

## Применение биофлавоноида диквертина в комплексной терапии сахарного диабета типа 2

Л.В. Недосугова

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Прогрессирование распространенности сахарного диабета типа 2 (СД) приобрело характер "неинфекционной эпидемии" и, по прогнозам экспертов ВОЗ, число больных СД типа 2 должно удвоиться за период с 1997 по 2025 г. со 143 до 380 млн человек [1]. Течение СД осложняется развитием специфических сосудистых осложнений, так называемых микроангиопатий, и бурным прогрессированием атеросклероза, приводящего к сердечно-сосудистой летальности больных СД в 4–5 раз чаще по сравнению с общей популяцией. Тяжесть СД типа 2 со временем усугубляется не только прогрессированием микро- и макроангиопатий, но и нарастанием инсулиновой недостаточности, приводящей к необходимости заместительной инсулинотерапии. По данным статистики, ежегодно 5–10% больных СД типа 2 нуждаются в переводе на инсулинотерапию. Таким образом уже через 10–20 лет от начала болезни каждый больной СД типа 2 нуждается в инсулине. В настоящее время общепризнана роль хронической гипергликемии в развитии диабетических сосудистых осложнений и все больше появляется данных, подтверждающих повреждающий эффект "глюкозотоксичности" на секреторные возможности инсулярного аппарата. Механизмы повреждающего действия хронической гипергликемии остаются во многом неясными, однако предполагается, что важную роль в развитии этих нарушений играют свободные радикалы, образующиеся при аутоокислении глюкозы. Мощный цитотоксический эффект свободных радикалов, используемых природой для уничтожения патогенных микроорганизмов и собственных дефектных клеток-мутантов, таит в себе потенциальную опасность, поскольку неконтролируемая утечка свободных радикалов может привести к необратимым повреждениям молекул липидов, белков и нуклеиновых кислот. Именно поэтому в живом организме существуют регуляторные механизмы, ограничивающие накопление этих высокотоксичных продуктов: это естественные антиоксиданты, такие как витамины С, Е, глутатион и антиоксидантные ферменты (каталаза, супероксиддисмутаза – СОД и глутатионпероксидаза – ГП). Чрезмерное накопление свободных радикалов, приводящее к развитию окислительного стресса, при СД может быть обусловлено, с одной стороны, самоокислением глюкозы в условиях гипергликемии и с другой – снижением активности антиоксидантной защиты. Патогенез СД типа 2, по современным представлениям, обусловлен двумя ключевыми нарушениями: развитием инсулинорезистентности периферических тканей-мишеней и неадекватной секрецией инсулина, необходимой для преодоления барьера резистентности к инсулину. Оба этих дефекта взаимно усиливают друг друга: за счет компенсаторной гиперинсулинемии усугубляется инсулинорезистентность, а за счет снижения чувствительности к инсулину возрастает потребность в секреции инсулина [2]. Развивающаяся в итоге гипергликемия, вызывающая окислительный стресс за счет аутоокисления глюкозы, приводит к повреждению фосфолипидного слоя плазматических мембран тканей-мишеней и b-клеток, способствуя прогрессированию инсулинорезистентности и снижению секреторных возможностей инсулярного аппарата за счет апоптоза b-клеток. Уменьшая выраженность окислительного стресса с помощью антиоксидантной терапии, теоретически можно не только замедлить прогрессирование диабетических сосудистых осложнений и инсулиновой недостаточности, но и снизить резистентность клеток к инсулину, способствуя тем самым лучшей компенсации углеводного обмена.

Многочисленные исследования посвящены изучению ангиопротекторных и антиоксидантных свойств природных флавоноидов, в том числе и при диабетической микро- и макроангиопатии [3, 4]. В исследованиях Robak и Gryglewsky (1988 г.) показано, что природные флавоноиды в отличие от антиоксидантов нефлавоноидной природы оказывают более выраженное действие за счет того, что не только "улавливают" свободные радикалы кислорода, его так называемые активные формы (АФ), но и благоприятно влияют как на сосудистую стенку, так и на систему гемостаза [4]. Отсюда понятен тот огромный интерес, который проявляется сегодня к природным флавоноидам, в частности к изучению их ангиопротекторных свойств.

