

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

АНТИАГРЕГАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, Б. П. Майстренко¹

Проведено сравнительное исследование влияния гипогликемических препаратов гликлазида, глибенкламида, глюкофажа, росиглитазона, нового сахароснижающего средства диабенола и антиагрегантного препарата ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную АДФ *in vitro*. Все изученные соединения оказали дозо-зависимое антиагрегантное действие. Наиболее выраженную активность в сравнении с ацетилсалициловой кислотой проявили диабенол, гликлазид и глибенкламид. При сравнении максимальных концентраций изученных препаратов в плазме крови (литературные данные) с полученной нами ЭК₂₅ *in vitro*, можно предположить, что гликлазид и диабенол в условиях клиники проявят прямое антиагрегантное действие. Глибенкламид, глюкофаж и росиглитазон могут оказывать прямое антиагрегантное действие только в концентрациях, значительно превышающих их терапевтические концентрации в крови.

Ключевые слова: гипогликемические средства, агрегация тромбоцитов

ВВЕДЕНИЕ

Согласно клиническим рекомендациям зарубежных и российских стандартов лечения сахарного диабета (СД) [9, 13], схемы назначения лекарственных средств помимо сахароснижающей терапии включают использование антиагрегантных препаратов для профилактики диабетических ангиопатий. На сегодняшний день у эндокринологов есть достаточный выбор препаратов, обладающих выраженным гипогликемическим эффектом. Но при этом необходимо, чтобы кроме эффективного снижения гликемии препараты обладали дополнительными свойствами — снижали риск развития осложнений СД. Наличие у препарата антиагрегантных свойств является выгодным преимуществом в терапии СД. Из известных гипогликемических препаратов подобное действие описано у производных сульфонилмочевины и бигуанидов [3, 17], однако, не уточняется, является ли это действие прямым или связано с контролем уровня гликемии. Исключением является гликлазид, у которого описано прямое антиагрегантное действие [3]. Поэтому, представилось интересным провести сравнительную оценку антиагрегантной активности известных гипогликемических средств различных групп и выяснить, является ли эта активность самостоятельной или зависит от их гипогликемического действия.

Таким образом, целью данного исследования явилось сравнение антиагрегантной активности *in vitro* нового сахароснижающего средства диабенола [11] и известных гипогликемических препаратов гликлазида, глибенкламида, глюкофажа, росиглитазона, используемых для лечения СД II типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе проведено сравнительное экспериментальное исследование влияния производных сульфонилмочевины: гликлазида (“Servier”, Франция) и глибенкламида (“Asta Medica AG”, Москва), препарата группы бигуанидов — глюкофажа (“Nycomed”, Франция), тиазолиндиона — росиглитазона (“Гедеон Рихтер АО”, Венгрия) и нового препарата диабенола (дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил 2,3-дигидроимидазо(1,2-а)бензимидазол, НИИ ФОХ РГМУ) [8], который прошел III фазу клинических испытаний. Эксперименты выполнены на 15 кроликах породы шиншилла, весом 2,5–3,5 кг, содержащихся в условиях вивария (температура 22–24 °С, относительная влажность воздуха 40–50 %) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258–92), соблюдая правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3–96 и 1000.4–96), а также Правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

Кровь брали из ушной вены и стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об./мин, после чего верхний слой плазмы перенесли в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об./мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами. Влияние препаратов на агрегацию тромбоцитов изучали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации (модель 220 LA) Научно-производственной фирмы “Биола” (Москва). Определение агрегации тромбоцитов проводили по методу G. Born (1962) в модификации З. А. Габбасова и др. [4].

¹ Кафедра фармакологии (зав. — член-корр. РАМН А. А. Спасов) Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 400131, Площадь Павших борцов, 1.

