

# Влияние метформина на биодоступность оксида азота у пациентов с сахарным диабетом 2 типа

<sup>1</sup>Кузнецов И.С., <sup>2</sup>Сереженков В.А., <sup>2</sup>Ванин А.Ф., <sup>1</sup>Романцова Т.И.

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва (ректор – член-корреспондент РАМН, профессор, доктор медицинских наук П.В. Глыбочко)

<sup>2</sup>Институт химической физики им Н.Н. Семенова РАН, Москва (директор ИХФ РАН – академик РАН А.А. Берлин)

**Резюме.** Целью проведенного нами исследования являлась оценка уровня нитритов в плазме и метгемоглобина в цельной крови методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа на фоне приема метформина. Через 3 месяца постоянного приема препарата в дозе 1700 мг параллельно с улучшением показателей углеводного и липидного обменов, уменьшением окружности талии отмечалось статистически значимое увеличение концентрации нитрита в плазме и повышение метгемоглобина в цельной крови. Увеличение биодоступности оксида азота на фоне лечения метформином может являться дополнительным объяснением механизма действия препарата. *Ключевые слова:* биодоступность оксида азота, сахарный диабет 2 типа, метформин, нитрит, метгемоглобин.

**Effect of metformin on the bioavailability of nitric oxide in patients with type 2 diabetes**  
Kuznetsov I.S., Serezhnikov V.A., Vanin A.F., Romantsova T.I.

**Resume.** The aim of our study was to evaluate the levels of nitrite in plasma and methemoglobin in whole blood using electron paramagnetic resonance (EPR) in patients with type 2 diabetes mellitus receiving metformin. After 3 months of continuous use of the drug at a dose of 1700 mg in parallel with the improvement of carbohydrate and lipid metabolism, reduction in waist circumference there was a statistically significant increase in nitrite concentration in plasma and increased methemoglobin in whole blood. Increased bioavailability of nitric oxide during treatment with metformin may be an additional explanation for the mechanism of drug action. *Keywords:* bioavailability of nitric oxide, type 2 diabetes mellitus, metformin, nitrite, methemoglobin.

## Введение

Исследования последних лет показали, что одним из важнейших патогенетических факторов сахарного диабета 2 типа (СД2) и метаболического синдрома (МС) является окислительный стресс [25]. При данном состоянии, помимо модификации различных молекул свободными радикалами, отмечают снижение биодоступности оксида азота (NO) [21, 22].

NO является важнейшим медиатором сопровождения множества функций в организме, включая процессы вазодилатации, антикоагуляции, адгезии лейкоцитов, пролиферации клеток гладкой мускулатуры, а также обеспечения антиоксидантных эффектов эндотелия. Синтез оксида азота осуществляется путем окисления L-аргинина с участием NO-синтазы (NOS).

Снижение биодоступности NO может быть обусловлено рядом причин. Супероксид анион радикал способен реагировать с NO с образованием пероксинитрита. Пероксинитрит – сильнейший оксидант, способный изменять функцию различных клеточных ферментов [4], в том числе и эндотелиальной NO-синтазы, что дополнительно приводит к снижению образования NO [16, 28]. Еще одним путем уменьшения образования NO может являться снижение доступности тетрагидроптерина (ключевого ко-фактора для NOS),

что наблюдается при окислительном стрессе. В таких условиях NO-синтаза в основном продуцирует супероксид анион радикал, а не NO [8]. Увеличение активных форм кислорода усиливает образование продуктов перекисного окисления липидов, которые негативно влияют на лиганд-опосредованную активацию эндотелиальной NOS, при этом понижается уровень NO в различных тканях [15, 23].

В связи с большими методологическими трудностями прямого измерения концентрации NO в организме, многие исследователи оценивают уровень стабильных продуктов его окисления в организме – нитритов и нитратов [14]. Данные параметры отражают эндогенный синтез NO у человека и млекопитающих [12]. Наиболее подходящим параметром для оценки изменений синтеза NO при различных фармакологических воздействиях является уровень нитрита в плазме. Это связано с тем, что в биологических жидкостях NO специфически окисляется до нитрита [7]. При прямом взаимодействии NO с гемоглобином образуется метгемоглобин.

Целью данной работы являлась оценка уровня нитритов в плазме и метгемоглобина в цельной крови методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), используя спиновую дитикарбаматную ловушку (МДГ), у пациентов с сахарным диабетом 2 типа до и на фоне лечения метформином.