Флавоноиды являются полифенолами растительного происхождения. Особенности антиоксидантного действия этих веществ состоят в том, что они могут инактивировать не только гидропероксидный ( $LO_2\bullet$ ) и алкоксильный ( $LO\bullet$ ) липидные радикалы, но и супероксидный анион-радикал ( $O_2\bullet^-$ ) [5]. Наличие антирадикальных свойств у экстрактов некоторых растений основывается на том, что химическая структура флавоноидов содержит ароматическое кольцо и присоединенные к нему ОН-группы, которые способны тормозить процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) на стадии кислородной инициации и передачи электронов с одной активной формы на другую [6]. Возможным механизмом утилизации кислородных радикалов является способность гидроксильного соединения флавоноидов отдавать атом водорода и связывать более токсичные соединения, нейтрализуя их таким образом [7]. Фенольными антиоксидантами принято называть любые соединения  $Ar(OH)_n$ , в которых одна или несколько гидроксильных групп (ОН) соединены с ароматическим ядром (Ar), при этом молекулы могут содержать несколько фрагментов  $Ar(OH)_n$ . Анализ сравнительной активности флавоноидов показал, что очень важным является наличие двух гидроксильных групп в ортоположении в В-кольце и гидроксильной группы в позиции С-3 [6]. В реакции  $ArOH + RO_2\bullet + ArO_2\bullet + ROOH$  не отмечается исчезновения свободной валентности, а имеет место только замена гидропероксидного радикала  $RO_2\bullet$  феноксильным  $ArO_2\bullet$ , однако при этом достигается эффект ингибирования свободнорадикального окисления, обусловленный большей стабильностью  $ArO_2\bullet$ , который практически не участвует в продолжении цепей окисления. Флавоноиды могут восстанавливать активность L-токоферола, отдавая атом водорода L-токоферольному радикалу [7], последний формируется, когда отдает свой собственный атом водорода из гидроксильной группы пероксильному радикалу, таким образом прерывая цепочку ПОЛ. Также возможным механизмом действия флавоноидов может быть хелатация ионов металлов Fe и Cu. Дигидрокверцетин (ДКВ; диквертин – естественный препарат производства ОАО завод экологической техники и экопитания "ДИОД", Москва) представляет собой 3, 3', 4', 5', 7-пентагидроксифлавонон, который получают из измельченной древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.). По химическому строению ДКВ является соединением, родственником кверцетину, и представляет собой его гидрированный по гетероциклическому фрагменту аналог. Кроме того, ДКВ по своим химическим свойствам является активным антиоксидантом [8], т.е. веществом, связывающим свободные радикалы. В работе В.К. Колхира и соавт. (1995 г.) выявлены капилляропротекторные и антиоксидантные свойства ДКВ (превосходящие в ряде случаев эффект кверцетина), сочетающиеся с противовоспалительным, гастро- и гепатопротекторным, гиполипидемическим и диуретическим действием [9]. Вероятно, он обладает прямой антирадикальной активностью, преимущественно за счет взаимодействия с липидными радикалами. В то же время ДКВ, как и кверцетин, является сквенджером супероксидных анионов [8]. Как вещество, обладающее высокой степенью биологической активности, ДКВ оказывает ряд положительных эффектов на обменные реакции и динамику патологических процессов. Его способность снижать в крови содержание липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [2] позволяет рассматривать производные ДКВ как профилактические и лечебные средства против атеросклероза. Отмечена способность препарата ингибировать окисление липосомальной мембраны из яичных фосфолипидов, индуцированное сульфатом железа или системой  $Fe^{2+}$ -аскорбат. Причем антиокислительная активность ДКВ сравнима с активностью а-токоферола. Также установлено, что таксифолин, аналог ДКВ, ингибировал АР в хрусталике крыс, а также накопление сорбитола в эритроцитах человека [3].

Ранее нами продемонстрирована способность природного биофлавоноида диквертина подавлять активность процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов и тромбоцитов пациентов с СД типа 2, что проявлялось в снижении содержания малонового диальдегида (МДА) в клеточной мембране, повышением активности ключевых антиоксидантных ферментов СОД, каталазы и

ГП в эритроцитах, снижением агрегационной активности тромбоцитов, связанной с уменьшением содержания кальция в кровяных пластинках и продукции тромбосана [10]. Применение диквертина в комплексной терапии пациентов с СД типа 2 способствовало снижению активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника в эритроцитарной мембране и повышению продукции NO, определяемой по уровню нитритов и нитратов в плазме пациентов [11, 12]. Все это убедительно доказывает положительное влияние ДКВ на функциональную активность форменных элементов, реологию крови и на эндотелиальную дисфункцию при СД, что способствует замедлению прогрессирования диабетических сосудистых осложнений, как это было показано нами на примере диабетической препролиферативной ретинопатии у пациентов с СД типа 2 [12]. Однако наиболее эффективным результатом применения диквертина по сравнению с другими антиоксидантами явилось значимое снижение уровня HbA1c на 7% от исходного ( $p < 0,05$ ), без изменения дозы сопутствующей сахароснижающей терапии [10]. Все изложенное побудило нас исследовать возможные эффекты действия диквертина на чувствительность к инсулину и секреторные возможности инсулярного аппарата, сопоставив их с антиоксидантной активностью препарата. Цель настоящего исследования – изучение влияния дигидрокверцетина (диквертина) на оксидантный статус, чувствительность к инсулину и секреторные возможности у больных СД типа 2.

