Антиоксидантная активность пероральных сахароснижающих препаратов

Член-корр. РАМН А.А. СПАСОВ, проф. В.А. КОСОЛАПОВ, Н.И. ЧЕПЛЯЕВА*

The antioxidative activity of oral hypoglycemic agents

A.A. SPASOV, V.A. KOSOLAPOV, N.I. CHEPLYAEVA

ВПО ГУ МЗСР РФ Волгоградский государственный медицинский университет

Пероральные сахароснижающие препараты — глибенкламид, гликлазид, метформин, розиглитазона малеат и диабенол — в условиях *in vitro* оказывают несущественное прямое антиоксидантное действие. Розиглитазона малеат демонстрирует умеренную активность только на модели хемилюминесценции с генерацией активных форм кислорода. Диабенол является скавенджером супероксид-аниона и гидроксильного радикала в модельных системах хемилюминесценции. Гликлазид проявил дозозависимую антирадикальную активность только в отношении стабильного радикала ДФПГ. Метформин и глибенкламид не активны *in vitro*. Вероятно, антиоксидантные эффекты сахароснижающих препаратов в условиях длительной фармакотерапии связаны с их непрямым влиянием на активность ферментов антиоксидантной системы.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, пероральные сахароснижающие препараты, хемилюминесценция, активные формы кислорода.

Oral hypoglycemic agents, such as glibenclamide, gliclazide, metformin, rosiglitazone maleate, and diabenol, are known to exert in vitro a mild direct antioxidatove action. Rosiglitazone maleate showed moderate activity only on the hemiluminescence model with generation of active oxygen species while diabenol behaves as a scavenger of superoxide anion and hydroxyl radical in model hemiluminescence systems. Gliclazide exhibited dose-dependent activity only with respect to stable diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPG) radicals. Metformin and glibenclamide were inactive under in vitro conditions. It is hypothesized that the antioxidative action of hypoglycemic agents used for long-term pharmacotherapy should be attributed to their direct effect on the activity of enzymes of the antioxdative system.

Key words: antioxidative activity, oral hypoglycemic agents, hemiluminescence, active oxygen species.

Важным патогенетическим механизмом развития макро- и микроангиопатий при сахарном диабете (СД) является окислительный стресс, сопровождающийся усилением генерации свободных радикалов и снижением активности антиоксидантной системы. Развитие оксидативного стресса при СД связано с повышением аутоокисления глюкозы, активацией неферментативного гликозилирования белков с образованием конечных продуктов, усилением метаболизма глюкозы полиоловым путем, что приводит к увеличению продукции таких активных форм кислорода (АФК), как супероксид-анион, гидроксильный радикал, а также перекись водорода [7, 10]. Применение препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, может снизить риск возникновения и прогрессирования микроангиопатий при СД [10].

Согласно некоторым данным [11, 16], пероральные сахароснижающие препараты, применяемые в клинической практике, обладают не только антидиабетической активностью, но и снижают риск развития сосудистых осложнений, что авторы связывают с влиянием на свободнорадикальные процессы. Антиоксидантные эффекты препаратов, применяемых для терапии СД, могут быть обусловлены непосредственным взаимодействием со свободными радикалами, активностью метаболитов, активацией антиоксидантной системы и снижением интенсивности окислительного стресса при адекватной коррекции гипергликемии. В экспериментах *in vitro* [14] показано наличие свойств скавенджера супероксид-аниона и гидроксильного радикала у гликлазида. Антиоксидантные свойства обнаружены и у группы инсулиносенситайзеров, например, розиглитазон снижает НАДН-индуцированную продукцию свободных радикалов и повышает активность каталазы [16]. H. Khouri и др. показали, что метформин в терапевтических концентрациях, возможно, является скавенджером гидроксильного радикала, но не реагирует с супероксид-анионом и перекисью водорода [12]. Однако при анализе химической структуры метформина не выявлены фрагменты, ответственные за антиоксидантное и антирадикальное действие (фенольные группы, азотсодержащие гетероциклы, тиоловые группы и др.). Одним из механизмов терапевтических эффектов нового перорального сахароснижающего препарата диабенола может быть наличие у него антиоксидантной активности [3]. Кроме того, у существующих пероральных сахароснижающих препаратов не прогнозируется прямая антиоксидантная активность в системе компьютерного прогнозирования активности PASS (http://www.ibmc.msk.ru/PASS).

