emanuel Yu.V. Laboratory diagnostics and monitoring of diabetes mellitus. *Clinical laboratory diagnostics*, Moscow: Meditsina, 2002, no. 5, pp. 25-35. (In Russ.)]
23. *Клиническая лабораторная диагностика: учебник* Под ред. В.В. Долгова. М.: ФГБОУ ДПО РМАПО, 2016, 668 с. [*Clinical laboratory diagnostics: textbook* Edited by V. V. Dolgov. M.: FGBOU DPO RMAPO, 2016, 668 p. (In Russ.)]
24. Нечипоренко А.П., Нечипоренко У.Ю., Ситникова В.Е. Фурье-спектроскопия в исследовании плазмы крови с диабетом второго типа. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*, 2021, т. 21, № 1, с. 52-64. [Nechiporenko A.P., Nechiporenko U.Yu., Sitnikova V.E. Fourier spectroscopy in the study of blood plasma with type 2 diabetes. *Scientific and Technical Bulletin of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2021, vol. 21, no. 1, pp. 52-64. (In Russ.)]
25. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. *Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2 Белки. Ферменты. Витамины*. СПб.: Университет ИТМО, 2015, 106 с. [Shleikin A.G., Skvortsova N.N., Blandov A.N. *Biochemistry. Laboratory practice. Part 2 Proteins. Enzymes. Vitamins*. St. Petersburg: ITMO University, 2015, 106 p. (In Russ.)]
26. Тарасевич Б.Н. *Основы ИК спектроскопии с преобразованием Фурье. Подготовка проб в ИК спектроскопии*. М.: МГУ. 2012, 22 с. [Tarasevich B.N. *Fundamentals of IR spectroscopy with Fourier transform. Sample preparation in IR spectroscopy*. Moscow: MSU. 2012, 22 p. (In Russ.)]
27. Тарасевич Б.Н. *ИК спектры основных классов органических соединений*. Справочные материалы. М.: МГУ. 2012, 55 с. [Tarasevich B.N. *IR spectra of the main classes of organic compounds*. Reference materials. Moscow: MSU. 2012, 55 p. (In Russ.)]
28. Нечипоренко А.П., Миневиц И.Э., Нечипорено У.Ю., Ситникова В.Е., Громова Д.А. Пептид-полисахаридные комплексы слизей ламинарии, корня алтея, семян льна. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*, 2020, вып 1 (43), № 1, с. 3-17. [Nechiporenko A.P., Minevich I.E., Nechiporeno U.Yu., Sitnikova V.E., Gromova D.A. Peptide-polysaccharide complexes of kelp slime, marshmallow root, and flax seeds. *Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment*, 2020, iss. 1 (43), no. 1, pp. 3-17. (In Russ.)]
29. Нечипоренко А.П., Миневиц И.Э., Орехова С.М., Ситникова В.Е., Громова Д.А., Успенская М.В. Инфракрасная Фурье-спектроскопия в сравнительном исследовании животных и растительных белков. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020, т. 10, № 4, с. 678-690. [Nechiporenko A.P., Minevich I.E., Orekhova S.M., Sitnikova V.E., Gromova D.A., Uspenskaya M.V. Infrared Fourier spectroscopy in the comparative study of animal and plant proteins. *Izvestiya vuzov. Applied Chemistry and Biotechnology*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 678-690. (In Russ.)]
30. Балаболкин М.И., Петунина Н.А., Тельнова М.Э., Клебанова Е.М., Антонова К.В. Роль инсулиновой терапии в компенсации сахарного диабета. *РМЖ*. 2007, т. 15, № 27 (308), с. 2072–2077. [Balabolkin M.I., Petunina N.A., Telnova M.E., Klebanova E.M., Antonova K.V. The role of insulin therapy in the compensation of diabetes mellitus. *RMZH*, 2007, vol. 15, no. 27 (308), pp. 2072-2077. (In Russ.)]

EFFECT OF NATURAL SACCHARIDES ON THE FOURIER SPECTRUM OF HUMAN BLOOD PLASMA

Nechiporenko A.P.¹, Veso O.S.², Nechiporenko U.Yu.³, Plotnikova L.V.², Sitnikova V.E.¹, Plotnikov P.P.²¹ National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics*Kronverksky ave., 49, St. Petersburg, 197101, Russia*² St. Petersburg State University*Universitetskaya Embankment, 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: ljusta@mail.ru*³ Independent Laboratory «INVITRO SPb.»*Blagodatnaya str., 18, St. Petersburg, 196106, Russia*

Abstract. The effect of honey of various botanical species, food sugars, and the vegetable sweetener Stevioside on glucose tolerance and the rate of its withdrawal from the bloodstream was studied by IR spectroscopy of disturbed total internal reflection and biochemical analysis as a provoking load. The study of blood plasma for glucose content was carried out by the method of glyceemic (sugar) curves at 4 points of blood collection in a female donor who underwent a drug course of treatment at the initial stage of prediabetes of the second type. Preliminary research by methods of refractometry and biochemical analysis of preparations of monosaccharides (glucose, fructose), food disaccharides (beet and cane sugar) and honey with different ratios of monosaccharides (steppe, buckwheat, chestnut, white acacia) made it possible to identify the manifestation of bands caused by glucose and fructose in the IR spectra of blood plasma and the manifestation of the metabolic memory of the body on the seasonal composition of the food diet.

Key words: *human blood plasma, honey, saccharides, Fourier IR spectroscopy.*