

ВЛИЯНИЕ БИОФЛАВОНОИДНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ФАСОЛИ И МЕТФОРМИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У КРЫС НА МОДЕЛИ ИНСУЛИННЕЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

В. А. Рыбак, Л. Н. Малоштан

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Поступила в редакцию

Аннотация. Изучено влияние биофлавоноидного комплекса из фасоли и метформина на показатели углеводного обмена у интактных животных и у животных с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом. Установлено, что биофлавоноидный комплекс из фасоли не оказывал существенного влияния на показатели углеводного обмена – гликогенообразовательную функцию печени, гликолиз и глюконеогенез у интактных животных по сравнению с контролем. На фоне лечения животных со стрептозотоциновым диабетом биофлавоноидным комплексом из фасоли наблюдалась нормализация углеводного обмена за счет восстановления гликогенообразовательной функции печени и гликолиза, нормализации гексокиназной реакции, а также снижения глюконеогенеза в печени. Биофлавоноидный комплекс из фасоли является перспективным фитопрепаратом для коррекции углеводного обмена при СД 2-го типа за счет проявления инсулиноподобного действия.

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет, гликоген, гексокиназа, глюкозо-6-фосфатаза, фруктозо-1.6-дифосфатаза, метформин, биофлавоноидный комплекс из фасоли.

Abstract. The effect of the bioflavonoid beans complex on carbohydrate metabolism in the intact animals and in the animals of streptozotocin-induced diabetes model has been studied. It has been established that a thick bioflavonoid beans complex had no significant influence on carbohydrate metabolism – glycogen-producing liver function, glycolysis and gluconeogenesis in the normal animals compared to the control ones. The normalization of carbohydrate metabolism due to the recovery of glycogen-producing liver function and glycolysis, the normalization of hexokinase reaction, as well as hepatic gluconeogenesis reductions have been observed in streptozotocin-induced animal models of diabetes during the treatment to the animals with a thick bioflavonoid beans complex. Bioflavonoid beans complex is a promising phytopreparation for the correction of carbohydrate metabolism in the diabetes type 2 due to the manifestations of an insulin action.

Keywords: streptozotocin diabetes, glycogen, hexokinase, glucose-6-phosphatase, fructose-1.6-diphosphatase, metformin, bioflavonoid beans complex.

Организация Объединенных Наций определила сахарный диабет (СД) как хроническое, подрывающее здоровье и дорогостоящее заболевание, сопряженное с тяжелыми осложнениями, несущее серьезную угрозу семьям, странам и миру в целом, представляющее существенное препятствие на пути достижения согласованных мировым сообществом целей развития.

По заболеваемости СД достиг масштабов глобальной эпидемии, повлекшей огромные человеческие, социальные и экономические потери. На сегодняшний день в мире насчитывается свыше 366 млн. больных СД [1].

Существуют многочисленные данные о нарушении функции печени у больных СД. Считают, что печень разрушает гликоген при помощи специального фермента инсулиназы, осуществляет процессы, обуславливающие развитие осложнений

СД, а именно ожирение, ретино-, нейро- и нефропатии, сердечно-сосудистые заболевания [2, 3].

Критерием, характеризующим состояние метаболизма углеводов, является определение активности ключевых ферментов гликолиза и глюконеогенеза – процессов, нарушающихся в первую очередь при инсулиновой недостаточности (ИН) [4]. В регуляции гликолиза и глюконеогенеза большую роль играет инсулин. При недостаточном содержании инсулина развивается СД, сопровождающийся гипергликемией, глюкозурией и уменьшением содержания гликогена в печени [5]. Печень утрачивает способность утилизировать глюкозу крови. В печени, при общем снижении интенсивности биосинтетических процессов (синтез белков, жирных кислот из продуктов распада глюкозы) наблюдается усиление синтеза ферментов глюконеогенеза [6].