### Материалы и методы

Данное исследование выполнено на базе 1-го отделения эндокринологии клинической больницы №2 Первого Московского государственного медицинского университета им И.М. Сеченова и Окружного эндокринологического поликлинического отделения ЮВАО г. Москвы. Для проведения исследования была сформирована группа из 43 пациентов (31 женщина и 12 мужчин). У всех пациентов был диагностирован СД2 в сочетании с абдоминальным ожирением, 60% имели артериальную гипертензию, у 58% отмечалось повышение холестерина, триглицеридов, снижение липопротеинов высокой плотности. В целом, все пациенты соответствовали критериям МС, предложенным в 2005 г. Международной диабетической федерацией (IDF) [3]. Средний возраст составил  $54,5 \pm 5,7$  лет. Основными критериями исключения из исследования являлись нарушение функции почек (клиренс креатинина менее 60 мл/мин), нарушение функции печени, острые и хронические заболевания, которые могут приводить к развитию тканевой гипоксии (сердечная и дыхательная недостаточность), хронический алкоголизм, постоянный прием препаратов из группы органических нитратов.

Исследование продолжалось в течение 15 недель (2 недели – обследование и обучение в школе для больных с СД2, 13 недель – лечение и динамическое обследование). За время исследования пациентами было сделано 6 визитов. Первый визит – стартовый, второй через 2, третий – через 3, четвертый визит – через 5, пятый – через 9, шестой – через 13 недель после начала наблюдения. На втором визите пациентам была рекомендована терапия метформином в дозе 850 мг в вечерний прием пищи, на третьем визите доза метформина увеличивалась до 1700 мг в сутки, при условии удовлетворительной переносимости препарата. При необходимости назначалась гипотензивная терапия для достижения целевых значений АД ниже 130/80 мм рт. ст. Рекомендованные препараты не относились к группе органических нитратов. Гиполипидемическая терапия не назначалась.

На каждом визите проводился физикальный осмотр, оценивались антропометрические показатели (масса тела, индекс массы тела (ИМТ)  $\text{кг}/\text{м}^2$ ), окружность талии (ОТ), измерялось АД. За период наблюдения из исследования выбыли 11 человек в связи с прекращением приема метформина или низкой комплаентностью. Лабораторные исследования проводились между первым и вторым визитами и после окончания срока наблюдения. В венозной сыворотке анализировался уровень гликированного гемоглобина ( $\text{HbA}_{1c}$ ) (определяли с помощью прибора D10 (Bio – Rad)), холестерин (прибор Architec с 8000 (Abbot), США), триглицериды (прибор Architec с 8000 (Abbot), США), ЛВП (прибор Architec с 8000 (Abbot), США), ЛПНП (расчет по формуле Фридвальда).

Молекула NO является радикалом, то есть имеет неспаренный электрон, что делает удобным применение метода ЭПР для ее регистрации с помощью липидо- и водорастворимых спиновых ловушек [1]. В качестве последних используют дитиокарбоматы

и сульфат железа (2+). Парамагнитный мононитрозильный комплекс (МНИК) N-метил-D-глюкозамин дитиокарбомат (МГД) железа имеет характерный ЭПР сигнал со значениями g-фактора:  $g_1=2,035$  и  $g_2=2,02$ . Данный способ использован нами для восстановления нитритов в сыворотке при слабокислых значениях pH до NO в присутствии ловушки с образованием МНИК МГД – Fe–NO. До измерений быстрозамороженная (15–25 секунд – время замораживания в жидком азоте) сыворотка человека хранится при 77К. К 0,5–1 мл сыворотки добавляли цистеин (20 мМ), МГД (10 мМ) сульфат железа, Нерес-буфер (15 мМ) и доводили pH до 6.0 соляной кислотой. Через 5 минут отбирали часть образца для замораживания и записи ЭПР спектров при 77К и при 20 С. К оставшейся пробе добавляли известное количество нитрита 2–20 мкМ в качестве внутреннего стандарта. Методом двойного интегрирования оценивали концентрацию нитрита в сыворотке крови. В качестве стандарта сравнения использовали приготовленный МНИК МГД – Fe–NO с известным количеством железа, обработанного в вакууме в колбе Тунберга газообразным NO. Условия записи спектров ЭПР на приборе ECS-106 фирмы Брукер (Германия): резонатор TE-102,  $H=336$  мТ, развертка поля 20 мТ, Р-мощность СВЧ источника 20 мВт, усиление 105, амплитуда модуляции 0,5 мТ,  $\tau=0,163$  с, X-диапазон (рис. 1).