© Коллектив авторов, 2011

*e-mail: natalja-chepljaeva@rambler.ru

Так как данные о влиянии пероральных сахароснижающих препаратов на свободнорадикальные процессы носят противоречивый характер, весьма разрознены и требуют уточнения, целью настоящей работы являлось изучение механизмов антиоксидантной активности гипогликемических препаратов в условиях *in vitro*.

Материал и методы

Антиоксидантные свойства веществ изучены на модели аскорбатзависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) по методу В.З. Ланкина и соавт. [2]; в качестве субстрата аскорбатзависимого ПОЛ использовали гомогенат печени крысы, реакцию инициировали раствором аскорбиновой кислоты. Содержание гидроперекисей липидов оценивали по интенсивности окраски комплексов тиобарбитуровой кислоты и малонового диальдегида — конечного продукта окислительной деградации липидов. Для оценки действия веществ на Fe^{2+}-индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ) липидов получали реакционную смесь липидов куриного желтка, содержащую липопротеиновые комплексы, сходные с липидами крови [1]. Процесс ПОЛ индуцировали введением раствора сульфата железа и измеряли кинетику реакции в течение 10 мин.

Для уточнения механизмов антиоксидантного действия использовали две модели ХЛ: ХЛ с аутоокислением люминола и генерацией АФК и ХЛ окисления люминола пероксильными радикалами, генерирующимися 2,2`-азобис (2-метилпропионамидин) дигидрохлоридом (АБАП) [5]. Для моделирования процессов с генерацией АФК готовили реакционную смесь, включающую фосфатный буфер pH 7,45, люминол («Serva», Германия) и цитрат натрия (Россия); ХЛ инициировали введением в пробу сульфата железа и в течение 5 мин измеряли кинетику ХЛ. Реакцию продукции пероксильного радикала индуцировали введением водорастворимого соединения АБАП в пробу, содержащую люминол в фосфатном буфере pH 7,4, и измеряли кинетику ХЛ в течение 30 мин. Все ХЛ-измерения проводили с помощью хемилюминомера «Хемилюминомер-03» (Уфа, Россия).

Также определяли антирадикальную активность по методу J. Glavind [9], эффект оценивали по проценту ингибирования, рассчитанному как отношение изменения оптической плотности спиртового раствора 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) при добавлении веществ в исследуемой концентрации к изменению оптической плотности при добавлении пирогаллола. Исследовали гликлазид («Сервье», Франция), глибенкламид (Манинил, БЕРЛИН-ХЕМИ, Германия), розиглитазона малеат (Rozenda, «Biofarma Ilac San. ve Tic. A.S.», Турция), метформина гидрохлорид (Сиофор, MERCK, Австрия), а также диабенол (НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону). Все препараты изучали в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-6} М/л.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Для расчета концентрации вещества, ингибирующей реакцию на 50% ($ИК_{50}$), использовали метод регрессионного анализа, реализованный в программе Microsoft Excel 2000.

Результаты и обсуждение

На модели аскорбатзависимого ПОЛ гипогликемические препараты проявили низкую антиоксидантную активность. Так, для гликлазида в концентрации 10^{-4} М/л процент ингибирования был равен 14% ($p>0,05$), розиглитазона — 13% ($p>0,05$), диабенола — 7% ($p>0,05$), метформина — 4% ($p>0,05$). Однако данная модель позволяет оценить процесс ПОЛ косвенно (только по конечному продукту — малоновому диальдегиду), поэтому для изучения кинетики окисления липидов использовали Fe^{2+}-индуцированную ХЛ желточных липопротеинов. При исследованиях на этой модели процент ингибирования в концентрации 10^{-4} М/л для розиглитазона составил 37% ($p<0,01$), метформина был в 2 раза ниже, а для остальных веществ не превышал 11%.

При оценке общей антирадикальной активности выявлено, что розиглитазона малеат, диабенол, метформин, глибенкламид в концентрации 10^{-4} М/л незначительно снижали оптическую плотность спиртового раствора ДФПГ (см. таблицу), т.е. не были способны отдавать электрон или протон и стабилизировать данный свободный радикал. Гликлазид проявил наибольшую активность среди исследуемых препаратов, и при расчете $ИК_{50}$ коэффициент составил $7,3 \cdot 10^{-7}$ М/л ($R^2=0,94$). Процент ингибирования для остальных препаратов в концентрации 10^{-4} М/л был ниже 10%.