При введении инсулина больным СД происходит коррекция метаболических изменений – нормализуется проницаемость мембран клеток печени для глюкозы, восстанавливается соотношение между гликолизом и глюконеогенезом. Инсулин контролирует эти процессы на генетическом уровне как индуктор синтеза ключевых ферментов гликолиза: гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, а также индуцирует синтез гликогенсинтазы. Одновременно инсулин действует как репрессор синтеза ключевых ферментов глюконеогенеза. Индукторами синтеза ферментов глюконеогенеза служат глюкокортикоиды. В связи с этим, при ИН и сохраненной или повышенной секреции кортикостероидов (особенно при СД), устранение влияния инсулина приводит к резкому повышению синтеза и концентрации ферментов глюконеогенеза, особенно фосфоенолпируват-карбоксикиназы, что определяет возможность и скорость глюконеогенеза в печени и почках [7].

Развитие СД отрицательно сказывается на функциональном состоянии печени, приводит к нарушению обмена белков, жиров и других веществ в гепатоцитах, что обуславливает развитие хронических заболеваний печени [8].

Несмотря на достаточно широкий арсенал современных антидиабетических средств, проблема реальной компенсации СД 2-го типа остается нерешенной, что обосновывает поиск и создание новых, эффективных и одновременно малотоксичных антидиабетических средств, объединяющих в своей фармакодинамике несколько видов активностей.

Целью исследования явилось изучение влияния биофлавоноидного комплекса из фасоли и метформина на показатели углеводного обмена у крыс на модели инсулиннезависимого стрептозотоцинового диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учитывая клиническую и патогенетическую гетерогенность СД, поиск новых эффективных гипогликемических препаратов необходимо проводить с учетом экспериментально-биологических моделей, отражающих основные звенья диабетогенеза у человека.

Экспериментальные исследования по изучению влияния биофлавоноидного комплекса из фасоли и метформина на показатели углеводного обмена (гликогенообразовательную функцию печени, гликолиз и глюконеогенез) были проведены в две серии. В первой серии исследований изучали показатели углеводного обмена у интактных животных, а во второй – у животных со стрептозотоциновым диабетом с одновременным введением никотинамида. В основе создания модели инсулиннезависимого СД лежит частичная защита панкреатических бета-клеток от цитотоксического действия стрептозотоцина при помощи соответствующих доз никотинамида. Стрептозотозин – антибиотик (2-дезоксид-2-метилнитрозаминкарбонил-амино-D-глюкопираноза), оказывающий специфический эффект на панкреатические бета-клетки. Вероятно, фрагмент нитрозомочевины отвечает за токсическое действие препарата, а 2-дезоксиглюкоза – за селективность эффекта по отношению к бета-клеткам [9].

Никотинамид вводили внутрибрюшинно в дозе 230 мг/кг массы тела крысам линии Вистар за 15 мин до внутривенной инъекции стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг, что приводило к умеренной и стабильной базальной гипергликемии и 40% сохранению запасов панкреатического инсулина [11, 12].

После моделирования стрептозотоцинового диабета и лечения животных метформином и биофлавоноидным комплексом из фасоли, крыс декапитировали, проводили частичную гепатэктомию (методом Хиггинса-Андерсона), определяли в печени количество гликогена (методом Крисмана), ключевых ферментов: гликолиза – гексокиназу (энзиматическим методом); глюконеогенеза – глюкозо-6-фосфатазу (методом Свенсона) и фруктозо-1,6-дифосфатазу (методом Пейкит и Поуджел) [13, 14, 15].

Активность фермента выражали в мкмоль НАДФН⁺ в расчете на 1 г ткани за одну мин действия фермента.

Все животные (массой 200-250 г) двух серий исследований были разделены на 3 группы (по 7 в каждой). Животные 1 группы (контроль) – внутрижелудочно получали эквивалентное количество питьевой воды, 2 группы – препарат сравнения метформин в дозе 30 мг/кг, а 3 группы – биофлавоноидный комплекс из фасоли в дозе 40 мг/кг.

