

Н.Ф. Федосова, С.В. Алисиевич, К.В. Лядов, Е.П. Романова, И.А. Рудько, А.А. Кубатиев

Кафедра общей патологии и патофизиологии (зав. каф. – акад. РАМН А.А. Кубатиев) Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ Москва

Изучали влияние дигидрокверцетина, 3.3.4.5.7-пентагидроксифлаванона, нового отечественного патентованного препарата, на функциональную активность полиморфноядерных нейтрофилов у больных сахарным диабетом 2 типа. Флавоноиды, как кверцетин, так и его производное – дигидрокверцетин, дозозависимым способом подавляли как генерацию анион-радикала и гипохлорной кислоты, так и образование МДА в процессе окисления мембран нейтрофилов. Дигидрокверцетин способен подавлять активность протеинкиназы С и миелопероксидазы в активированных полиморфно-ядерных нейтрофилов, а также связывать переходные материалы (Fe^{2+}), чем обусловлена его способность в условиях *in vitro* подавлять функциональную активность полиморфноядерных нейтрофилов больных сахарным диабетом 2 типа.

Ключевые слова: *нейтрофилы, сахарный диабет 2 типа, дигидрокверцетин, супероксидный анион-радикал, перекисное окисление липидов.*

В последние годы возрастает интерес исследователей к окислительному стрессу как одному из ключевых механизмов патогенеза заболеваний, в частности, возникновения и прогрессирования осложнений сахарного диабета 2 типа (СД2). Предметом пристального изучения являются полиморфно-ядерные нейтрофилы (ПМН) из-за их способности образовывать супероксидный анион-радикал (O_2^-) и другие АФК в системах NADPH-оксидазы и миелопероксидазы, а также в процессе окисления арахидоновой кислоты. Под влиянием СОД O_2^- восстанавливается в H_2O_2 , при разложении которой возникает гидроксил-радикал. Еще один мощный эндогенный окислитель – гипохлорная кислота (НОСl) – образуется в процессе активации ПМН под действием миелопероксидазы. H_2O_2 , O_2^- и НОСl, обладая антимикробным действием, в то же время оказывают повреждающее действие на эндотелий сосудов и участвуют в формировании инсулинорезистентности – основного патогенетического звена СД2.

Установление ангиотропности липидных перекисей привело к использованию антиоксидантов в терапии больных СД. Дигидрокверцетин - новый отечественный патентованный препарат, производимый из древесины лиственницы и являющийся по химическому строению гидрированным по гетероциклическому фрагменту аналогом кверцетина, оказывает антиоксидантное действие [2, 12]. Доступность дигидрокверцетина по сравнению с другими биофлавоноидами, а также не уступающее им антитромбоцитарное и капилляропротекторное действие [3], обуславливает перспективность его детального исследования для терапии СД.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния дигидрокверцетина на функциональную активность ПМН у больных СД2.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 12 мужчин, больных СД2, в возрасте 43-70 лет и 8 здоровых добровольцев того же возраста.

У всех больных отмечалась средняя тяжесть заболевания продолжительностью 10-29 лет. Больных обследовали после достижения удовлетворительной (в соответствии с критериями European Diabetes Police Group, 1993) компенсации углеводного обмена: уровень гликозилированного гемоглобина в крови менее 7,5%, который определяли методом латексного ингибирования иммуноагглютинации набором «Hemoglobin Alc Reagent Kit» («Boeringher Mannheim»).

Суспензию ПМН получали из цельной крови, стабилизированной 3,8% цитратом Na (в соотношении 9:1), градиентным центрифугированием на «Percoll» («Pharmacia») с двукратным промыванием и последующим суспензированием в буфере (120 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM глюкоза, 25 mM трис; pH 7,4). Число ПМН в суспензии составляло 11.1×10^6 кл/мл. Жизнеспособность нейтрофилов в суспензии по включению трипанового синего составляла 95 %.

При оценке антиоксидантных свойств флавоноидов дигидрокверцетин («Вилар») или кверцетин («Sigma») добавляли суспензию ПМН в конечной концентрации 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ и инкубировали 5 мин, перемешивая при 37°C.