Исследуемые вещества в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$ М добавляли в кювету агрегометра за 5 мин до внесения индуктора. В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) фирмы "Reanal" (Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (Россия). Гликлазид, росиглитазон, глибенкламид и ацетилсалициловую кислоту растворяли в ДМСО (ООО РОЗФАРМ, Россия) в концентрации, в которой данный растворитель не вызывал агрегацию тромбоцитов. Остальные препараты растворяли в дистиллированной воде. Для всех соединений и препарата сравнения были экспериментально определены величины ЭК₂₅ (эффективные концентрации, подавляющие процесс агрегации тромбоцитов на 25 %) с использованием метода регрессионного анализа в программе Microsoft Excell 2003.

Статистическую обработку результатов проводили в электронной таблице Excell 5.0 с использованием *t*-критерия Стьюдента и парного критерия Вилкоксона при помощи пакета статистических программ программного обеспечения Microsoft Excell 2006.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о способности всех изученных гипогликемических препаратов и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты в экспериментах *in vitro* оказывать дозо-зависимое антиагрегантное действие. Данные о влиянии гипоглике-

мических средств на агрегацию тромбоцитов представлены в табл. 1. Все изученные препараты в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ за исключением диабенола ингибировали агрегацию тромбоцитов меньше, чем на 50 %. Поэтому для всех веществ была определена ЭК₂₅. Так, ЭК₂₅ для гликлазида составила 23,66 мкМ/л, что незначительно превосходило ЭК₂₅ глибенкламида, но в 10,3 раза уступало ЭК₂₅ диабенола. По способности подавлять агрегацию тромбоцитов *in vitro* эти три вещества оказались активнее ацетилсалициловой кислоты. При этом диабенол в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М практически полностью блокировал тромбоцитарное взаимодействие. При дальнейшем уменьшении концентрации его антиагрегационный эффект также был достоверным, но становился менее выраженным. ЭК₂₅ диабенола, гликлазида, глибенкламида превосходила ацетилсалициловую кислоту в 14,5; 1,4 и 1,27 раза соответственно. Глюкофаж, наоборот, незначительно уступал препарату сравнения, а антиагрегантная активность росиглитазона оказалась самой низкой, причем ЭК₂₅ этого препарата в 4,26 раза была меньше ЭК₂₅ ацетилсалициловой кислоты.

Таким образом, наибольшую активность в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов в сравнении с ацетилсалициловой кислотой проявили диабенол, гликлазид и глибенкламид. Остальные средства уступали по активности препарату сравнения.

На сегодняшний день известно, что важным составляющим элементом в механизме развития микроангиопатии при СД является дисфункция тромбоцитов [5]. В физиологических условиях одна из главных ролей в инициации первых этапов активации кровяных пластинок принадлежит АДФ, которая активирует фосфолипазы гранулярной и плазматической мембран, что ведет к высвобождению арахидоновой кислоты, которая превращается в лабильный циклический эндопероксид, а затем в тромбоксан А₂, стимулирующий реакцию высвобождения и агрегацию тромбоцитов [2]. Нарушение тромбоцитарной реактивности при СД связывают именно с нарушением баланса простагландинов, т.е. с повышением уровня проагреганта и вазоконстриктора тромбоксана А₂ и снижением концентрации антиагреганта и вазодилататора простаглицлина. Известно, что гликлазид снижает уровень тромбоксана В₂ (метаболит тромбоксана А₂) и увеличивает синтез 6-кетопроستاглицлина (метаболит простаглицлина) [15]. Что касается диабенола, то в проведенных нами ранее исследованиях было показано, что данное сред-

Таблица 1. Влияние гликлазида, глибенкламида, глюкофажа, росиглитазона, диабенола и ацетилсалициловой кислоты на АДФ-индуцируемую агрегацию тромбоцитов (опыты *in vitro*, *n* = 4), $M \pm m$