Материалы и методы  
В исследование были включены 40 предварительно компенсированных (HbA1c  $6,69 \pm 0,2\%$ ) пациентов (16 мужчин и 24 женщины) в возрасте  $56,2 \pm 8,5$  года с длительностью СД  $0,4 \pm 0,12$  года. Индекс массы тела (ИМТ) составлял  $33,3 \pm 6,3$  кг/м<sup>2</sup>. Случайным образом участников исследования рандомизировали либо в группу, в течение 12 нед дополнительно к пероральной сахароснижающей терапии (метформин в суточной дозе 2000–2500 мг) получавшую диквертин в суточной дозе 120 мг, либо в группу сравнения (антиоксидантная терапия не проводилась). В качестве контроля обследовали 20 здоровых добровольцев сопоставимых по возрасту, не имевших указаний на нарушение толерантности к углеводам и наличие СД у родственников.

До начала и в конце исследования контролировали HbA1c на приборе DCA 2000 Analyzer ("Bayer") методом латексного ингибирования иммуоагглютинации с помощью Hemoglobin A1c Reagent Kit. Липиды сыворотки крови определяли ферментативным методом с помощью наборов Берингер–Манхайм. Содержание вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов – МДА – в ЛПНП определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при 532 нм на приборе "Hitachi-557" [13].

Для оценки чувствительности к инсулину до и после курса антиоксидантной терапии мы использовали расчетные математические модели HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) [14] и ISI (Insulin Sensitivity Index) [15], которые, по мнению большинства исследователей, наиболее четко коррелируют с "золотым стандартом" при оценке инсулиновой чувствительности – "euglycemic clamp technic" [16].

Для оценки секреторных возможностей инсулярного аппарата использовали индекс базальной секреции инсулина – ISecrHOMA [14] и индекс высвобождения инсулина – InsulinoGenic Index (IGI), определяемый по соотношению площади под кривой инсулинового ответа к площади под кривой колебаний гликемии в ходе перорального глюкозо-толерантного теста (ОГТТ) [15]. Уровень ИРИ определяли радиоиммунологическим анализом с помощью наборов "Иммунотек" (Венгрия). Статистическую обработку производили на компьютере с использованием специального статистического пакета "SPSS 9.0" (SPSS Inc., США). Для определения достоверности различий между сравниваемыми группами использовали t-критерий Стьюдента. Достоверность динамических изменений исследуемых параметров до и после лечения определяли с помощью непараметрических методов вариационного анализа (критерий Вилкоксона). Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Все средние значения в таблицах представлены в виде  $M \pm m$ .

Результаты и обсуждение

Как указывалось выше, больных включали в исследование только при условии стабильного достижения удовлетворительной компенсации углеводного и липидного обмена в соответствии с критериями European Diabetes Policy Group (1998 г.). Вместе с тем, несмотря на удовлетворительные показатели углеводного и липидного обмена у больных СД типа 2 сохраняется дислипидемия, проявляющаяся в гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии, наряду с повышением содержания ЛПНП и снижением уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) по сравнению с донорами ( $p < 0,001$ ; табл. 1). Назначение природных флавоноидов приводило к достоверному снижению МДА в липопротеинах плазмы, снижению холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) практически до уровня контроля (см. табл. 1).

Выявленная нами нормализация липидного спектра крови, проявившаяся в достоверном снижении ХС, ТГ и повышении ЛПВП на фоне снижения ЛПНП ( $p < 0,05$ ), свидетельствует о гиполипидемическом действии препарата, что подтверждает данные K. Igatachi и соавт. [5], выявивших снижение ЛПНП в плазме крови и печени крыс под воздействием ДКВ. Известно, что при окислительном стрессе свободнорадикальное окисление липидов, ведущее к накоплению липопероксидов, ингибирует ключевой фермент катаболизма ХС в печени – микросомальную 7 $\alpha$ -гидроксилазу [17], что нарушает ферментативную регуляцию катаболизма ХС и должно приводить к поддержанию его стабильно высокого уровня в крови. В этих условиях гепатоциты могут секретировать в кровяное русло липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), включающие окисленные ЛПНП, которые подвергаются окислительной деструкции с образованием МДА. Возможно, блокирование свободнорадикального окисления липидов с помощью флавоноидов, что проявляется значимым снижением образования МДА, снимает токсическое действие липопероксидов на печеночную 7 $\alpha$ -гидроксилазу и тем самым способствует повышению катаболизма ХС и повышению ЛПВП, а также снижению печеночной продукции ЛПОНП.