Обработка результатов проводилась на персональном компьютере с использованием программы Excel 2003. Оценка значимости разности выборочных статистик сравниваемых выборок относительно стандартной ошибки этой разности осуществлялась с помощью критерия Стьюдента. Достоверным считалось достижение уровня значимости (p) менее 0,05.

### Результаты обследования и обсуждение

Все пациенты, вошедшие в наше исследование, соответствовали критериям метаболического синдрома по классификации IDF от 2005 г. [3]. Исходно у всех

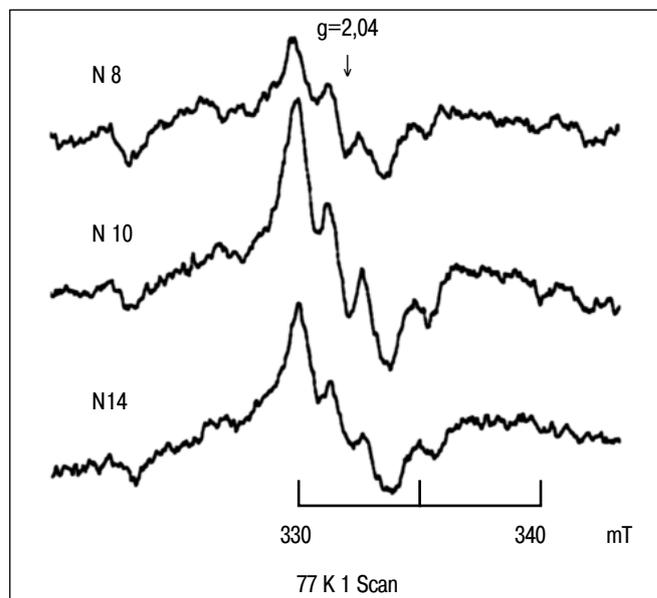


Рис. 1. Спектры ЭПР комплекса (МГД) 2-Fe-NO пациентов после 3-месячной терапии метформином. Спектр 8 – пациент П., спектр 10 – пациент Р., спектр 14 – пациент О.

Таблица 1

Изменение антропометрических показателей, параметров углеводного, липидного обмена, обмена NO на фоне лечения 3-месячного лечения метформином

Параметры	До лечения (M±STD)	На фоне лечения (M±STD)	t-критерий	p
ИМТ	33,04±3,42	31,37±2,94	0,47	p>0,05
ОТ, см	106,71±6,96	101,87±4,92	0,56	p>0,05
HbA <sub>1c</sub> , %	7,39±0,42	6,7±0,43	1,16	p>0,05
Общий холестерин, ммоль/л	6,27±0,74	6,0±0,67	0,27	p>0,05
Триглицериды, ммоль/л	1,93±0,46	1,75±0,34	0,56	p>0,05
ЛПВП, ммоль/л	0,94±0,19	1,02±0,14	0,36	p>0,05
ЛПНП, ммоль/л	3,18±0,6	2,91±0,51	0,34	p>0,05
Нитрит (плазма), мкмоль/дл	0,1±0,19	0,62±0,14	2,36	p<0,05
Метгемоглобин (плазма), мкмоль/л	0,98±0,26	2,22±0,69	1,68	p>0,05

Для n=32, t<sub>0,05</sub>=2,04

больных отмечались неудовлетворительные показатели углеводного обмена.

Через 12 недель после назначения метформина мы получили улучшение показателей углеводного обмена у всех пациентов, взятых под наблюдение (табл. 1).

До начала исследования у 84,3% пациентов уровень гликированного гемоглобина превышал 7,0%, 15,7% имели значение менее 7,0%, однако это значение было более 6,5%. По окончании исследования у 68,5% значения гликированного гемоглобина регистрировались ниже 7,0%, у 31,5% превышали 7,0%, однако отмечалось снижение этого показателя (рис. 2).

При анализе антропометрических параметров обнаружено снижение ОТ и ИМТ, однако статистически значимых отличий не найдено. При исследовании параметров липидного спектра также не обнаружено достоверных различий в результатах (табл. 1). При сопоставлении уровней холестерина, триглицеридов до и после лечения отмечается тенденция к их снижению: 6,27±0,74; 6,0±0,67 и 1,93±0,46; 1,75±0,34 соответственно.

