

ВЛИЯНИЕ НА ПРОЦЕСС ГЛИКИРОВАНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

О.Л. Кулагин

Кафедра фармакологии (зав. — проф. А.А. Лебедев) Самарского государственного медицинского университета

При диагностике сахарного диабета наиболее часто определяют гликемию натощак и глюкозу в моче. Но эти исследования дают информацию о гликемии, имевшей место в момент исследования или в последние 5—6 часов (глюкоза в моче). Для назначения же пролонгированных форм инсулина требуется информация о периоде гликемии, равном дням и неделям. Для этого важное диагностическое значение имеет определение содержания фруктозамина.

Термином “фруктозамин” в клинике обозначают сумму гликированных белков сыворотки крови. Гликирование происходит обычно в результате неферментативной реакции, хотя нельзя исключить и ферментативное гликозилирование. Гликирование идет не только в крови, но и в тканях. В начале скорость гликирования и синтеза новых продуктов равна скорости их диссоциации (образуются основания Шиффа), на второй стадии образуются стабильные продукты гликирования (продукты Амадори). Для гликирования важны не только длительность гипергликемии, но и доступность аминокислотной группы белка. Формирование конечных продуктов гликирования изменяет структуру белка и является процессом, нарушающим структуру белков тканей, клеточные мембраны, структуру и функции клеток. По-видимому, эти изменения лежат в основе развития микроангиопатий, дисфункции почек, нервной системы.

Целью нашей работы являлась разработка способа скрининговой оценки средств, препятствующих гликированию и применение для этого ряда веществ, которые показали себя активными препаратами в опытах *in vitro*. В последующем эти препараты были исследованы в опытах на животных с экспериментальным аллоксановым диабетом.

Реакция неферментативного гликирования проводилась в опытах *in vitro* при температуре +37°C. Для гликирования был выбран 5% раствор сывороточного альбумина человека, в который добавляли глюкозу в концентрации 40 мМ и азид натрия (0,02%) для предотвращения развития микроорганизмов в среде. Уровень фруктозамина определяли в среде до начала инкубации, на 4 и 7-й дни. Результаты этих опытов были контрольными и сравнивались с таковыми при исследовании ряда фармакологических средств, добавленных в среду в концентрации 10^{-3} М. Такая стандартная концентрация была выбрана потому, что в организме она вполне вероятна и в то же время достаточно велика, чтобы не пропустить вещество, обладающее реальным эффектом.

Уровень фруктозамина определяли фотометрическим методом с тетразолием нитросиним при pH 10,3. Контролем служил полностью гликированный сывороточный альбумин человека, в микроляжах которого и оценивалось образование фруктозамина в испытуемой пробе.

Было изучено действие средств, которые *in vitro* оказывали эффект, на способность понижать уровень гликированности белков при аллоксановом диабете у крыс. Для этого у белых крыс массой 180—210 г вызывали диабет I типа путем внутрибрюшинного введения тетрагидрата аллоксана в дозе 80 мг/кг. После месячного перерыва из подъязычной вены крыс брали кровь и анализировали ее на содержание глюкозы и фруктозамина. Предполагалось, что уровни глюкозы и фруктозамина за это время стабилизируются. После этого крыс наблюдали еще в течение месяца, по окончании которого у них вторично забирали кровь и анализировали ее на содержание глюкозы и фруктозамина.

