

УДК 615.252.349.7

К.Ц. Дуру, Е.Г. Ковалева, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте

ВЛИЯНИЕ ИЗОФЛАВОНОИДОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Изофлавоноиды (ИФ) растительного происхождения, обладающие антиоксидантной активностью, могут проявлять также антидиабетическое действие. Проведено исследование антидиабетического действия экстракта корня кудзу (*Pueraria lobata*), полученного с использованием природных глубоких растворителей и содержащего изофлавоноиды пуэарин, генистеин и дайдзеин в количестве 40 мг/г экстракта.

В эксперименте использовали 60 самцов крыс Wistar. Сахарный диабет 1 типа моделировали внутрибрюшинным введением раствора аллоксана из расчета 170 мг/кг. Экстракт ИФ вводили внутрижелудочно диабетическим и здоровым животным дозами 100 мг/кг и 200 мг/кг три раза в неделю (всего 12 введений). Введение ИФ диабетическим крысам сопровождалось коррекцией гипергликемии, повышением толерантности к глюкозе, нормализацией показателей функционального состояния различных органов (АСТ, АЛТ, мочевины, общего белка), способствовало восстановлению количества β -клеток и содержания в них инсулина, стимуляции пролиферативного процесса в панкреатических островках (количество $Ki67+$ клеток) и сопровождалось увеличением содержания инсулина в плазме крови. Дозозависимость проявлялась в более выраженном влиянии дозы ИФ 200 мг/кг на восстановление количества панкреатических островков, β -клеток и пролиферирующих клеток в островках и более значительным увеличением уровня инсулина в плазме крови по сравнению с дозой 100 мг/кг.

При введении ИФ здоровым животным не выявлено отклонения от нормы показателей гликемического контроля, цитолиза, не обнаружены изменения в островковом аппарате, что указывает на отсутствие токсического действия ИФ, экстрагированных с использованием природных глубоких растворителей.

Ключевые слова: изофлавоноиды, *Pueraria lobata*, диабет, панкреатический островок, гипергликемия

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Данилова Ирина Георгиевна

ig-danilova@yandex.ru

Дата поступления 27.10.2021 г.

Образец цитирования:

Дуру К.Ц., Ковалева Е.Г., Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Влияние изофлавоноидов на биохимические и морфометрические показатели крыс с аллоксановым сахарным диабетом. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2021, Том 18, №4, с. 270–281, DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-4-270-281

Сахарный диабет (СД) — широко распространенное заболевание, характеризующееся прогрессирующим течением, хроническими осложнениями и повреждением органов, что делает его социально значимым [1]. Пусковым фактором нарушений обмена, известных в патогенезе диабета, служит срыв гомеостаза глюкозы, причиной которого при сахарном диабете 1-го типа является разрушение значительного количества β -клеток в островках поджелудочной железы и дефицит инсулина [2, 3]. Оксидативный стресс является одним из механизмов деструкции β -клеток, не обладающих доста-

точной антиоксидантной защитой [4]. Пул β -клеток поджелудочной железы и их функциональная активность играют решающую роль при проявлении СД 1 типа, поэтому восстановление утраченной функциональной массы β -клеток определяет терапевтическую стратегию при лечении диабета [3, 5]. При отсутствии лечения и прогрессировании заболевания возникает гипергликемия, и развиваются хронические осложнения, такие как макроангиопатия (ишемическая болезнь сердца и заболевание периферических артерий), микроангиопатии, ретинопатия, нефропатия и нейропатия [2]. К хроническим осложнениям СД 1 типа можно отнести деструктивные процессы, протекающие в различных органах, основными причинами которых являются повсеместное гликирование белков, аутоиммунная агрессия в отношении гликированных белков, оксидативный стресс, действие контринсулярных гормонов и отсутствие анаболического эффекта инсулина [2, 6-8].

Природные антиоксиданты флавоноиды привлекают внимание исследователей как потенциальные противодиабетические средства благодаря их способности улавливать свободные радикалы, предотвращать воспаление и снижать уровень глюкозы в крови [9]. Изофлавоноиды или изофлавоны (ИФ) являются производными изофлавона и составляют особую группу в составе флавоноидов, содержат гетероциклические соединения дифенилпропанового ряда с гидроксильными группами [10]. Изофлавоноидами богаты растения семейства бобовых, в частности соя и кудзу (*Pueraria lobata*). Эти соединения имеют структурное сходство с человеческим эстрогеном и могут конкурировать за сайт связывания с последним [10]. Структурное сходство изофлавонов с эстрогенами обуславливает сходные с эстрогенами физиологические эффекты: снижение окисления глюкозы, увеличение уровня инсулина, снижение инсулинорезистентности и ожирения у экспериментальных животных [9, 10], уменьшение проявлений постменопаузального синдрома, остеопороза, ишемической болезни сердца [11, 12]. Длительное применение гормонов эстрогенов, несмотря на антидиабетический эффект, связано с увеличением риска онкологических заболеваний [13]. Пищевые добавки изофлавоноидов, получившие название фитоэстрогенов, также проявляют антидиабетическое действие и могут быть альтернативой эстрогенам [9, 11]. В основном ИФ содержатся в форме конъюгированных гликозидов (дайдзин, генистин, глицитин) в бобовых растениях, в том числе в клевере, соевых бобах и кудзу. Однако усвоение конъюгированных форм ИФ затруднено, но они могут превращаться в деконъюгированные формы (например, дайдзеин, генистеин, глицитеин) под действием гидролитических ферментов кишечной микрофлоры, тем самым улучшается их усвоение в желудочно-кишечном тракте и поступление в кровоток [10].