При лечении пациентов, страдающих СД типа 2, диквертином получено достоверное снижение HbA1c с  $6,69 \pm 0,15$  до  $6,124 \pm 0,096\%$  ( $p < 0,01$ ), сопровождавшееся улучшением гликемического контроля, по данным базальной и постпрандиальной гликемии, что может быть обусловлено снижением продукции активных форм кислорода при компенсации углеводного обмена и, как следствие, уменьшением образования КПНГ, к которым относится и HbA1c. Вместе с тем снижение базальной гликемии без изменения дозы сопутствующей сахароснижающей терапии, как показано в табл. 2, предполагает повышение чувствительности периферических тканей и, в первую очередь, печени к циркулирующему инсулину, что и обуславливает, по нашему мнению, снижение глюконеогенеза и базальной гликемии. Исходя из этого предположения, мы рассчитали чувствительность к инсулину двумя методами – HOMA-IR и ISI [14, 15]. Чтобы исключить вариабельность изменений, оценку чувствительности к инсулину провели одновременно с ОГТТ, на фоне проведения которого пациенты продолжали прием базовой сахароснижающей терапии. Как видно из представленных в табл. 2 данных, получено достоверное снижение индекса инсулинорезистентности (IR) по модели HOMA с  $3,05 \pm 0,39$  до  $1,61 \pm 0,25$  ( $p < 0,005$ ) и повышение индекса чувствительности к инсулину ISI с  $87,3 \pm 14,1$  до  $128,2 \pm 24,1$  ( $p < 0,05$ ). В группе сравнения таких изменений не наблюдалось (рис. 1).

Для подтверждения взаимосвязи выраженности окислительного стресса и инсулинорезистентности мы провели корреляционный анализ между уровнем вторичного продукта ПОЛ – МДА в ЛПНП и индексом инсулинорезистентности HOMA-IR. Мы получили прямую корреляцию между уровнем МДА в ЛПНП и индексом HOMA-IR с коэффициентом корреляции  $r = 0,755$  ( $p < 0,005$ ). Таким образом, снизив проявления окислительного стресса с помощью антиоксиданта флавоноидного ряда диквертина (ДКВ), мы одновременно получили и снижение инсулинорезистентности, достоверно коррелирующее со снижением выраженности окислительного стресса.

В группе пациентов, получавших диквертин в комбинации с метформином, мы отметили достоверное снижение HbA1c на 7% от исходного ( $p < 0,05$ ) без изменения дозы сопутствующей сахароснижающей терапии. Механизм такого положительного влияния диквертина на углеводный обмен может быть связан со снижением инсулинорезистентности периферических тканей, выявленной нами при расчете индекса инсулинорезистентности HOMA, что косвенно подтверждается и снижением индекса базальной секреции инсулина, рассчитанного по этому методу. Нам показалось интересным выявить эффект антиоксиданта флавоноидного ряда диквертина на секреторные возможности инсулярного аппарата. С этой целью пациентам, достигшим компенсации углеводного обмена на фоне приема метформина, мы провели ОГТТ с определением концентрации инсулина исходно (натощак) и через 1 и 2 ч после приема глюкозы.