Влияние синтетических противодиабетических средств на процессы гликирования сывороточного альбумина человека при 37° С (в мкМ/л)

| Дни инкубации | Альбумин, глюкоза | Глиформин (метформин), глюкоза, альбумин | Гликлазид (диабетон), глюкоза, альбумин | Гликидон (глюренорм), глюкоза, альбумин | Глибенкламид (манинил), глюкоза, альбумин |
|------------------|-------------------|--|---|---|---|
| Перед инкубацией | 12,37±0,87 | 12,37±0,87 | 12,37±0,87 | 12,37±0,87 | 12,37±0,87 |
| 4-й день | 45,5±12,51 | 32,7±1,18 | 31,2±3,34 | 6,2±0,93 | 24,7±1,41 |
| Р | | < 0,02 | < 0,01 | < 0,001 | < 0,001 |
| 7-й день | 80,1±3,4 | 70,8±4,07 | 66,9±5,06 | 13,6±1,18 | 71,4±3,48 |
| Р | | > 0,05 | > 0,05 | < 0,001 | > 0,05 |
| 21-й день | 206,5±28,1 | — | — | 220,6±6,6 | — |
| Р | | | | > 0,05 | |

Другие группы крыс в течение второго месяца получали перорально фармакологические препараты, результаты применения которых оценивали по уровню глюкозы и фруктозамина также в конце второго месяца.

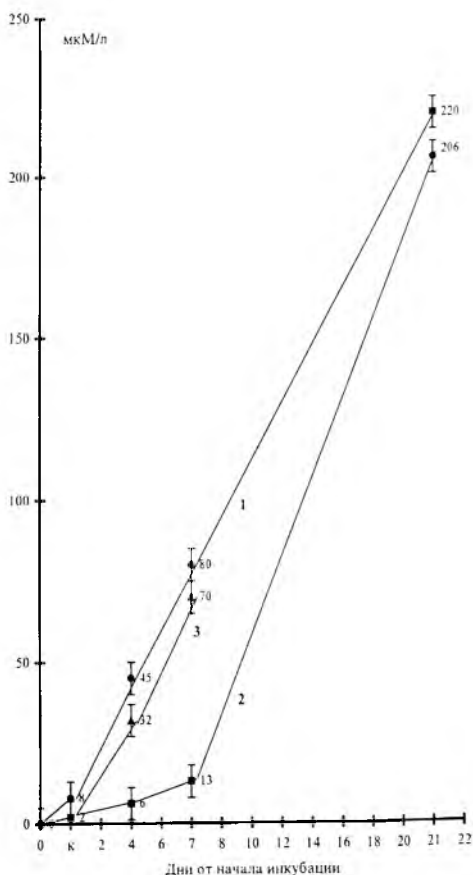
В табл. 1 показано увеличение уровня фруктозамина в среде инкубации при 37°С и концентрации глюкозы 40 мМ, а также влияние на этот процесс добавления в инкубационную среду метформина, диабетона, глюренорма, манинила.

Из табл. 1 следует, что инкубация глюкозы с белком вызывает высоко достоверное увеличение содержания фруктозамина в среде. До инкубации в среде также определяли небольшой уровень вещества, напоминающего фруктозамин, — формаза. Этот факт хорошо известен как результат реакции тетразолия нитросинего с белком. Контрольное гликирование свидетельствует о постоянном нарастании концентрации фруктозамина в среде. В конечном итоге его концентрация на 21-й день превышала исходный уровень в 16,7 раза. Различие было высокодостоверным как по сравнению с негликированным белком, так и между каждой из исследованных проб.

В этой же таблице показано влияние на процесс гликирования ряда синтетических противодиабетических средств по сравнению с соответствующим уровнем контрольной пробы. Метформин, диабетон, глюренорм и манинил на 4-й день инкубации статистически достоверно снижали образование фруктозамина, особенно глюренорм: 6,2±0,93 — в опыте по сравнению с 45,5±12,5 — в контроле ($P<0,001$). На 7-й день различие было замечено только для глюренорма, который продолжал уменьшать образо-

вание фруктозамина в отличие от остальных веществ. На 21-й день инкубации глюренорм не выявлял способности снижать образование фруктозамина. На рис. 1 показана интенсивность гликирования сывороточного альбумина человека глюкозой в контроле, при инкубации с глюренормом и метформинном.

Таким образом, синтетические противодиабетические средства заметно



Интенсивность гликированного сывороточного альбумина человека в мкМ/л с глюкозой в контроле (1), при инкубации с глюренормом (2), при инкубации с метформинном (3).