Несмотря на то, что множество исследований подтверждают антидиабетический эффект изофлавоноидов, дозовый эффект остается спорным [9, 14], а предотвращение деструктивных изменений в органах и тканях исследовано недостаточно.

Для оценки антидиабетического действия ИФ, кроме известных показателей, характеризующих развитие СД, таких как концентрация глюкозы, гликированного гемоглобина и инсулина в крови [2], используют традиционные унифицированные биохимические методы определения активности аминотрансфераз [15, 16], щелочной фосфатазы [17, 18], α -амилазы [19, 20], содержание общего белка, мочевины и креатинина в плазме крови [21].

В настоящее время для экстракции биологически активных соединений из растительного сырья используют природные глубокие эвтектические растворители (Natural deep eutectic solvents, NADES), которые содержат природные соединения, такие как органические кислоты, аминокислоты и сахара, и обладают свойством биоразлагаемости [22]. Несмотря на то, что NADES применяют для экстракции различных биоактивных соединений, только в единичных исследованиях удалось использовать эти растворители для экстракции изофлавоноидов [9, 23].

Целью исследования является выявить возможное антидиабетическое действие изофлавоноидов, полученных из корней кудзу с использованием NADES, на животных с аллоксановым диабетом.

Материалы и методы

Приготовление NADES, экстракция изофлавонов, проверка качества полученных изофлавонов, а также прогнозирование *in silico* антиоксидантной и антигликирующей активности экстракта корня кудзу подробно описаны в работе [23].

В эксперименте были использованы самцы крыс линии Вистар (возраст 12 недель) массой около

205±7 г без симптомов каких-либо заболеваний, приобретенные в Институте иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук. Крысы содержались по 5 животных в стандартных лабораторных условиях при температуре 20±2°C, со сменой световой и темновой фаз суток 12 часов:12 часов и свободным доступом к воде и корму. Животные получали экструдированный корм для грызунов без соевого белка (2020X Teklad, Envigo, Хантингдон, Великобритания). Все протоколы экспериментов на животных были одобрены этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Были выделены следующие группы животных: 1) интактная, 2) аллоксановый диабет (АД), 3) аллоксановый диабет + изофлавоноиды 100 мг/кг (АД+ИФ100), 4) аллоксановый диабет + изофлавоноиды 200 мг/кг (АД+ИФ200), 5) здоровые крысы + изофлавоноиды 100 мг/кг (ИФ100), 6) здоровые крысы + изофлавоноиды 200 мг/кг (ИФ200).

Аллоксановый диабет моделировали после 16 часов голодания внутрибрюшинным введением раствора аллоксана в 0,85% растворе натрия хлорида из расчета 170 мг/кг. Доза аллоксана была разделена на 3 части: 50 мг/кг, 70 мг/кг и 50 мг/кг, введение которых, согласно авторской методике, осуществляли через 1-2 суток [5]. Крысы групп 3 и 4 после моделирования диабета и здоровые животные групп 5 и 6 получали взвесь ИФ в воде соответственно 100 мг/кг и 200 мг/кг посредством внутрижелудочного введения с использованием зонда DE006A 18G×50 mm (Великобритания).

Внутрижелудочное введение ИФ осуществляли 3 раза в неделю в течение 28 суток (всего 12 введений). Каждую неделю у животных всех групп определяли массу тела. За три дня до конца эксперимента в группах интактных животных, АД, АД+ИФ100 и АД+ИФ200 осуществляли пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ). После определения тощакового уровня глюкозы в крови из хвостовой вены проводили нагрузку глюкозой перорально из расчета 1 г/кг, затем определяли содержание глюкозы через 30, 60 и 120 минут. Площадь под гликемической кривой рассчитывали между осью абсцисс и уровнем гликемии методом трапеций [23].

Животные всех групп были выведены из эксперимента на 28-е сутки после начала эксперимента путем внутримышечного введения пентобарбитала натрия в дозе 40 мг/кг. Образцы крови собирали посредством кардиопункции с антикоагулянтом гепарином. Производили лапаротомию и выделяли поджелудочную железу. Плазму крови для биохимического анализа отделяли от форменных элементов центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут.

Биохимические показатели в крови определяли спектрофотометрическими методами с использованием готовых наборов реагентов. Активность аспартатаминотрансферазы (АСТ, Е. С. 2. 6. 1. 1), аланинаминотрансферазы (АЛТ, Е. С. 2.6.1.2), щелочной фосфатазы (АЛП, Е. С. 3.1.3.1), α-амилазы (3.2.1.1), концентрацию глюкозы, мочевины, креатинина и белка определяли в плазме крови с помощью наборов («Витал Диагностикс», Российская Федерация). Содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови определяли методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора ГЛИКОГЕМОТЕСТ («ЭЛТА», Российская Федерация). Оптическую плотность измеряли спектрофотометром Beckman DU-800 (США). Уровень инсулина в плазме крови определяли методом ИФА с использованием набора для ИФА инсулина крыс / мышей («Millipore», США) и анализатора Лазурит («Dynexttechnologies», США).

Поджелудочную железу крыс фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов, обрабатывали для обычной гистологической оценки и помещали в парафиновые блоки с помощью автоматического процессора (Leica EG 1160). Срезы тканей толщиной 3-4 мм изготавливали с помощью микротомы и окрашивали гематоксилином и эозиновым (H&E) красителем. Ткани исследовали под световым микроскопом (Leica DM 2500), а анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения VideoTesT-Morphology 5 Immunohistochemical (ИНС).