Исследования проводили в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике и «Общих этических принципов экспериментов на животных», что соответствуют положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, что используются для экспериментальных и других научных целей» [9, 10]. Статистическую обработку полученных результатов проводили методами дисперсионного анализа при помощи программы «Statistica, v.6,0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование стрептозотоцинового диабета у животных позволяет воспроизвести главные патогенетические признаки СД 2-го типа у человека, а именно – нарушение секреции и действия инсулина имеет определенные преимущества для исследования сахароснижающего эффекта новых препаратов с разным механизмом действия [16].

К группе препаратов, способных снижать инсулинорезистентность, можно отнести производные гуанидина – бигуаниды. Наибольший интерес среди них вызывает метформин. Механизм сахароснижающего действия метформина связан с подавлением глюконеогенеза в печени, снижением повышенной продукции глюкозы печенью и инсулинорезистентности. Метформин способствует значительному снижению гликемии натощак в связи с повышением под его воздействием чувствительности гепатоцитов к инсулину, угнетением в печени процессов глюконеогенеза и гликолиза, а также увеличением синтеза гликогена. Метформин снижает продукцию глюкозы из аланина, пирувата, лактата, глутамина и глицерола. Это происходит вследствие торможения поступления перечисленных субстратов глюконеогенеза в гепатоциты и ингибирования его ключевых ферментов – пируваткарбоксилазы, фруктозо-1,6-бифосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы [17, 18].

Некоторые растения семейства бобовых содержат производные гуанидина (изоамилenguанидин, амилenguанидин, азгинин и др.), которые

являются основами и действуют по типу бигуанидов [19].

Таким образом, повышение продукции глюкозы печенью представляет собой один из основных факторов, ответственных за развитие гипергликемии как натощак, так и после еды. Поэтому, исследования в области создания лекарственных препаратов, влияющих на механизмы усиления глюконеогенеза, являются перспективными.

В связи с дефицитом глюкозы у животных с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом уменьшается количество гликогена в печени в 2.1 раза по сравнению с интактным контролем (табл. 1).

Содержание гликогена в печени резко снижается на высоте развития стрептозотоцинового диабета в сравнении с интактным контролем и существенно повышается после введения препарата сравнения метформина и биофлавоноидного комплекса из фасоли.

Препарат сравнения метформин достоверно повышал уровень гликогена в печени в 1.1 раза, а биофлавоноидный комплекс из фасоли – в 1.2 раза соответственно в сравнении с интактным контролем.

Лечение животных с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом биофлавоноидным комплексом из фасоли повысило уровень гликогена в печени в 1.8 раза соответственно и приближалось к показателям интактного контроля, а метформином – в 1.6 раза соответственно в сравнении с диабетическим контролем.

Таблица 1

Влияние биофлавоноидного комплекса из фасоли на уровень гликогена в печени у крыс на модели стрептозотоцинового диабета ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), (n=7)

№ п/п	Группы животных	Гликоген в печени (в мг на 1 г ткани)
Интактные животные		
1.	Контроль	23.5±0.42
2.	Метформин (30 мг/кг)	26.9±0.39**
3.	Биофлавоноидный комплекс из фасоли (40 мг/кг)	28.4±0.77**
Диабетические животные		
1.	Контроль	11.3±0.12*
2.	Метформин (30 мг/кг)	18.±0.16*/***
3.	Биофлавоноидный комплекс из фасоли (40 мг/кг)	19.9±0.23*/***/****

Примечание: * – $p_1 < 0.001$; ** – $p_1 < 0.01$ – достоверно по отношению к интактному контролю; *** – $p_2 < 0.001$ – достоверно по отношению к диабетическому контролю; **** – $p_3 < 0.001$ – достоверно по отношению к метформину.

Введение интактным животным препарата сравнения метформина и биофлавоноидного комплекса из фасоли не привело к значительным изменениям гексокиназной активности.

Лечение животных со стрептозотоциновым диабетом биофлавоноидным комплексом из фасоли способствовало значительному повышению гексокиназной активности в 3.1 раза, а метформином – в 2.5 раза соответственно в сравнении с диабетическим контролем (табл. 2).