Гликлазид не оказывал влияния на кинетику реакции ХЛ с генерацией АФК (см. таблицу). Возможно, низкая активность связана с тем, что препарат высоколипофилен, а данная модельная система позволяет изучать вещества только в водной фазе. При этом, согласно A. Sikora и соавт. [17], гликлазид проявил свойства скавенджера супероксид-аниона, гидроксильного радикала и NO-радикала, что обусловлено наличием аминоазобициклооктилового кольца в его молекуле.

В экспериментах по изучению механизмов антиоксидантного действия пероральных сахароснижающих препаратов выявлено, что диабенол оказался активным в отношении супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов. На модели ХЛ с генерацией активных форм кислорода $ИК_{50}$ для диабенола составила $2,05 \cdot 10^{-5}$ М/л, а на мо-

Антиоксидантная активность пероральных сахароснижающих препаратов в концентрации 10^{-4} М/л на различных моделях ХЛ и модели со свободным радикалом ДФПГ (*M±m*)

Вещество	Ингибирование ХЛ с аутоокислением люминола, %	Ингибирование ХЛ липидов, %	Ингибирование на модели со свободным радикалом ДФПГ, %
Глибенкламид	–37,43±1,62*	–11,04±1,83*	3,10±1,17
Гликлазид	–0,60±2,40	–10,20±1,55	–98,19±2,17*
Диабенол	–75,88±1,22*	–17,95±0,98	–7,98±0,70
Метформин	–2,18±0,83	–18,58±5,35	+0,24±1,12
Розиглитазона малеат	–60,90±1,29*	–36,87±3,29*	3,56±1,13

Примечание. * — $p<0,05$ по сравнению с исходным значением.

дели ХЛ, сопровождающейся окислением люминола пероксильными радикалами, данный показатель был выше ($ИК_{50}=3,8\cdot10^{-5}$М/л, $R^2=0,97$). Возможно, антиоксидантная активность диабенола связана с наличием избыточной электронной плотности в бензимидазольном кольце [3].

Розиглитазон уступал в 2,5 раза диабенолу по эффекту на модели ХЛ с аутоокислением люминола ($ИК_{50}=5,3\cdot10^{-5}$ М/л, $R^2=0,98$) и практически не влиял на кинетику реакции ХЛ с генерацией пероксильных радикалов, что согласуется с данными литературы. Ранее [13] были получены данные о способности глитазонов (розиглитазон, троглитазон) дозозависимо снижать скорость генерации супероксид-аниона в бесклеточной системе ксантин-ксантиноксидаза и доказано, что эти вещества не влияют на ферментативную активность ксантиноксидазы. Однако G. Ceolotto и соавт. [7, 10] в своих исследованиях описали опосредованные эффекты розиглитазона на свободнорадикальные процессы при СД, связанные с активацией АМФ-протеинкиназы и предупреждением гиперактивации НАДФН-оксидазы при гипергликемии. Таким образом, антиоксидантная активность розиглитазона связана как с прямым взаимодействием с АФК, так и с сахароснижающим действием препарата.

Метформин оказался практически неактивным в отношении супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов. Антиоксидантные эффекты данного препарата, возможно, связаны с восстановлением активности антиоксидантной системы; так, у пациентов с СД после терапии повышалась концентрация восстановленного глутатиона, активность каталазы и Cu, Zn-супероксиддисмутазы [10, 16]. Кроме того, метформин ингибирует образование конечных продуктов гликирования и регликирует белки, а также опосредованно модулирует внутриклеточную продукцию супероксид-аниона НАДФН-оксидазой [6, 10, 15].

Для глибенкламида в концентрации 10^{-4} М/л ингибирование ХЛ с аутоокислением люминола не превышало 40%, а при снижении концентрации эффект исчезал, данный препарат не оказывал влияния на кинетику ХЛ с окислением люминола пероксильными радикалами.