снижали образование фруктозамина только в ранние сроки инкубации, большинство веществ — на 4-й день, глюренорм — до 7-го дня в условиях “жесткого” гликирования.

Нами была изучена реакция гликирования при $+1-2^{\circ}\text{C}$. Заметное увеличение уровня фруктозамина отмечалось лишь на 16 и 30-й дни инкубации при этой низкой температуре. При этой температуре синтетические противодиабетические средства снижали на 40—50% уровень фруктозамина в среде независимо от срока инкубации. Иными словами, при более мягких условиях гликирования эффект препаратов становился более длительным и выраженным.

В серии опытов на крысах с аллоксановым диабетом мы изучали влияние синтетических противодиабетических средств при их длительном (в течение месяца) применении. Дело в том, что эти опыты могли иметь значение при стабильно повышенном в течение длительного времени уровне глюкозы в крови, так как его снижение в течение месяца само по себе могло уменьшить уровень гликированности белков.

Нами были проведены опыты на здоровых крысах. Уровень глюкозы в группе 9 интактных крыс был равен $3,37 \pm 0,19$ мМ/л, а уровень фруктозамина — $3,98 \pm 1,05$ мкМ полностью гликированного сывороточного альбумина человека.

Таблица 2

Влияние синтетических противодиабетических средств на уровень фруктозамина у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом ($M \pm m$)

| Вещества, вводимые крысам с аллоксановым диабетом в течение месяца, доза | Углеводы в крови | До начала введения препарата | Через месяц после введения препарата |
|--|---------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Глибенкламид (манинил), 0,35 мг/кг/сут | глюкоза (мМ/л) фруктозамин (мкМ/л) | $7,56 \pm 0,28$ $15,25 \pm 0,79$ | $7,87 \pm 0,95$ $10,99 \pm 1,74$ $P > 0,05$ $P < 0,01$ |
| Глиформин (метформин), 30 мг/кг/сут | глюкоза (мМ/л) фруктозамин (мкМ/л) | $6,93 \pm 0,31$ $20,29 \pm 2,5$ | $7,49 \pm 0,51$ $12,63 \pm 1,36$ $P > 0,05$ $P < 0,02$ |
| Гликовидон (глюренорм), 2 мг/кг/сут | глюкоза (мМ/л) фруктозамин (мкМ/л) | $8,69 \pm 1,09$ $16,08 \pm 2,01$ | $8,10 \pm 1,14$ $10,02 \pm 1,37$ $P > 0,05$ $P < 0,02$ |

В табл. 2 приведены результаты опытов на крысах с аллоксановым диабетом. Во всех группах мы наблюдали повышение среднего уровня глюкозы в крови в 2,0—2,5 раза, а также фруктозамина в 3—5 раз через месяц после введения аллоксана. После месячного введения манинила, метформина, глюренорма отмечено, что уровень глюкозы в крови ни в одной из групп не изменился статистически достоверно, и средние его величины были близки друг к другу, что и понятно, так как у крыс нами был воспроизведен I тип диабета. Однако уровень фруктозамина был везде ниже на 25—30% по сравнению с контролем. Эти данные подтверждают возможность непосредственного влияния синтетических противодиабетических средств на процесс гликирования независимо от уровня глюкозы в крови. Наши результаты соответствуют данным [2], полученным в аналогичных опытах для одного из синтетических противодиабетических средств — букарбана.