Иммуногистохимическую процедуру проводили методом авидин-биотинового пероксидазного комплекса (АВК). Для обнаружения Ki67-позитивных или инсулин-позитивных клеток парафиновые срезы поджелудочной железы толщиной 4 мкм депарафинизировали, регидратировали и инкубировали в буфере для извлечения антигена (0,01 м цитратный буфер, рН 6,0) с использованием микроволновой печи в течение 15 минут. Ткани поджелудочной железы инкубировали в течение ночи при 4°C с антиинсулиновыми антителами (Clone E11D7, Millipore), разведенными в 1: 200, или анти-Ki67 антителами (Leica, Biosystems), разведенными в соотношении 1:25. После реакции диаминобензидин (DAB)-никель срезы были окрашены с помощью гематоксилина. Морфометрические исследова-

ния островков поджелудочной железы в каждой экспериментальной группе включали: расчет общего количества панкреатических островков (ПО) на 1 мм² паренхимы, содержания β-клеток в ПО, количества Ki67+ β-клеток в ПО, определение оптической плотности инсулин⁺-клеток.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения OriginPro 9.0 (Originlab Corporation, США). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения. Статистическая значимость различий в полученных данных оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (U). Установлен 5% уровень значимости различия средних значений в группе, P<0,05.

Результаты и обсуждение

Для характеристики формирования сахарного диабета принято определять уровень глюкозы, гликированного гемоглобина и инсулина в крови [2]. Изменение массы тела животных также служит показателем развития СД 1 типа и эффективности лечения. Масса тела диабетических крыс (группа АД) в отличие от массы крыс во всех других группах не увеличилась, а уменьшилась к концу эксперимента (таблица 1), что является характерным для СД 1 типа признаком. Лечение диабетических крыс экстрактом корня кудзу способствовало приросту массы, сопоставимому с приростом массы интактных животных. Не было обнаружено достоверных различий изменения массы в зависимости от дозы ИФ у здоровых и диабетических крыс (таблица 1).

Определение содержания глюкозы на 28 сутки подтвердило развитие гипергликемии у животных после моделирования сахарного диабета (таблица 1). Уровень глюкозы в крови крыс группы АД можно оценить как субкомпенсированный, поскольку он не превышал 13,9 ммоль/л [2].

Таблица 1

Динамика массы тела и показатели, характеризующие развитие сахарного диабета

Table 1

Body weight dynamics and indicators characterizing the development of diabetes mellitus

Показатель / Parameter	Интактная группа / Intact group	АД / DM	АД +ИФ100 / DM+IF 100	АД +ИФ200 / DM+IF 200	ИФ100 / IF 100	ИФ200 / IF 200
Изменение массы, г / Change of weight, g	56±17	-18±8*	29±15 ²	36±19 ²	52±26 ²	45±11 ²
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol / L	6,3±0,4	10,9±0,5*	6,3±0,3 ²	6,9±0,1 ²	6,5±0,2 ²	6,5±0,7 ²
HbA1c, % / HbA1c, %	4,3±0,3	7,2±0,7*	4,1±0,6 ²	5,2±0,1 ²	4,0±0,3 ²	3,8±0,5 ²
Инсулин, мкг/л / Insulin, mkg / L	1,28±0,19	0,45±0,09*	0,78±0,04 ²	1,04±0,08 ^{2,3}	1,32±0,21 ²	1,33±0,17 ²

* — различие с интактной группой достоверно при P<0,05;

^{2,3} — различие с группами 2, 3 достоверно при P<0,05.

* — the difference with the intact group is significant at P<0.05;

^{2,3} — the difference with groups 2, 3 is significant at P<0.05.

В то же время у здоровых животных, получавших дозы ИФ 100 мг/кг и 200 мг/кг, содержание глюкозы в крови не имело достоверных отличий от тех же показателей интактных крыс.

К концу эксперимента у крыс группы АД уровень гликированного гемоглобина также достоверно увеличился, а концентрация инсулина в плазме крови снизилась относительно показателей интактной группы и групп ИФ100 и ИФ200 (таблица 1). Введение экстракта кудзу, содержащего ИФ, диабетическим крысам сопровождалось снижением содержания глюкозы, гликированного гемоглобина и увеличением концентрации инсулина в крови (таблица 1). Содержание инсулина не достигло уровня нормы у диабетических животных, получавших изофлавоноиды в дозе 100 мг/кг (АД+ИФ100), но различие с группой АД было достоверным. Введение ИФ здоровым животным (группы ИФ100 и ИФ200) не сопровождалось достоверными отклонениями от нормы уровней глюкозы, гликированного гемоглобина и инсулина (таблица 1).

В таблице 2 представлены результаты теста толерантности к глюкозе у диабетических и интактных животных. Содержание глюкозы, измеренное в каждой точке, и площадь под кривой у крыс группы АД достоверно выше, чем у интактных и леченных изофлавоноидами диабетических крыс групп АД+ИФ100 и АД+ИФ200.