Сочетание у пероральных сахароснижающих препаратов антидиабетического и прямого антиоксидантного эффектов позволило бы корректировать не только уровень глюкозы, но и свободнорадикальные процессы при СД. Известно, что гипергликемия является пусковым фактором развития окислительного стресса при СД, однако гиперпродукция свободных радикалов цепью переноса электронов наблюдается даже при адекватном контроле уровня глюкозы, что объясняется феноменом «гипергликемической памяти» [8]. Гликирование белков митохондрий приводит к усилению генерации супероксид-аниона, а основной фактор защиты от повреждающего действия активных форм кислорода (супероксиддисмутаза) при гликировании теряет функциональную активность [8, 11]. Таким образом, пациенты с СД 2-го типа нуждаются в дополнительной антиоксидантной терапии вне зависимости от степени компенсации углеводного обмена. Проведенные исследования в модельной системе ХЛ с генерацией АФК продемонстрировали, что диабенол в 16 раз, а розиглитазона малеат в 45 раз менее активны, чем водорастворимый аналог α-токоферола — тролокс [4]. Полученные результаты подтверждают сомнительность большинства данных литературы о прямых антиоксидантных эффектах пероральных сахароснижающих препаратов; такие эффекты могут быть опосредованы снижением уровня глюкозы, регликированием белков или ингибированием процессов гликирования.

Выводы

1. Гликлазид проявляет выраженное антирадикальное действие на модели со свободным радикалом ДФПГ; розиглитазон в условиях *in vitro* активен только в отношении супероксид-аниона, а диабенол является скавенджером супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов.

2. Антиоксидантные свойства метформина и глибенкламида в модельных системах *in vitro* отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Клебанов Г.И., Любицкий О.Б., Васильева О.В. и др.* Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина. Вопр мед химии 2001; 47: 288—300.
2. *Ланкин В.З., Гуревич С.М., Бурлакова Е.Б.* Изучение аскорбатзависимого перекисного окисления липидов тканей при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой. Труды московского общества испытателей природы. М 1975; 52: 73—78.
3. *Спасов А.А., Петров В.И., Анисимова В.А. и др.* Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса. М 2008; 336.
4. *Тибирькова Е.В., Косолапов В.А., Спасов А.А.* Антиоксидантные и мембранопротекторные свойства тролокса. Экспериментальная и клиническая фармакология 2009; 72: 47—50.
5. *Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А.* Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. Уфа 1995; 110.
6. *Beisswenger P., Ruggiero-Lopez D.* Metformin inhibition of glycation processes. Diabetes & Metabolism 2003; 29: 4: 95—103.
7. *Ceolotto G., Gallo A., Papparella I. et al.* Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2007; 27: 2627—2633.
8. *Ceriello A., Testa R.* Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. Diabetes Care 2009; 32: 232—236.
9. *Glavind J.* Antioxidants in animal tissue. Acta Chem Scand 1963; 17: 13: 1635—1640.
10. *Iida K.T., Kawakami Y., Suzuki M. et al.* Effect of thiazolidinediones and metformin on LDL oxidation and aortic endothelium relaxation in diabetic GK rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 284: 1125—1130.
11. *Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J. et al.* Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. Cardiovascular Diabetology 2005; 4: 5: http://www.cardiab.com/content/4/1/5
12. *Khouri H., Collin F., Bonnefont-Rousselot D. et al.* Radical-induced oxidation of metformin. Eur J Biochem 2004; 271: 4745—4752.
13. *Kinoshita H., Azma T., Iranami H. et al.* Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonists restore impaired vasorelaxation via ATP-sensitive K+ channels by high glucose. J Pharmacol Exp Ther 2006; 318: 1: 312—318.
14. *Noda Y., Mori A., Cossins E. et al.* Gliclazide scavenges hydroxyl and superoxide radicals: An electron spin resonance study. Metabolism 2000; 49: 2: Suppl 1: 14—16.
15. *Rahbar S., Natarajan R., Yerneni K. et al.* Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. Clin Chim Acta 2000; 301: 1—2: 65—77.
16. *Ruhe R.C., McDonald R.B.* Use of antioxidant nutrients in the prevention and treatment of type 2 diabetes. Journal of the American College of Nutrition 2001; 20: 5: 363—369.
17. *Sikora A., Btasiak J., Drzewosk J.* Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna rok 2006; 6: 1: 1—5.