Для стимуляции ПМН использовали форболмиристацетат (ФМА; «Sigma») в конечной концентрации 1 мкг/мл. ПМН инкубировали с ФМА в течение 15 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали на ледяной бане, а суспензию центрифуговали 10 мин при 800g. Образование O_2^- ПМН измеряли по реакции восстановления феррицитохрома С, ингибируемого СОД. С этой целью к 0,5 мл исследуемой суспензии, содержащей 10^6 ПМН, добавляли 0,6 мг цитохрома С и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. Поглощение цитохрома С измеряли в супернатанте при $\lambda = 550$ нм после добавления СОД (310 ЕД). Количество генерируемого O_2^- рассчитывали по количеству восстановленного цитохрома С (коэффициент абсорбции $21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Определение НОСl проводили путем хлорирования таурина [13]. Суспензию ПМН (10^6), активированных ФМА, инкубировали с 15 mM раствором таурина в 154 mM NaCl, pH 7,4 в течение 60 мин при 37 °С. К супернатанту добавляли 20 mM йодида калия и определяли абсорбцию при $\lambda=350$ нм. Коэффициент абсорбции составлял $22,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

ПОЛ индуцировали инкубацией ПМН с 0,01 mM FeSO₄ и 0.05 L(+) – аскорбиновой кислоты в течение 15 мин при 37 °С, после чего суспензию ПМН быстро замораживали. Об уровне ПОЛ судили по накоплению продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, выражая их в виде эквивалентного количества МДА, который определяли модифицированным спектрофлуориметрическим методом [14]. Уровень МДА выражали в относительных единицах флуоресценции в расчете на 10^6 ПМН.

Статистическую обработку результатов проводили методом парных и независимых выборок. Достоверность различий оценивали по *t* критерию Стьюдента. Результаты исследования выражали как $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генерация O_2^- и НОСІ неактивированными ПМН больных и здоровых добровольцев практически не определялась. Это, по-видимому, связано с тем, что исследуемые больные находились в состоянии компенсации углеводного обмена. После активации нейтрофилов ФМА наблюдалось усиление образования O_2^- и у больных, и у здоровых, однако у больных процесс был более интенсивным. При этом достоверных отличий в количестве НОСІ, образуемой ПМН больных и здоровых добровольцев, не выявлено. Исследуемые флавоноиды в зависимости от дозы подавляли образование O_2^- (табл. 1) и продукцию НОСІ (табл. 2) в ПМН, активированных ФМА с максимальным действие при концентрации 100 мкМ.

Таблица 1

Влияние кверцетин (КВ) и дигидрокверцетина (ДКВ) на генерацию супероксидных радикалов человеческими ПМН, активированными ФМА (нмоль O_2^- /1x10⁶ ПМН; $M \pm m$).

Группа		контроль	1 мкМ	10 мкМ	10 мкМ
Больные СД	ДКВ	15,3±0,9*	7,6±0,4**	6,1±0,3**	1,2±0,2**
	КВ		9,9±0,3**	6,0±0,5**	1,1±0,3**
Здоровые добровольцы	ДКВ	8,6±0,7	6,3±0,6	5,8±0,5**	1,0±0,2**
	КВ		6,0±0,4	5,7±0,5**	0,9±0,1**

Примечание. Здесь и в табл. 2: $p < 0,05$ * по сравнению со здоровыми добровольцами, ** с контролем.

** с

Таблица 2

Влияние КВ и ДКВ на образование гипохлорной кислоты человеческими ПМН, активированными ФМА, и на МДА, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат, ПМН ($M \pm m$)

Группа, показатель		контроль	1 мкМ	10 мкМ	10 мкМ
Образование гипохлорной кислоты, нмоль НОСІ/1x10 ⁶ ПМН					
Больные СД	ДКВ				
	КВ	118,3±6,2	109,6±5,4	83,1±4,7	39,2±5,1**
Здоровые добровольцы	ДКВ		110,1±6,3	85,3±5,5	41,3±4,3**
	КВ	110,0±4,2	109,3±2,6	85,6±2,5	41,0±3,2**
			107,6±2,9	89,7±3,5	40,9±3,8**
Образование МДА, отн. ед/10 ⁶ ПМН					
Больные СД	ДКВ	19,42±2,05*	17,16±2,41	14,56±2,30	2,34±1,12**
	КВ		17,32±2,33	16,70±2,53	2,41±1,37**
Здоровые добровольцы	ДКВ	12,05±2,73	10,55±2,16	9,88±2,05	2,03±1,32**
	КВ		11,16±2,29	10,36±2,42	2,45±1,21**