Таблица 2
Пероральный тест толерантности к глюкозе
Table 2
Oral glucose tolerance test

Показатель / Parameter		Интактная группа / Intact group	АД / DM	АД +ИФ100 / DM+IF 100	АД +ИФ200 / DM+IF 200
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol / L	0 минут / 0 minutes	4,9±0,5	9,4±0,7*	6,3±1,0 ²	5,4±0,5 ²
	30 минут / 30 minutes	7,5±0,3	14,5±0,4*	9,3±0,5* ²	8,5±0,3* ²
	60 минут / 60 minutes	5,7±0,5	12,3±0,3*	7,7±0,2* ²	6,2±0,4 ^{2,3}
	120 минут / 120 minutes	5,1±0,5	12,0±0,5*	6,7±0,7 ²	5,7±0,5 ²
Площадь под кривой, ммоль/л/мин / Area under the curve, mmol / L/ min		534,5±43,8	1488,0±53,6*	921,0±23,3* ²	786,0±32,5* ^{2,3}

* — различие с интактной группой достоверно при $P < 0,05$;

^{2,3} — различие с группами 2, 3 достоверно при $P < 0,05$.

* — the difference with the intact group is significant at $P < 0.05$;

^{2,3} — the difference with groups 2, 3 is significant at $P < 0.05$.

Изменение уровня глюкозы, HbA1c и инсулина в крови крыс группы АД подтверждает моделирование сахарного диабета 1 типа. Поскольку не было обнаружено достоверных отличий от нормы в содержании глюкозы, HbA1c и инсулина у здоровых крыс, получавших ИФ, можно предположить отсутствие влияния ИФ на гомеостаз глюкозы у здоровых животных.

Гликированный гемоглобин является широко используемым тестом для оценки не только гликемического контроля, но и развития хронических осложнений сахарного диабета. Накопление HbA1c и площадь под гликемической кривой служат прогностическими показателями развития хронических осложнений СД, а также позволяют оценить антидиабетическое действие использованных препаратов [2, 24]. Введение ИФ корня кудзу способствовало снижению гипергликемии и повышению толерантности к глюкозе. Полученные данные подтверждают исследования, показавшие, что действие изофлавоноидов при экспериментальном сахарном диабете способствует снижению гипергликемии [9], увеличению уровня инсулина [25] и улучшению гликемического контроля [26].

Изменение активности ферментов и концентрации субстратов в плазме крови являются показателями деструктивных изменений и нарушения физиологических процессов в органах и тканях [15, 16, 18, 21]. К 28 суткам у крыс группы АД была достоверно увеличена активность АСТ и АЛТ относительно соответствующих показателей интактной группы и групп АД+ИФ100 и АД+ИФ200 (таблица 3), что свидетельствует о развитии цитолиза в различных органах, поскольку аминотрансферазы присутствуют в большинстве клеток организма. Не исключается цитолитический синдром у диабетических крыс в печени (увеличение активности АЛТ) и в миокарде (увеличение активности АСТ). Известно, что повышенная активность аминотрансфераз обнаруживается у больных сахарным диабетом [15].

После введения обеих доз изофлавоноидов 100 мг/кг и 200 мг/кг у диабетических крыс активность АСТ, АЛТ уменьшилась по сравнению с показателями нелеченых крыс группы АД, что согласуется с данными, полученными другими авторами при пероральном введении изофлавоноидов диабетическим крысам Wistar [16].

Действие обеих доз ИФ сопровождалось нормализацией содержания мочевины у диабетических крыс и не оказывало влияния на этот показатель у здоровых животных. Содержание креатинина в группах 2-6 не отклонялось от уровня показателя интактных крыс (таблица 3).

Таблица 3
 Биохимические параметры повреждения органов
 Table 3
 Biochemical parameters of organ damage

Показатель / Parameter	Интактная группа / Intact group	АД / DM	АД +ИФ100 / DM+IF 100	АД +ИФ200 / DM+IF 200	ИФ 100 / IF 100	ИФ 200 / IF 200
АСТ, мкмоль/мин·л / AST, mkmol /min·L	13,4±1,0	21,0±1,0*	15,6±0,7 ²	14,8±2,1 ²	15,2±2,4	15,3±0,7 ²
АЛТ, мкмоль/мин·л / ALT, mkmol /min·L	9,0±2,2	16,3±1,1*	8,3±0,8 ²	7,9±1,4 ²	8,6±3,6	7,2±1,2 ²
ЩФ, мкмоль/мин·л / ALP, mkmol /min·L	51,3±5,3	63,4±26,4	62,8±4,0	58,7±6,5	35,6±8,8	34,7±7,9
α-Амилаза, мг/с·л / α-Amylase, mg / s·L	32,6±2,5	31,8±1,4	20,0±1,4* ²	19,9±1,5* ²	10,9±1,1* ²	15,2±0,4* ²
Мочевина, ммоль/л / Urea, mmol / L	5,0±0,3	8,2±0,5*	4,8±0,3 ²	4,9±0,6 ²	5,8±0,3 ²	5,5±0,6 ²
Креатинин, мкмоль/л / Creatinine, mkmol / L	64,1±2,5	53,7±4,3	59,6±3,8	54,6±3,9	63,1±2,9	61,5±1,4
Общий белок, г/л / Total protein, g / L	69,5±3,1	59,1±1,6*	73,0±1,4 ²	71,5±2,9 ²	72,9±2,1 ²	73,6±3,7 ²

* — различие с интактной группой достоверно при P<0,05;

² — различие с группами 2 достоверно при P<0,05.

* — the difference with the intact group is significant at P<0.05;

² — the difference with groups 2 is significant at P<0.05.