При измерении уровня нитрита методом ЭПР до момента назначения метформина нами получены низкие его концентрации или полное отсутствие у некоторых пациентов (M=0,1 мкмоль/л). По истечении срока наблюдения в сыворотке пациентов было отмечено статистически значимое увеличение концентрации нитритов (p<0,05) и незначимое увеличение метгемоглобина (p>0,05) (рис. 3, 4, 5, табл. 1).

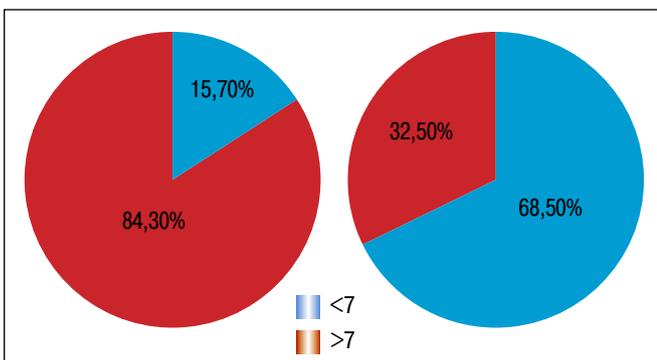


Рис. 2. Динамика значений уровня гликированного гемоглобина у пациентов до и на фоне лечения метформином

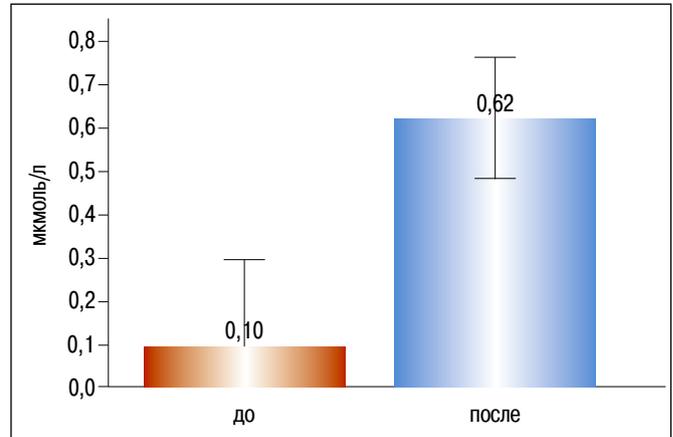


Рис. 3. Концентрации нитрита в плазме крови пациентов до и после лечения метформином

Концентрация нитритов в плазме в норме достигает значения 0,3–3 мкмоль/л, нитратов – 30–60 мкмоль/л [24]. Содержание нитритов в плазме крови человека незначительно и находится на уровне чувствительности основного применяемого метода – метода Грисса. Поэтому, как правило, проводятся исследования с учетом предположения о том, что сумма нитратов и нитритов адекватно отражает биохимические процессы. Для этого нитраты восстанавливают до нитритов и методом Грисса оценивают их значения.

В литературе имеются экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о том, что различные компоненты МС (гипергликемия, повышение холестерина и триглицеридов, АД и увеличение ОТ) влияют на концентрации метаболитов NO [2, 13].

Процесс метаболизирования NO в организме человека и животных можно разделить на три составляющих. Первое – управляемое окисление NO на гемовых группах белков (как правило, гемоглобине и миоглобине) до нитрата (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) при достаточном количестве глутатиона. Второе – прямое окисление NO, раство-