Необходимо отметить, что дигидрокверцетин и кверцетин в концентрациях 10 и 100 мкМ в одинаковой степени оказывали подавляющее действие на генерацию O_2^-

ПМН больных СД и здоровых лиц. Однако активированные ПМН больных были более чувствительны к действию флавоноидов в минимальной из изучаемых концентраций - 1 мкМ. Так, у больных СД ингибирование образования O_2^- ПМН под влиянием 1 мкМ дигидрокверцетина или кверцетина составляло 50 %, тогда как у здоровых лиц – лишь 35 %.

Дигидрокверцетин, как и кверцетин, дозозависимым образом подавлял накопление МДА в процессе ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат (табл. 2). Практически полное торможение накопления МДА как у больных СД, так и у доноров наблюдалось при концентрации дигидрокверцетина и кверцетина, равной 100 мкМ. Под влиянием дигидрокверцетина (10 мкМ) в ПМН больных СД образование МДА снижалось на 25 %, а под влиянием кверцетина (10 мкМ) – на 14 % по сравнению с контролем, тогда как у здоровых лиц – на 18 и 14 % соответственно.

Выявлено [6, 10] усиление образования O_2^- активированными ФМА ПМН больных СД2, по сравнению со здоровыми лицами. В то же время мы не обнаружили достоверных различий в количестве НОС1, образуемой ПМН больных и доноров после стимуляции ФМА, что, по-видимому, обусловлено снижением активности миелопероксидазы в ПМН при СД2. Как Я.А. Александровский [1], мы считаем, что причиной функционального напряжения ПМН при СД2 является длительная гипергликемия, которая вызывает повышение активности протеинкиназы С в нейтрофилах. Протеинкиназа С через фосфорилирование цитозольных компонентов NADPH-оксидазы приводит к ее активации, реализующейся в усиленной генерации свободных радикалов кислорода. Установлено, что активность протеинкиназы С возрастает при окислительном стрессе, вызываемом гипергликемией [7]. Известно, что ФМА взаимодействует с протеинкиназой С и тем самым активирует путь передачи сигнала с рецептора на участке после образования диацилглицерола и инозитолтрифосфата. Выявленное нами возрастание образования O_2^- ПМН больных в ответ на ФМА, по сравнению с донорами, позволяет предположить наличие при СД повышенной реактивности протеинкиназы С-зависимого пути активации NADPH-оксидазы. Необходимо отметить, что повышенная генерация O_2^- ПМН, стимулированных ФМА, сохраняется у больных даже при компенсации СД. Это позволяет предположить вовлечение также других механизмов в активацию системы NADPH-оксидазы.

Помимо воздействия протеинкиназы С, к активации NADPH-оксидазы нейтрофилов могут приводить и другие внутриклеточные процессы, в частности, усиленное высвобождение и окисление арахидоновой кислоты, а также повышенная мобилизация Ca^{2+} , которая наблюдается в ПМН больных СД2 [5]. Показано существование Ca^{2+} -независимого пути передачи сигнала и активации «респираторного взрыва», который зависит от изменения свойств мембраны в процессе активации фагоцитирующих клеток. У больных СД2 выявлено снижение вязкости мембраны ПМН [5], что, по-видимому, делает эти клетки более подверженными активации.

Другим подтверждением активированного состояния ПМН больных СД2 является увеличение уровня продуктов ПОЛ, выявленное нами, как в неактивированных ПМН больных, так и после их активации. Усиленное образование липидных радикалов в мембране ПМН больных СД2 может быть связано с активацией липоксигеназ и циклооксигеназ, катализирующих окисление арахидоната и других полиненасыщенных жирных кислот мембран клеток.