Общее количество белков в плазме крови диабетических животных снизилось относительно нормы и показателя здоровых крыс, получавших ИФ, а в группах диабетических крыс после введения обеих доз ИФ уровень белка нормализовался (таблица 3). Убыль белка, поступающего в плазму крови преимущественно из печени, подтверждает поражение этого органа, в котором страдает белоксинтетическая функция, а также согласуется с предположением об усилении глюконеогенеза.

При развитии сахарного диабета 1 типа прежде всего цитолизу подвергаются β-клетки панкреатических островков, не обладающие достаточной устойчивостью к оксидативному стрессу вследствие малой активности антиоксидантных ферментов [6]. Одновременно с деструкцией β-клеток компенсаторно развивается их восстановление за счет перепрограммирования других островковых клеток, протоковых и ацинарных клеток [3, 27], но гибель β-клеток при диабете опережает их восстановление. Согласно данным литературы, введение ИФ, обладающих антиоксидантным действием, может предотвращать повреждение мембран в результате оксидативного стресса [28].

Действие антиоксидантов может способствовать восстановлению пула инсулинпродуцирующих клеток за счет снижения потери β-клеток. Морфометрический анализ позволяет оценить количество β-клеток, их функциональную активность по оптической плотности окрашенных на инсулин клеток и пролиферативную активность в островках по экспрессии Ki67.

Моделирование аллоксанового диабета сопровождалось снижением количества панкреатических островков, содержания в островках β-клеток и оптической плотности инсулина в инсулин+окрашенных клетках (таблица 4). Уменьшение количества β-клеток является закономерным звеном патогенеза СД 1 типа и согласуется с другими экспериментальными работами [5]. Введение ИФ корня кудзу диабетическим крысам способствовало частичной коррекции перечисленных показателей; доза ИФ 200 мг/кг по сравнению с дозой 100 мг/кг оказывала более выраженное корригирующее действие на восстановление панкреатических островков и увеличение количества Ki67-позитивных клеток в группах диабетических крыс (таблица 4). Обе дозы ИФ при введении здоровым крысам не вызывали изменения исследованных морфометрических параметров.

Таблица 4
Показатели морфометрии
Table 4
Parameters of morphometry

Показатель / Parameter	Интактная группа / Intact group	АД / DM	АД +ИФ100 / DM+IF 100	АД +ИФ200 / DM+IF 200	ИФ100 / IF 100	ИФ200 / IF 200
Количество ПО, N, мм ²	4,2±0,6	1,6±0,2*	1,6±0,2*	2,6±0,2* ^{2,3}	3,9±0,2 ²	4,1±0,4 ²
Количество β-клеток в ПО, %	77,2±0,9	47,4±5,4*	62,8±5,3*	68,8±4,1 ²	77,4±3,3 ²	78,9±3,3 ²
Оптическая плот- ность ед./клетку	0,40±0,04	0,30±0,01*	0,30±0,02	0,30±0,02	0,40±0,04 ²	0,40±0,03 ²
Количество Ki67+ клеток в ПО, N/мм ²	698,7±6,8	360,9±8,6*	400,4±17,7*	470,4±8,8* ^{2,3}	795,4±22,9 ²	799,2±16,4 ²

* — различие с интактной группой достоверно при P<0,05; ^{2,3} — различие с группами 2, 3 достоверно при P<0,05; ПО — панкреатический островок.

* — the difference with the intact group is significant at P<0.05; ^{2,3} — the difference with groups 2, 3 is significant at P<0.05; PI — pancreatic islet

Выводы

Моделирование аллоксанового диабета сопровождается гипергликемией, усилением глюконеогенеза, развитием цитолитического синдрома и уменьшением в панкреатических островках количества β-клеток и их функциональной активности, а также количества пролиферирующих клеток, и сопровождается дефицитом инсулина в плазме крови.

Внутрижелудочное введение изофлавоноидов корня кудзу дозами 100 мг/кг и 200 мг/кг диабетическим крысам способствует коррекции гипергликемии, повышает толерантность к глюкозе, нормализует показатели цитолиза и глюконеогенеза, способствует восстановлению количества β-клеток, их функциональной активности, увеличивает пролиферативный процесс в панкреатических островках, что подтверждается увеличением содержания инсулина в плазме крови.

Доза изофлавоноидов 200 мг/кг оказывает более выраженное влияние на восстановление количества панкреатических островков, β-клеток и пролиферирующих клеток в островках и в большей степени, чем доза 100 мг/кг способствует увеличению концентрации инсулина в плазме крови.

При внутрижелудочном введении обеих доз изофлавоноидов здоровым крысам не выявлено отклонения от нормы показателей гликемического контроля, не обнаружены изменения в островковом аппарате животных, что указывает на отсутствие токсического действия изофлавоноидов, экстрагированных с использованием природных глубоких растворителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. International Diabetes Federation: Diabetes Atlas 8th edition.2017.
2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей). М.: Медицина; 2005.
3. Aguayo-Mazzucato C., Bonner-Weir S. Pancreatic beta cell regeneration as a possible therapy for diabetes. Cell Metab. 2018; 27: 57–67. DOI.org/10.1016/j.cmet.2017.08.007.
4. Dos Santos J.M., Tewari S., Mendes RH. The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications. J. Diabetes Res.2019; 5:4189813. DOI: 10.1155/2019/4189813.
5. Danilova I.G., Bulavintceva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y., Emelyanov V.V., Abidov M.T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. Biomed Pharmacother. 2017;95:103-110. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.117.
6. Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S. et al. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. J. Clin. Med. 2019;8(9): E1385. DOI: 10.3390/jcm8091385.
7. Kumar P., Raman T., Swain M.M., Mishra R., Pal A. Hyperglycemia-induced oxidative-nitrosative stress

induces inflammation and neurodegeneration via augmented tuberous sclerosis complex-2 (TSC-2) activation in neuronal cells. *Mol. Neurobiol.* 2017;54(1):238-254. DOI: 10.1007/s12035-015-9667-3.