Результаты исследований показали, что биофлавоноидный комплекс из фасоли на модели стрептозотоцинового диабета у крыс нормализует гексокиназную реакцию, сопровождающуюся снижением процессов фосфорилирования глюкозы в печени, а также восстанавливает уровень гексокиназы к показателю интактного контроля.

При изучении влияния метформина и биофлавоноидного комплекса из фасоли на изменение ключевых ферментов глюконеогенеза установлено, что показатели активности глюкозо-6-фосфатазы и фруктозо-1.6-дифосфатазы существенных отличий от показателей интактных животных не имели.

У диабетических животных наблюдалось увеличение активности глюкозо-6-фосфатазы в 2.1 раза и фруктозо-1.6-дифосфатазы в 2.3 раза по сравнению с интактным контролем в связи с дефицитом инсулина.

Лечение диабетических животных биофлавоноидным комплексом из фасоли свидетельствовало о выраженном снижении активности глюкозо-6-фосфатазы в 2.0 раза, а фруктозо-

1.6-дифосфатазы в 2.2 раза соответственно в сравнении с животными диабетического контроля. Метформин проявил менее выраженную активность, чем биофлавоноидный комплекс из фасоли, что проявлялось снижением активности глюкозо-6-фосфатазы в 1.3 раза, а фруктозо-1.6-дифосфатазы в 1.7 раза соответственно в сравнении с животными диабетического контроля.

ВЫВОДЫ

Таким образом, биофлавоноидный комплекс из фасоли не оказывал существенного влияния на показатели углеводного обмена – гликогенообразовательную функцию печени, гликолиз и глюконеогенез у интактных животных по сравнению с контролем.

На фоне экспериментального диабета, индуцированного стрептозотоцином, биофлавоноидный комплекс из фасоли нормализовал образование гликогена в печени у животных до уровня, приближающегося к показателям интактного контроля; способствовал повышению скорости гексокиназной реакции и преобладал над действием препарата сравнения метформина в 1.2 раза, а также влиял на глюконеогенез – снижал уровень маркерных ферментов – глюкозо-6-фосфатазы в 1.6 раза и фруктозо-1.6-дифосфатазы в 1.3 раза по сравнению с метформином.

Следовательно, биофлавоноидный комплекс из фасоли является перспективным фитопрепаратом для коррекции углеводного обмена при СД 2-го типа за счет проявления инсулиноподобного действия.

Таблица 2

Влияние биофлавоноидного комплекса из фасоли и метформина на гликолиз и глюконеогенез в печени у крыс ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), (n=7)

№ п/п	Группы животных	Активность ферментов		
		Гексокиназа	Глюкозо-6-фосфатаза	Фруктозо-1.6-дифосфатаза
		в мкМ НАДФН ₂ на 1 г ткани за 1 мин	в мкМ Рн на 1 г ткани за 1 мин	
Интактные животные				
1.	Контроль	0.54±0.011	3.21±0.005	4.00±0.007
2.	Метформин (30 мг/кг)	0.47±0.017***	3.37±0.003*	4.08±0.017**
3.	Биофлавоноидный комплекс из фасоли (40 мг/кг)	0.42±0.007*	3.43±0.004*	4.15±0.018*
Диабетические животные				
1.	Контроль	0.19±0.009*	674±0.011*	9.26±0.006*
2.	Метформин (30 мг/кг)	0.48±0.007**/****	5.30±0.006*/****	5.39±0.008*/****
3.	Биофлавоноидный комплекс из фасоли (40 мг/кг)	0.59±0.009**/****/****	3.31±0.009*/****/****	4.12±0.009*/****/****