Препарат	Концентрация, М	Ингибирование агрегации тромбоцитов в % по отношению к контролю	ЭК ₂₅ , мкМ/л
Диабенол	$1 \cdot 10^{-4}$	86,47 ± 3,90	2,29
	$1 \cdot 10^{-5}$	46,34 ± 4,21	
	$1 \cdot 10^{-6}$	12,97 ± 2,83	
Гликлазид	$1 \cdot 10^{-4}$	37,86 ± 4,72	23,66
	$1 \cdot 10^{-5}$	13,61 ± 2,32	
	$1 \cdot 10^{-6}$	3,03 ± 0,77	
Глибенкламид	$1 \cdot 10^{-4}$	34,72 ± 3,66	26,27
	$1 \cdot 10^{-5}$	17,12 ± 1,16	
	$1 \cdot 10^{-6}$	3,29 ± 0,78	
Глюкофаж	$1 \cdot 10^{-4}$	32,64 ± 2,61	37,0
	$1 \cdot 10^{-5}$	10,69 ± 0,97	
	$1 \cdot 10^{-6}$	6,07 ± 0,90	
Росиглитазон	$1 \cdot 10^{-3}$	39,75 ± 5,5	142,84
	$1 \cdot 10^{-4}$	23,77 ± 3,78	
	$1 \cdot 10^{-5}$	2,36 ± 0,57	
Ацетилсалициловая кислота	$1 \cdot 10^{-4}$	32,88 ± 1,73	33,5
	$1 \cdot 10^{-5}$	16,07 ± 0,89	
	$1 \cdot 10^{-6}$	0,47 ± 0,47	

Таблица 2. Максимальные концентрации в плазме крови (C_{max}) и ЭК₂₅ гликлазида, диабенола, глибенкламида, глюкофажа и росиглитазона (в мг/кг)

Названия препаратов	C_{max} , мг/кг	ЭК ₂₅ , мг/кг
Диабенол	1 – 3,25 [10]	0,7
Гликлазид	2 – 8 [6]	7,6
Глибенкламид	0,189 [7]	12
Глюкофаж	2 [14]	6
Росиглитазон	0,076 [1]	67

ство снижает синтез тромбосана A_2 и не влияет на синтез простаглицина интактных животных, но восстанавливает его продукцию в условиях патологии [12].

Таким образом, анализ полученных результатов и литературных данных дает основание предполагать, что изученные нами гипогликемические средства могут оказывать влияние на синтез простаглицидов и, следовательно, уменьшать гиперагрегацию тромбоцитов.

Однако наши опыты были выполнены *in vitro*, поэтому перед нами встал вопрос о том, будут ли данные препараты в изученных нами дозах оказывать антиагрегантный эффект у больных СД. Иными словами, мы решили посмотреть, как соотносятся значения максимальных концентраций (C_{max}) изученных гипогликемических препаратов в крови с их $ЭК_{25}$, полученными нами *in vitro*. Как видно из результатов, представленных в табл. 2, C_{max} гликлазида в плазме крови составляет 2 – 8 мг/кг [6], что соответствует $ЭК_{25}$ данного препарата, полученной нами *in vitro* (7,6 мг/кг). Это свидетельствует о том, что антиагрегантный эффект гликлазида является прямым. То же самое можно сказать и о диабеноле. $ЭК_{25}$ данного препарата также сопоставима с его C_{max} [10] в плазме крови. При сравнении этих же показателей у глибенкламида [7] и росиглитазона [1] мы можем предположить, что в клинических условиях прямой антиагрегантный эффект этих препаратов не проявится. Несмотря на то что в литературе описана способность глибенкламида снижать риск прогрессирования диабетических осложнений [17], этот эффект является опосредованным и проявляется, видимо, за счет снижения уровня гликемии. В отношении глюкофажа [14] можно также предположить, что антиагрегантный эффект его не является прямым, а способность улучшать тромбогенный потенциал крови скорее всего связана с описанной в литературе фибринолитической активностью [16].

Таким образом, проведенный нами сравнительный анализ антиагрегантной активности гипогликемических средств свидетельствует о том, что гликлазид и диабенол способны снижать реактивность тромбоцитов вне зависимости от уровня гликемии.

ВЫВОДЫ

1. По силе антиагрегантного действия *in vitro*, гипогликемические средства и ацетилсалициловая кислота

располагаются в следующем порядке: диабенол > гликлазид > глибенкламид > ацетилсалициловая кислота > глюкофаж > росиглитазон.