8. Кобылянский В.И. Роль контринсулярных гормонов в регуляции гомеостаза глюкозы и патогенезе сахарного диабета 2-го типа при ХОБЛ. *Проблемы эндокринологии.* 2021;67(2):93-101. DOI: org/10.14341/probl12566

9. Duru K.C., Kovaleva E.G., Danilova I.G., Van der Bijl P., Belousova A.V. The potential beneficial role of isoflavones in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* 2018; 59: 1-15. DOI.org/10.1016/j.nutres.2018.06.005.

10. Зверев Я.Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Особенности и проблемы фармакокинетики. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2017; 15(2): 4-11. DOI: 10.17816/RCF1524-11.

11. Ribeiro A.E., Monteiro N.E.S., Moraes A.V.G., Costa-Paiva L.H., Pedro A.O. Can the use of probiotics in association with isoflavone improve the symptoms of genitourinary syndrome of menopause? Results from a randomized controlled trial. *Menopause.* 2018 D;26(6):643-652. DOI: 10.1097/GME.0000000000001279.

12. Sekikawa A., Ihara M., Lopez O., Kakuta C., Lopresti B., Higashiyama A. et al. Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain. *Curr. Cardiol. Rev.* 2019;15(2):114-135. DOI: 10.2174/1573403X15666181205104717.

13. Brusselaers N., Tamimi R.M., Konings P., Rosner B., Adami H.O., Lagergren J. Different menopausal hormone regimens and risk of breast cancer. *Ann. Oncol.* 2018;29(8):1771-1776. DOI: 10.1093/annonc/mdy212.

14. Guo X.F., Ruan Y., Li Z.H., Li D. Flavonoid subclasses and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019;59(17):2850-2862. DOI: 10.1080/10408398.2018.1476964.

15. Singh A., Le P., Lopez R., Alkhoury N. The utility of noninvasive scores in assessing the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in type 1 diabetic patients. *Hepato. Int.* 2018;12(1):37-43. DOI: 10.1007/s12072-017-9840-z.

16. Shah S.W., Ghias M., Shoaib M., Ali N., Shah I., Umar M.N. et al. Antidiabetic potential of flavonoids from *Artemisia macrocephala* Jaquem in streptozotocin-induced diabetic rats: Pharmacological and biochemical approach. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2019;32(6(Supplementary)):2865-2871.

17. Chen S.C., Tsai S.P., Jhao J.Y., Jiang W.K., Tsao C.K., Chang L.Y. Liver fat, hepatic enzymes, alkaline phosphatase and the risk of incident type 2 diabetes: a prospective study of 132,377 adults. *Sci Rep.* 2017;7(1):4649. DOI: 10.1038/s41598-017-04631-7.

18. Siller A.F., Whyte M.P. Alkaline phosphatase: discovery and naming of our favorite enzyme. *J. Bone Miner. Res.* 2018;33(2):362-364. DOI: 10.1002/jbmr.3225.

19. Hua F., Zhou P., Wu H.Y., Chu G.X., Xie Z.W., Bao G.H. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoid glycosides from Lu'an Gua Pian tea: molecular docking and interaction mechanism. *Food Funct.* 2018; 9(8): 4173-4183. DOI: 10.1039/c8fo00562a. PMID: 29989631.

20. Kalita D., Holm D.G., La Barbera D.V., Petrash J.M., Jayanty S.S. Inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191025. DOI: 10.1371/journal.pone.0191025.

21. Oza M.J., Kulkarni Y.A. Formononetin attenuates kidney damage in type 2 diabetic rats. *Life Sci.* 2019;219:109-121. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.01.013.

22. Bajkacz S., Rusin K., Wolny A., Adamek J., Erfurt K., Chrobok A. Highly efficient extraction procedures based on natural deep eutectic solvents or ionic liquids for determination of 20-hydroxyecdysone in spinach. *Molecules.* 2020;25(20):4736. DOI: 10.3390/molecules25204736.

23. Duru K.C., Mukhlynina E.A., Moroz G.A., Gette I.F., Danilova I.G., Kovaleva E.G. Anti-diabetic effect of isoflavone rich kudzu root extract in experimentally induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods.* 2020. 68: 103922. DOI.org/10.1016/j.jff.2020.103922.

24. Feizi A., Meamar R., Eslamian M., Amini M., Nasri M., Iraj B. Area under the curve during OGTT in first-degree relatives of diabetic patients as an efficient indicator of future risk of type 2 diabetes and prediabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2017;87(6):696-705. DOI: 10.1111/cen.13443.

25. Liu C.L., Yan L., Cai K.R., Sun K., Qi Y., Han Y.L. et al. Effects of soybean isoflavones on Wnt/beta-catenin and the TGF-beta1 signaling pathway in renal tissue of type 2 diabetic rats. *J. Bio. Regul. Homeost. Agents.* 2018;32(3):455-464.

26. Rehman K., Ali M.B., Akash M.S.H. Genistein enhances the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) via downregulation of inflammatory responses. *Biomed Pharmacother.* 2019; 112: 108670. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108670.