Примечание: * – $p_1 < 0.001$; ** – $p_1 < 0.01$; *** – $p_1 < 0.05$ – достоверно по отношению к интактному контролю; **** – $p_2 < 0.001$ – достоверно по отношению к диабетическому контролю; ***** – $p_3 < 0.001$ – достоверно по отношению к метформину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Всемирный день диабета – 2013 в Украине: курс на диабетологическое просвещение и профилактику // Украинський медичний часопис. — 2013. — № 6 (98). — С. 20-21.
2. Білки, що зв'язують інсулін та контррецепторні білки сироватки крові хворих на цукровий діабет і здорових людей (огляд літератури та власні дані) / В.В. Корпачев [та ін.] // Ендокринологія. — 2004. — Т. 9, № 2. — С. 221-235.
3. Левицький А.П. Роль дисбіозу в розвитку порушень стану печінки щурів за умов алоксанового діабету // А.П. Левицький, Ю.В. Цісельський, О.Ю. Білик // Одеський медичний журнал. — 2012. — № 3 (13). — С. 11-14.
4. Городецкий В.Н. Патофизиология углеводного обмена (лекция) / В.Н. Городецкий // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 2. — С. 25-32.
5. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system / G. Van de Were [et al.] // Eur. J. Biochem. — 2000. — Vol. 267. — № 6. — P. 1533-1549.
6. Cefalu W.T. Steps Toward the Meaningful Translation of Prevention strategies for Type 2 Diabetes // Diabetes Care. — 2012. — Vol. 35. — P. 663-665.
7. Roadbard H.W. Diabetes screening, diagnosis, and therapy in pediatric patients with type 2 diabetes [online exclusive article] // Medscape J. Med. — 2008. — № 10. — P. — 184 (Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2562149>).
8. Родионова Л.И. Функциональное состояние печени при нарушениях углеводного обмена / Л.И. Родионова, О.О. Басиева // Российские медицинские вести. — 2007. — Т. 12, № 2. — С. 74-79.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекоменд. / За ред. чл.-кор. НАМН України О.В. Стефанова. — К.: Авіцена, 2001. — 528 с.
10. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. — UMS. — 2002. — P. 42-46.
11. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide [Text] / P. Masiello [et al.] // Diabetes. — 1998. — V. 47, 2. — P. 224-229.
12. Рыбак В.А. Вплив тривалого застосування густого екстракту квасолі на показники вуглеводного обміну у щурів з цукровим діабетом 2-го типу на тлі ожиріння / Рыбак В.А., Малоштан Л.М. // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2014. — № 4-5 (40). — С. 80-84.
13. Донченко Е.О. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов / Е.О. Донченко, А.А. Чиркин // Судебно-медицинская экспертиза. — 2010. — № 3. — С. 25-28.
14. Swansson M. Glucosae-6-phosphatase from liver / M. Swansson // J. Biol. Chem. — 1950. — V. 184, № 2. — P. 647-652.
15. Paketa R., Pagell B.J. Fructosodiphosphatase in liver in studied rats / R. Paketa, B.J. Pagell // J. Biol. Chem. — 1965. — V. 240, № 2. — P. 651-662.
16. Klinkhammer C. Specific immunity to streptozotocin. Cellular requirements for induction of lymphoproliferation [Text] / C. Klinkhammer, P. Popowa H. Gleichmann // Diabetes. — 1988. — V. 37, № 1. — P. 74-80.
17. Дедов И.И. Сахарный диабет / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. — М.: Универсум Паблшинг. — 2003. — 455 с.
18. Каминский А.В. Сахарный диабет: новые взгляды и старые заблуждения / А.В. Каминский // Международный эндокринологический журнал. — 2012. — № 6 (46). — С. 50-53.
19. Сучасні аспекти пероральної фармакотерапії цукрового діабету 2 типу. Досягнення НФаУ. Монографія / В.П. Черних [та ін.]. — Харків: БУРУН і К, 2010. — 208 с.

Рыбак Виктория Анатольевна — к.б.н., доцент кафедры биологии Национального фармацевтического университета; e-mail: vitarybak@mail.ru

Малоштан Людмила Николаевна — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета.

Rybak Victoria A. — associate professor, Department of Biology, National University of Pharmacy; e-mail: vitarybak@mail.ru

Maloshtan Ludmila N. — doctor of biology, professor, Department of Physiology and Anatomy, National University of Pharmacy.