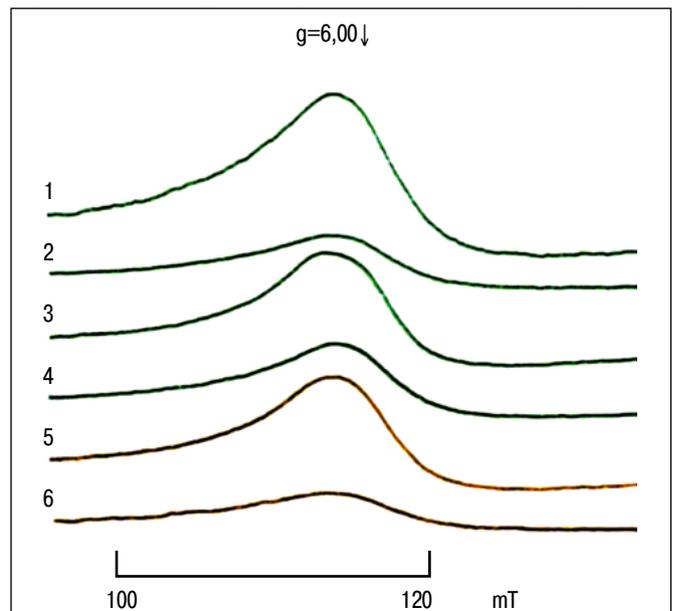


Рис. 4. Спектры ЭПР замороженной цельной крови пациентов до и после лечения метформином. Спектры 1 и 2 – пациент Р., спектры 3 и 4 – пациент О., спектры 5 и 6 – пациент П. Спектры 1, 3, 5 до терапии метформином; спектры 2, 4, 6 после терапии метформином

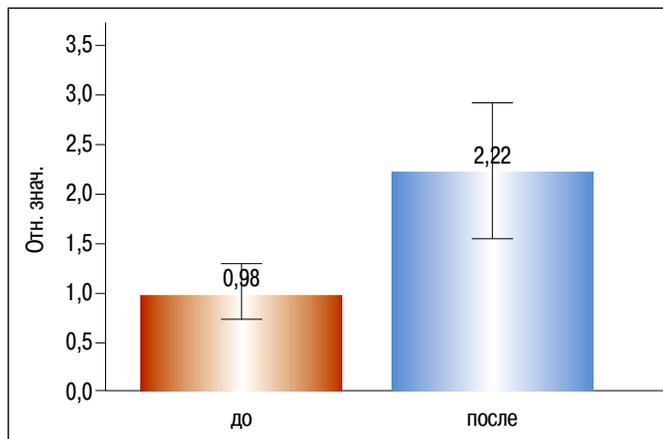


Рис. 5. Динамика изменения концентрации метгемоглобина в крови пациентов до и после лечения метформином

ренного в биологических жидкостях кислородом, до нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ). Третий путь включает этап образования из NO и супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ) пероксинитрита [10]. В настоящее время установлено, что  $\text{O}_2^-$  – продукт, характеризующий интенсивность протекания окислительного стресса в организме [27]. При физиологических значениях pH пероксинитрит распадается с образованием как нитритов, так и нитратов.

Многочисленные литературные данные указывают на участие NO в утилизации глюкозы и реализации проведения сигнала инсулина. Различные изоформы NO-синтаз (в частности нейрональная – NOS и эндотелиальная – eNOS) найдены в скелетных мышцах [11]. В экспериментах показано, что блокада этих ферментов приводит к уменьшению накопления гликогена в мышцах под действием инсулина у грызунов [20]. Экспериментальные модели мышей, имеющие генетический дефект NOS, имеют весь набор изменений, присущий МС [6]. Растворимый донор NO – нитропруссид – оказывает стимулирующее действие на поглощение глюкозы икроножной мышцей у пациентов с СД2 [9]. Механизм действия метформина во многом обусловлен его влиянием на фермент аденозинмонофосфат-активированную протеинкиназу (АМПК), который, согласно ряду работ, может фосфорилировать NOS, приводя к ее активации и увеличению

поглощения глюкозы клетками [5]. В недавно проведенной экспериментальной работе на мышах показана возможность прямого образования NO из метформина [19].

До начала терапии метформином в сыворотке пациентов мы наблюдали низкий уровень нитритов (рис. 3). Это может быть обусловлено, во-первых, недостатком непосредственного субстрата NO-синтаз – аргинина [18], во-вторых – недостатком ко-фактора NO-синтаз – тетрагидробиоптерина, в результате чего NO-синтаза опосредует только синтез супероксид анион радикала [17].

После курса терапии метформином мы наблюдали статистически значимое увеличение нитритов в плазме и повышение метгемоглобина в цельной крови пациентов. Наряду с этим, у пациентов наблюдалось улучшение показателей углеводного, липидного обмена, уменьшение ОТ. Сходная динамика показателей получена в аналогичных исследованиях с применением метформина [26].

Окислительный стресс, являющийся одним из важнейших патогенетических факторов СД2, сопровождается снижением уровня восстановительных эквивалентов: цистеина, глутатиона, аскорбиновой кислоты и некоторых других антиоксидантов [25]. Зарегистрированное нами увеличение уровня метгемоглобина (рис. 4, 5) дополнительно свидетельствует о повышении продукции NO в организме, однако процесс превращения метгемоглобина ( $\text{Fe}^{3+}$ ) до гемоглобина ( $\text{Fe}^{2+}$ ) затруднен, так как протекает на фоне недостатка редокс-агентов (цистеина и глутатиона).