Флавоноиды подавляют как генерацию $O^{\cdot-}$ и $HOCl$, так и образование МДА в процессе окисления мембран нейтрофилов.

Антиоксидантное действие флавоноидов может быть обусловлено подавлением ферментов, участвующих в процессах образования радикалов, и «поглощением» радикалов [9, 15]. Так, кверцетин способен подавлять активацию протеинкиназы С в ПМЕ, препятствуя тем самым их активации [4]. Кроме того, кверцетин ингибирует фосфорилирование тирозина и активацию фосфолипазы D в активированных нейтрофилах [11]. Показано, что кверцетин является сильным ингибитором и миелопероксидазы как очищенного фермента, так и присутствующего в активированных ПМН, а также способен связывать $HOCl$, образующуюся системой миелопероксидаза – перекись водорода – хлор [8]. Можно предположить, что дигидрокверцетин способен, аналогично кверцетину, подавлять активность протеинкиназы и миелопероксидазы в активированных ПМН, чем обусловлено снижение генерации свободных радикалов кислорода ПМН под действием дигидрокверцетина.

Антиоксидантная активность флавоноидов может быть обусловлена также связыванием переходных металлов, которые вовлечены в превращение H_2O_2 в гидроксильный радикал (реакция Хабера-Вайса). Гидроксильный радикал активирует ПОЛ, нарушая вязкость и проницаемость клеточных мембран. Высказываются предположения, что образование комплексов флавоноидов с ионами металлов способствует предотвращению ПОЛ из-за ограниченного доступа ионов металлов к жирным кислотам фосфолипидов клеточных мембран [9]. Наши результаты подтверждают данное предположение, поскольку мы показали, что препараты ингибировали ПОЛ в мембране ПМН, индуцированное Fe^{2+} и аскорбатом, которые активируют свободнорадикальное окисление липидов мембран без участия АФК.

Итак, дигидрокверцетин, как и кверцетин, *in vitro* подавляет функциональную активность ПМН больных СД2. нельзя исключить, что в составе комплексной терапии больных СД2 дигидрокверцетин, снижая активацию ПМН, будет препятствовать развитию окислительного стресса и прогрессированию ангиопатий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александровский А.Я. // Биохимия. 1998. Т. 63, Вып. 11. С. 1470-1479.
2. Колхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. // Хим.-фарм. журн. 1995. № 9. С. 61-64.
3. Кубатиев А.А., Ядигарова З.Т., Тюкавкина Н.А. и др. // Вопр. биол. мед. и фарм. хим. 1999. № 3. С. 47-50.
4. Blackburn W.D., Neck L.W., Wallace R.W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. Vol. 144, N 3. P. 1129-1236.
5. Caimi G., Sinagra D., Canino B. et al. // Acta Diabetol. 2000. Vol. 37, N 1. P. 9-12.
6. Cantero M., Parra T., Conejo J. // Diabetes Care. 1998. Vol. 21, P. 326-327.
7. Ceriello A. // Diabet. Med. 1997. Vol. 14. P. S45-S49.
8. Pincemail J., Deby C., Thirion A. et al. // Experientia. 1988. Vol. 44, N 5. P. 450-453.
9. Robak J., Gryglewski R. // Pol. J. Pharmacol. 1996. Vol. 48, N 6. P. 554-564.
10. Shurtz-Swirski R., Sela S., Herskovits A. Et al. // Diabetes Care. 2001. Vol. 24, N 1, P. 104-110.
11. Takemura O., Banno Y., Nozawa Y. // Biochem. Pharmacol. 1997. Vol. 53, N 10. P. 1503-1510.
12. Tordera m., Ferrandiz M., Alcaraz M.J. // Z. Naturforsch [C]. 1994. Vol. 49, N 3-4. P. 235-240.
13. Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M. // J. Clin. Invest. 1982. Vol. 70. P. 598-607.
14. Yagi K. // Biochem. Med. 1976. Vol. 15. P. 212-216.
15. Zielinska M., Kostrewa A., Ignatowicz E., Budzianowski J. // Acta Biochim. Pol. 2001. Vol. 48, N 1. P. 183-189.