Механизм описанного эффекта синтетических противодиабетических средств заслуживает внимания прежде всего потому, что показывает возможность уменьшать гликирование белков в крови. Длительное и значительное повышение концентрации глюкозы в крови сопровождается гликированием белков не только крови, но и тканей и ведет к конформационным изменениям белковых молекул. Нами, по данным флуоресцентного анализа [1], было показано, что гликирование вызывает изменение конформации белковых молекул. Известно также, что при гликировании между молекулами белка образуются дополнительные связи, которые еще более изменяют функции белковой молекулы [7, 10]. Поэтому при уменьшении гликирования наблюдается менее быстрое развитие осложнений диабета (микроангиопатии, нейропатии, нефропатии). Одним из первых исследованных с этой целью соединений был аминоксантидин [3, 4, 9]. Весьма вероятно, что синтетические противодиабетические средства могут составить второй класс таких соединений. Их аминоксантидин конкурирует с аминоксантидином за соединение с молекулой глюкозы или фруктозы, что уменьшает гликирование белка.

Однако возможен и второй вариант их действия — изменение конформации белковой молекулы, которая делает аминоксигруппу лизина менее доступной для альдегидной группы сахара, что препятствует гликированию. Результаты данной работы, во-первых, показывают еще один эффект синтетических противодиабетических средств и тем самым расширяют понимание механизма их действия. Во-вторых, они показывают перспективность поиска в данной группе средств, обладающих более сильным эффектом на процесс гликирования белков.

ВЫВОДЫ

1. Синтетические противодиабетические средства (глиформин, гликлазид, гликвидон, глибенкламид) обладают способностью в опытах *in vitro* уменьшать процесс гликирования при инкубации высоких концентраций глюкозы с сывороточным альбумином человека.

2. При более мягком режиме гликирования эффект препаратов становится более длительным и выраженным.

3. При инкубации в жестком режиме, когда гликирование происходит в 4—6 раз более интенсивно, эффект угнетения гликирования для большинства препаратов, кроме гликвидона, не отмечается.

4. При введении в течение месяца крысам с аллоксановым диабетом глиформина, гликвидона и глибенкламида наблюдается снижение уровня гликированности белков при неизменной концентрации глюкозы.

1. Кулагин О.Л., Булатова М.В. Тезисы докладов VI Российского национального конгресса "Человек и лекарство". — М., 1999.

2. Лебедева Е.А. // Экспер. и клин. фармакол. — 1966. — № 5. — С. 40—42.

3. Bhatt Z., Terlesky J., Manjila B. Diabetes. Abst. Book 56-th annual Meeting and Scientific Session, 130A-130A (1996).

4. Browill M., Vlassara H., et al. // Science. — 1966. — Vol. 232. — P. 1629—1631.

5. Katsuno K., Kobayashi M., Baba Y. Abst. European assoc. for the study of diabetes. — Vienna, A138-A138 (1996).

6. Obayashi H., Nakano K., Shigato H. // Diabetologia. — 1997. — Vol. 40. — P. 492.

7. Ramanakoppa H., Nagaraj N., Shipanova J., Faust F.M. Diabetes. Abst. book 56-th Annual Meeting and Scientific Session. (1996).

8. Tumiya Sato, K. Katsuno et al. Diabetes. Abst. Book 56-th Annual Meeting and Scientific Session. (1996).

9. Yousset S., Soulis T., Cooper M.E. Abst. European assoc. for the study of diabetes. — P.23—P.23 (1996).

10. Vasan S., Netram N., Zhang X. Diabetes. Abst. book 56-th Annual Meeting and Scientific Session, 72A-72A (1996).

11. Vlassara H., Bownlee M., Cerami A. // J. Exp. Med. — 1984. — Vol. 60. — P. 197—207.

Поступила 10.02.00.

EFFECT OF SYNTHETIC ANTIDIABETIC AGENTS ON THE SERUM ALBUMIN GLYCATION PROCESS

O.L. Kulagin

Summary

Synthetic antidiabetic agents (glyphormin, glyclaside, glycidone, glybenclamide) in incubation of high concentrations of glucose with human serum albumin in experiments *in vitro* can diminish glycation process. In mild glycation regime the effect of agents becomes more prolonged and pronounced. The protein glycation leveled in constant glucose concentration in rats with alloxan induced diabetes decreases while injecting them with glyphormin, glycidone and glybenclamide during a month.