### Выводы

1. У пациентов с сахарным диабетом 2 типа через 3 месяца после назначения метформина в дозе 1700 мг в сутки наряду с улучшением показателей углеводного, липидного обмена и снижением ОТ наблюдается статистически значимое повышение уровня нитрита в сыворотке, а также повышение метгемоглобина в цельной крови.
2. Положительное влияние метформина на биодоступность оксида азота может являться одним из объяснений механизма его действия.

### Литература

1. Микоян ВД, Серезенков ВА, Бражникова НВ. и др. Образование парамагнитных нитрозильных комплексов негемового железа в организме животных при участии оксида азота из основных и эндогенных источников. Биофизика 2004; 49(1): 121–127.
2. Мкртумян АМ, Бирюкова НВ, Маркина НВ. и др. Параметры эндотелиальной функции и инсулинорезистентности больных метаболическим синдромом до и после снижения веса. Ожирение и метаболизм 2008; 1: 18–22.
3. IDF. Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome, 2005.
4. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. Am J Physiol 1996; 271: 1424–1437.
5. Bergandi L, Silvagno F, Russo I, et al. Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2003; 23: 2215–2221.
6. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Circulation 2001; 104: 342–345.
7. Ford PC, Wink DA, Standbury DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. FEBS Lett 1993; 326: 1–3.
8. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. Circulation 2002; 105: 1656–1662.
9. Henstridge DC, Kingwell BA, Formosa MF, et al. Effects of the nitric oxide donors, sodium nitroprusside, on resting leg glucose uptake in patients with type 2 diabetes. Diabetologia 2005; 48: 2602–2608.
10. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1990; 30: 535–560.
11. Kim J, Gavrilova O, Chen Y, et al. Mechanisms of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. J. Biol. Chem 2000; 275: 8456–8460.
12. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. Free Radic Biol Med 2003; 35: 790–796.
13. Kondo T, Ueyama J, Imai R, et al. Association of serum NOx level with clustering of metabolic syndrome components in middle-aged and elderly general population in Japan. Environ Health Prev Med 2008; 13: 36–42.

14. Lauer T, Preik M, Rassaf T, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12814–12819.
15. Loscalzo J. Molecular mechanisms of atherosclerosis. London: Taylor & Francis 2006: 95–110.
16. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1551–1557.
17. Nyström T, Nygren A, Sjöholm A. Tetrahydrobiopterin increases insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: 919–925.
18. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 2008; 102: 95–102.
19. Serezhenkov VF, Kuznetsov IS, Romantsova T.I., Kuznetsova M.I. et al. Antidiabetes drug metformin is a donor of nitric oxide: ESR measurement of efficiency. *Biophysics* 2011; 56(6): 1088–1095.
20. Shankar R, Wu Y, Shen H, et al. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 2000; 49: 684–687.
21. Stacker R, Keaney JF. The role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381–1478.
22. Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 426–435.
23. Tong X, Evangelista A, Cohen RA. Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10(2): 133–138.
24. Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography spectrometry. *Anal Chem* 2000; 72: 4064–4072.
25. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity* 2006; 14: 2127–2131.
26. Wulffélé MG, Kooy A, de Zeeuw D, et al. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Intern Med* 2004; 256: 1–14.
27. Zanetti M, d'Uscio LV, Peterson TE, et al. Analysis of superoxide anion production in tissue. *Hypertension* 2005; 108: 65–72.
28. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 2002; 109: 817–826.

Кузнецов И.С.	аспирант кафедры эндокринологии Первого Московского государственного университета им И.М. Сеченова E-mail: ISKuznetsov@yandex.ru
Сереженков В.А.	к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физической химии биополимеров (руководитель проф. Ванин А.Ф.) института химической физики им Н.Н. Семенова РАН E-mail: serezhenkov@polymer.chph.ras.ru
Ванин А.Ф.	д.б.н., профессор, руководитель лаборатории физической химии биополимеров института химической физики им Н.Н. Семенова РАН E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru
Романцова Т.И.	д.м.н., профессор кафедры эндокринологии Первого Московского государственного университета им И.М. Сеченова E-mail: romantsovatatiana@rambler.ru