27. McKimpson W.M., Accili D. Reprogramming cells to make insulin. *J. Endocr. Soc.* 2019; 3(6): 1214-1226. DOI: 10.1210/js.2019-00040.

28. Vedavanam K., Srijayanta S., O'Reilly J., Raman A., Wiseman H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytother. Res.* 1999; 13(7): 601-608. DOI: 10.1002/(sici)1099-1573(199911)13:7<601::aid-ptr550>3.0.co;2-o.

Авторы

Дуру Кинсли Цхидумага

Аспирант кафедры Технологии органического синтеза

kcduru@urfu.ru

Ковалева Елена Германовна

Кандидат химических наук, доцент кафедры Технологии органического синтеза

e.g.kovaleva@urfu.ru

Данилова Ирина Георгиевна

Доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой Медицинской биохимии и биофизики.

ig-danilova@yandex.ru

Гетте Ирина Федоровна

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры иммунохимии.

i.goette@yandex.ru

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Российская Федерация, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

K.C. Duru, E.G. Kovaleva, I. G. Danilova, I.F. Gette

IMPACT OF ISOFLAVONS ON BIOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC PARAMETERS OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES MELLITUS

Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin,
Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Isoflavones (IF) of plant origin with antioxidant activity can also exhibit antidiabetic effects. The study of the antidiabetic effect of the kudzu root extract (*Pueraria lobata*) obtained using natural deep solvents and containing the isoflavones puerarin, genistein and daidzein in an amount of 40 mg / g of the extract was carried out.

Sixty male Wistar rats were used in the experiment. Type 1 diabetes mellitus was simulated by intraperitoneal administration of alloxan solution at a dose of 170 mg / kg. The IF extract was administered intragastrically to diabetic and healthy animals at doses of 100 mg / kg and 200 mg / kg three times a week (12 injections in total). The administration of IF to diabetic rats was accompanied by the correction of hyperglycemia, an increase in glucose tolerance, the normalization of parameters of the functional state of various organs (AST, ALT, urea, total protein), promoted the restoration of the number of β -cells and the content of insulin in them, stimulation of the proliferative process in the pancreatic islets (the number of Ki67 + cells), and was accompanied by an increase in insulin content in blood plasma. Dose dependence was manifested in a more pronounced effect of the dose of IF 200 mg / kg on the restoration of the number of pancreatic islets, β -cells and proliferating cells in the islets and a more significant increase in the level of insulin in blood plasma

compared with the dose of 100 mg / kg.

When IF was administered to healthy animals, no deviations from the norm in the glycemic control and cytotoxicity parameters were detected, no changes were found in the islet apparatus, which indicates the absence of the toxic effect of IFs extracted using natural deep solvents.

Keywords: isoflavones; Pueraria lobata; diabetes; pancreatic islet; hyperglycemia

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Irina G. Danilova

ig-danilova@yandex.ru

Received 27.10.2021

For citation:

Duru K.C., Kovaleva E.G., Danilova I.G., Gette I.F.

Impact of isoflavones on biochemical and morphometric parameters of rats with alloxan diabetes mellitus. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2021, Vol. 18, no. 4, pp. 270–281. DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-4-270-281 (In Russ)

REFERENCES

1. International Diabetes Federation: Diabetes Atlas 8th edition.2017.
2. Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaya V.M. Treatment of diabetes mellitus and its complications (a guide for doctors). M.: Medicine; 2005 (in Russ).
3. Aguayo-Mazzucato C., Bonner-Weir S. Pancreatic beta cell regeneration as a possible therapy for diabetes. *Cell Metab.* 2018; 27: 57–67. DOI.org/10.1016/j.cmet.2017.08.007.
4. Dos Santos J.M., Tewari S., Mendes RH. The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications. *J. Diabetes Res.* 2019; 5: 4189813. DOI: 10.1155/2019/4189813.
5. Danilova I.G., Bulavintceva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y., Emelyanov V.V., Abidov M.T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. *BiomedPharmacother.* 2017;95:103-110. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.117.
6. Burgos-MorónE, Abad-JiménezZ, MarañónAM, IannantuoniF, Escribano-LópezI., López-DomènechS. et al. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. *J. Clin. Med.* 2019; 8(9): E1385. DOI: 10.3390/jcm8091385.
7. Kumar P., Raman T., Swain M.M., Mishra R., Pal A. Hyperglycemia-induced oxidative-nitrosative stress induces inflammation and neurodegeneration via augmented tuberous sclerosis complex-2 (TSC-2) activation in neuronal cells. *Mol. Neurobiol.* 2017; 54(1): 238-254. DOI: 10.1007/s12035-015-9667-3.
8. Kobylansky V.I. The role of counterinsular hormones in the regulation of glucose homeostasis and the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus in COPD. *Problems of Endocrinology=Problemy` endokrinologii.* 2021; 67(2): 93-101. (In Russ.) <https://doi.org/10.14341/probl12566> (in Russ).
9. Duru K.C.,Kovaleva E.G., Danilova I.G., Van der Bijl P., Belousova A.V. The potential beneficial role of isoflavones in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* 2018; 59: 1-15. DOI.org/10.1016/j.nutres.2018.06.005.
10. Zverev J.F. Flavonoids through the eyes of a pharmacologist. Features and problems of pharmacokinetics. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy=Obzory` poklinicheskoyfarmakologiiilekarstvennojt erapii.* 2017; 15(2): 4-11. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF1524-11 (in Russ).
11. Ribeiro A.E., Monteiro N.E.S., Moraes A.V.G., Costa-Paiva L.H., Pedro A.O. Can the use of probiotics in association with isoflavone improve the symptoms of genitourinary syndrome of menopause? Results from a randomized controlled trial. *Menopause.* 2018 D;26(6):643-652. DOI: 10.1097/GME.0000000000001279.
12. Sekikawa A., Ihara M., Lopez O., Kakuta C., Lopresti B., Higashiyama A. et al. Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain. *Curr. Cardiol. Rev.* 2019; 15(2):114-135. DOI: 10.2174/1573403X1566181205104717.
13. Brusselaers N., Tamimi R.M., Konings P., Rosner B., Adami H.O., Lagergren J. Different menopausal hormone regimens and risk of breast cancer. *Ann. Oncol.* 2018; 29(8):1771-1776. DOI: 10.1093/annonc/mdy212.
14. Guo X.F., Ruan Y., Li Z.H., Li D. Flavonoid subclasses and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-