2. Эффективная антиагрегантная концентрация диабенола и гликлазида, полученная *in vitro*, соответствует их максимальным терапевтическим концентрациям в крови при лечении сахарного диабета.

3. Глибенкламид, глюкофаж и росиглитазон могут оказывать прямое антиагрегантное действие в концентрациях, превышающих их максимальные терапевтические концентрации в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, *Русский мед. ж.*, **14**(15), 1107 – 1116 (2006).
2. В. П. Балуда, М. В. Балуда, И. И. Деянов, И. К. Глепшуков, *Физиология системы гемостаза*, Москва (1995).
3. Г. Викс, *Укр. мед. ж.*, № 3 (29), 7 – 11 (2002).
4. З. А. Габбасов, Е. Г. Попов, И. Ю. Гаврилов и др., *Лаб. дело*, № 10, 15 – 18 (1989).
5. Г. Р. Галстян, *Русск. мед. ж.*, № 27, 1266 – 1271 (2002).
6. Р. В. Гурто, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Томск (2008).
7. З. В. Заборовская, А. П. Шепелькевич, *Лечение сахарного диабета 2 типа современными таблетированными сахароснижающими препаратами*, Белпринт, Минск (2005).
8. Г. В. Ковалев, А. А. Спасов, В. А. Анисимова и др., 2061481 РФ, *Бюлл. Открыт.*, № 16 (1996).
9. С. Г. Козлов, А. А. Лякишев, *Русск. мед. ж.*, № 9, 525 – 530 (2003).
10. Л. А. Смирнова, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Волгоград (2004).
11. А. А. Спасов, В. И. Петров, В. А. Анисимова и др., *Всероссийский диабетологический конгресс*, Тезисы докладов, Москва (2008), 336.
12. А. Ф. Турчаева, Г. П. Дудченко, *Новые материалы и методы в медицине*, Т. 51, Вып. 2, Волгоград (1995), с. 22.
13. D. J. Angiolillo, *Curr. Opin Endocrinol Obes*, **14**(2), 24 – 31 (2007).
14. C. J. Bailey, and R. C. N. Tumer, *Engl. J. Med.*, **334**, 574 – 579 (1996).
15. J. J. Fu, T. Yan, Y. Z. Chen, and J. Q. Sang, *Metabolism*, N. 41, 33 – 35 (1992).
16. S. A. Najeed, I. A. Khan, J. Molnar, and J. C. Somberg, *Am. J. Cardiol*, **90**(10), 1103 – 1106 (2002).
17. D. Siluk, R. Kaliszan, P. Haber, et al., *Diabetologia*, **45**, 1034 – 1037 (2002).

Поступила 29.04.09

ANTIAGGREGANT ACTIVITY OF HYPOGLYCEMIC DRUGS

A. A. Spasov, A. F. Kucheryavenko, and B. P. Maistrenko

Department of Pharmacology, Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131, Russia

We have compared the inhibitory effects of a series of hypoglycemic drugs, including glyclazide, glibenclamide, glucophage, rosiglitazone, diabenol (a new antidiabetic drug), and acetylsalicylic acid (reference antiaggregant preparation), on rabbit platelet aggregation *in vitro* induced by adding 5 mM ADP solution. All hypoglycemic drugs and acetylsalicylic acid inhibited platelet aggregation in a dose-dependent manner. Diabenol, glyclazide and glibenclamide demonstrated the most pronounced activity in comparison to that of acetylsalicylic acid. A comparison of the published data on maximum drug concentrations in the blood plasma (C_{max}) and the values of effective concentrations (EC_{25}) of drugs determined in this study suggests that diabenol and glyclazide will produce direct antiaggregant effect under clinical administration conditions. At the same time, it is concluded that the antiaggregant effect of glibenclamide, glucophage and rosiglitazone is indirect and can only be pronounced at concentrations significantly exceeding the therapeutic level.

Key words: Hypoglycemic drugs, platelet aggregation