После проведения ОГТТ пациентам был назначен диквертин в суточной дозе 120 мг. Через 3 мес приема диквертина ОГТТ повторили. Уровни гликемии и инсулинемии определяли в те же временные интервалы. Как видно из данных, представленных в табл. 3 и на рис. 2, после 3-месячного курса диквертина было достигнуто достоверное повышение ( $p < 0,05$ ) стимулированной секреции инсулина, выраженной в процентах по сравнению с базальным уровнем ИРИ. При этом уровень базальной инсулинемии по сравнению с исходным снизился ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о снижении инсулинорезистентности периферических тканей. При расчете индекса высвобождения инсулина, определяемого по отношению площади под кривой инсулинового ответа (AUCинс) к площади под кривой изменения гликемии (AUCглюк) в ходе ОГТТ, мы получили достоверное повышение индекса высвобождения инсулина (IGI) ( $p < 0,01$ ). Для выяснения возможной взаимосвязи окислительного стресса и функционального состояния  $\beta$ -клетки, мы провели оценку корреляции улучшения секреторных возможностей инсулярного аппарата по проценту возрастания уровня ИРИ на пике всасывания глюкозы (через 1 ч) со снижением выраженности окислительного стресса, определяемого по уровню МДА в ЛПНП плазмы наших пациентов, выявленных на фоне применения диквертина. Полученная нами обратная корреляция  $r = -0,411$  ( $p < 0,05$ ) между процентом прироста ИРИ и снижением МДА, на наш взгляд, свидетельствует о положительном влиянии диквертина на секреторные возможности инсулярного аппарата за счет удаления активных форм кислорода и снижения проявлений окислительного стресса, ведущего к апоптозу  $\beta$ -клеток. Возможным механизмом утилизации кислородных радикалов является способность гидроксильного соединения флавоноидов отдавать атом водорода и связывать более токсичные соединения, нейтрализуя их [7]. Как указывалось выше, для активности флавоноидов очень важным является наличие двух гидроксильных групп в ортоположениях в В-кольце и гидроксильной группы в позиции С-3 [6]. У нового флавоноида диквертина присутствуют гидроксильные группы в этих положениях. Наши данные совпали с данными ряда авторов [18] и могут свидетельствовать о том, что полигидроксилированные англиконовые флавоноиды являются мощными ингибиторами ПОЛ, подчеркивая еще раз значение гидроксильной группы во флавоновом ядре. Гидроксильная группа в положении 7 диссоциирует первой и является главным местом атаки пероксильным радикалом [7, 18]. В составе диквертина есть гидроксильная группа в позиции 7. Таким образом, обобщая полученные данные, можно сделать вывод о наличии несомненных антиоксидантных свойств у отечественного биофлавоноида диквертина, при применении которого происходит снижение риска прогрессирования диабетических ангиопатий, улучшаются гликемический контроль и чувствительность к инсулину. Вместе с тем включение в комплексную терапию антиоксиданта диквертина способствовало повышению секреторных возможностей инсулярного аппарата, что позволяет надеяться на сохранение остаточной секреции инсулина при длительном применении антиоксидантной

#### Литература

1. World Health Organisation: "The World Health Report 1998. Life in 21st Century – a Vision for ALL" Geneva: World Health Organisation, 1998.
2. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 177–269.
3. Haraguchi H, Ohmi L, Fukuda A et al. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61 (4): 651–4.
4. Robak J, Gryglewsky RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 837–42.
5. Igarashi K, Uchid J, Murakami N, et al. Effect of astilbin tea from leaves of *Engelhardtia chrysolepis* on the serum and liver lipid concentration and on the erythrocytes and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biothechnol. Biochem* 1996; 60 (3): 513–5.
6. Middleton Elliott et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells. Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52 (Issue 4): 673–751.
7. Медведев Ю.В., Толстой А.Д. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма. М.: ООО "Терра-Календер и Промоушн", 2000.
8. Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки. *Вопросы питания*. 1996; 2: 33–8.
9. Колхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. и др. Диквертин – новое антиоксидантное и капилляропротекторное средство. *Хим.-фарм. журн.* 1995; 9: 61.
10. Недосугова Л.В., Волковой А.К., Рудько И.А. и др. Сравнительная оценка эффективности биофлавоноидов Диквертина и Танакана в комплексной терапии сахарного диабета 2 типа. *Клин. фармакол. и тер.* 2000; 4: 65–7.
11. Балаболкин М.И., Белоярцева М.Ф., Недосугова Л.В. и др. Влияние биофлавоноидов на интенсивность свободнорадикального окисления и активность  $Na^+/H^+$ -обменника у больных сахарным диабетом типа 2. *Сахарный диабет*. 2003; 3: 43–51.
12. Балаболкин М.И., Недосугова Л.В., Рудько И.А. и др. Применение антиоксидантов флавоноидного ряда в лечении диабетической ретинопатии при сахарном диабете типа 2. *Пробл. эндокринол.* 2003; 49 (3): 3–6.
13. Ланкин В.З. Метаболизм липоперекисей в тканях млекопитающих. *Биохимия липидов и их роль в обмене веществ*. М.: Наука, 1981; 75–95.
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–9.
15. Matsuda A, DeFronzo R. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 1999; 22: 1462–70.
16. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: E214–E223.
17. Ланкин В.З., Котелевцева Н.В. Степень окисленности мембранных фосфолипидов и активность микросомальной системы гидроксилирования холестерина в печени животных при атерогенезе. *Вопр. мед. хим.* 1981; 27 (1): 133–6.
18. Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1335: 335–42.