analysis of prospective cohort studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59(17):2850-2862. DOI: 10.1080/10408398.2018.1476964.

15. Singh A., Le P., Lopez R., Alkhoury N. The utility of noninvasive scores in assessing the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in type 1 diabetic patients. *Hepato.l Int.* 2018; 12(1): 37-43. DOI: 10.1007/s12072-017-9840-z.

16. Shah S.W., Ghias M., Shoaib M., Ali N., Shah I., Umar M.N. et al. Antidiabetic potential of flavonoids from *Artemisia macrocephalla* Jaquem in streptozotocin-induced diabetic rats: Pharmacological and biochemical approach. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2019; 32(6(Supplementary)): 2865-2871.

17. Chen S.C., Tsai S.P., Jhao J.Y., Jiang W.K., Tsao C.K., Chang L.Y. Liver fat, hepatic enzymes, alkaline phosphatase and the risk of incident type 2 diabetes: a prospective study of 132,377 adults. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 4649. DOI: 10.1038/s41598-017-04631-7.

18. Siller A.F., Whyte M.P. Alkaline phosphatase: discovery and naming of our favorite enzyme. *J. Bone Miner. Res.* 2018; 33(2): 362-364. DOI: 10.1002/jbmr.3225.

19. Hua F., Zhou P., Wu H.Y., Chu G.X., Xie Z.W., Bao G.H. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoid glycosides from Lu'an Gua Pian tea: molecular docking and interaction mechanism. *Food Funct.* 2018; 9(8): 4173-4183. DOI: 10.1039/c8fo00562a. PMID: 29989631.

20. Kalita D., Holm D.G., La.Barbera D.V., Petrash J.M., Jayanty S.S. Inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLoS One.* 2018; 13(1): e0191025. DOI: 10.1371/journal.pone.0191025.

21. Oza M.J., Kulkarni Y.A. Formononetin attenuates kidney damage in type 2 diabetic rats. *Life Sci.* 2019; 219:109-121. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.01.013.

22. Bajkacz S., Rusin K., Wolny A., Adamek J., Erfurt K., Chrobok A. Highly efficient extraction procedures based on natural deep eutectic solvents or ionic liquids for determination of 20-hydroxyecdysone in spinach. *Molecules.* 2020; 25(20): 4736. DOI: 10.3390/molecules25204736.

23. Duru K.C., Mukhlynina E.A., Moroz G.A., Gette I.F., Danilova I.G., Kovaleva E.G. Anti-diabetic effect of isoflavone rich kudzu root extract in experimentally induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods.* 2020. 68: 103922. DOI.org/10.1016/j.jff.2020.103922.

24. Feizi A., Meamar R., Eslamian M., Amini M., Nasri M., Iraj B. Area under the curve during OGTT in first-degree relatives of diabetic patients as an efficient indicator of future risk of type 2 diabetes and prediabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2017; 87(6): 696-705. DOI: 10.1111/cen.13443.

25. Liu C.L., Yan L., Cai K.R., Sun K., Qi Y., Han Y.L. et al. Effects of soybean isoflavones on Wnt/beta-catenin and the TGF-beta1 signaling pathway in renal tissue of type 2 diabetic rats. *J. Bio.l Regul. Homeost. Agents.* 2018; 32(3): 455-464.

26. Rehman K., Ali M.B., Akash M.S.H. Genistein enhances the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) via downregulation of inflammatory responses. *Biomed Pharmacother.* 2019; 112: 108670. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108670.

27. McKimpson W.M., Accili D. Reprogramming cells to make insulin. *J. Endocr. Soc.* 2019; 3(6): 1214-1226. DOI: 10.1210/js.2019-00040.

28. Vedavanam K., Srijayanta S., O'Reilly J., Raman A, Wiseman H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytother. Res.* 1999; 13(7): 601-608. DOI: 10.1002/(sici)1099-1573(199911)13:7<601::aid-ptr550>3.0.co;2-o.

Authors

Duru Kinsley Tschidumaga

Postgraduate student of the Department of Organic Synthesis Technology

keduru@urfu.ru

Elena G. Kovaleva

Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Organic Synthesis Technology

e.g.kovaleva@urfu.ru

Irina G. Danilova

Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Medical Biochemistry and

Biophysics.

ig-danilova@yandex.ru

Irina F. Gette

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Immunochemistry.

i.goette@yandex.ru

Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin

19 Mira str. Yekaterinburg Russian Federation 620002