

Efectos antidiabéticos de liposomas cargados con glibenclamida en ratas con diabetes inducida por alloxan

Antidiabetic Activity of Glibenclamide Loaded Liposomes in Alloxan Induced Diabetic Rats

SINGH M*, BALAMURUGAN M, GUPTA A¹, YADAV S, SHARMA A, ACHARYA A Y RAMASAMY M

Escuela Superior de Ciencias Farmacéuticas Mahatma Gandhi, Área industrial RIICO, Sitapura, Tonk Road, Jaipur-303905 (India). Correo electrónico: bupharma@gmail.com

1. Escuela Superior de Farmacia de Jaipur. Área industrial RIICO, Sitapura, Tonk Road, Jaipur-303905 (India)

RESUMEN

Se estudió la actividad antidiabética de los liposomas cargados con glibenclamida en un modelo de diabetes inducida por alloxan en ratas. Se midió el nivel de glucosa en sangre a las 0 horas y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 horas después del tratamiento. Las ratas con diabetes provocada por alloxan mostraron una reducción significativa en el nivel de glucosa en sangre después del tratamiento con liposomas cargados con glibenclamida y glibenclamida administrada por vía oral (utilizado como estándar) en comparación con el control diabético. Se comparó el efecto antidiabético de los liposomas con el fármaco glibenclamida estándar de referencia (5mg/kg). Como conclusión, los resultados demuestran que la administración intraperitoneal de glibenclamida cargada con liposomas puede reducir los niveles de glucosa en sangre. Estos resultados sugieren la validez del uso clínico de liposomas cargados con glibenclamida.

PALABRAS CLAVE: Actividad antidiabética. Alloxan. Glibenclamida. Liposomas.

ABSTRACT

The antidiabetic activity of Glibenclamide loaded liposomes was investigated in model of alloxan-induced diabetes in rats. The blood glucose level was measured at 0 h and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16h after the treatment. The alloxan – diabetic rats showed significant reduction in blood glucose level, after treatment with Glibenclamide loaded liposomes and orally Glibenclamide (used as standard) as compared to diabetic control. The antidiabetic effect of liposomes was compared with the reference standard drug Glibenclamide (5mg/kg). In conclusion, our result showed that the liposomes loaded glibenclamide when administered by i.p. may reduce blood glucose level. These results suggested the validity of clinical use of Glibenclamide loaded liposomes.

KEYWORDS: Anti-diabetic activity. Alloxan. Glibenclamide. Liposomes.

Fecha de recepción: 13-10-06

Fecha de aceptación: 18-04-07

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus aúna una serie de síndromes y se caracteriza por hiperglucemia, un metabolismo alterado de los lípidos, carbohidratos y proteínas, y un mayor riesgo de complicaciones derivadas de enfermedades vasculares¹. La dia-

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a group of syndrome characterized by hyperglycemia, altered metabolism of lipids, carbohydrates and proteins and an increased risk of complications from vascular disease¹. Diabetes mellitus is the most important

betes mellitus es la enfermedad más importante relacionada con el páncreas endocrino. La diabetes de tipo II es una enfermedad heterogénea, debida tanto a factores genéticos como medioambientales, con múltiples defectos en la acción de la insulina, cuya secreción puede provocar hiperglucemia, y que afecta al 10% de la población mundial².

La glibenclamida es una sulfonilurea de segunda generación que se emplea en el tratamiento de diabetes no insulino dependiente. Su efecto hipoglucémico se debe principalmente a la estimulación de la liberación de insulina por las células beta del páncreas y la sensibilización de los tejidos periféricos en relación a la insulina³.

Los liposomas se pueden definir como un mosaico fluido concéntrico y esférico formado por moléculas de fosfolípidos ensambladas con gran precisión y que se crean al hidratar los fosfolípidos en un medio acuoso⁴.

El objetivo del presente estudio es preparar liposomas cargados con glibenclamida que muestren un mayor control de la hiperglucemia y que puedan invertir las complicaciones de la diabetes mellitus con mayor eficacia que la administración oral de glibenclamida en ratas.

MATERIALES

Se adquirió glibenclamida (Ultratech, Bombay), lecitina de soja (Himedia, Bombay), colesterol (Qualigens, Bombay), cloroformo (Merck, Bombay) y metanol (Qualigens, Bombay). Todos los demás ingredientes utilizados en el estudio eran de grado analítico. Alloxan (Central Drug House, Nueva Delhi). La enzima se adquirió en Beacon Diagnostics Pvt Ltd, Kabilpore, Navasari, India.

MÉTODOS

Mediante una técnica de hidratación de película delgada, se prepararon liposomas multilamelares. Se preparó una fase lípida mediante la disolución de cantidades precisas del fármaco, fosfatidilcolina y colesterol en el cloroformo: mezcla de metanol (2:1, v/v) en un matraz de base redonda de 250 ml con gránulos de vidrio. La mezcla disolvente se extrajo de la fase lípida mediante evaporación rotatoria a 45-50°C (STRIKE – 102, Italia) para obtener una delgada película de lípidos en la pared

disease involving endocrine pancreas. Type II diabetes is a heterogeneous disease with both genetic and environmental contributory factor, involved multiple defects in insulin action and insulin secretion leads to hyperglycemia and effecting 10% of population all over the world².

Glibenclamide is a second-generation sulfonilurea used in the treatment of non-insulin dependent diabetes. Its hypoglycemic effect is mainly due to stimulation of insulin release from pancreatic beta-cells and sensitization of the peripheral tissues to insulin³.

Liposomes may be defined as spherical concentric fluid mosaic made from highly precise self-assembly of phospholipid molecules, which are formed when phospholipid are hydrated in aqueous medium⁴.

In present study attempt was made to prepare glibenclamide loaded liposomes which can exhibited better control of hyperglycemia and more effectively reverse the diabetes mellitus complications than oral glibenclamide administration in rats.

MATERIALS

Glibenclamide (Ultratech, Mumbai), Soya lecithin (Himedia, Mumbai), Cholesterol (Qualigens, Mumbai), Chloroform (Merck, Mumbai), Methanol (Qualigens, Mumbai) were purchased. All other ingredients used in the study were of analytical grade. Alloxan (Central Drug House, New Delhi). The enzyme was purchased from Beacon Diagnostics Pvt Ltd, Kabilpore, Navasari, India.

METHODS

Multilamellar liposomes were prepared employing thin film hydration technique. A lipid phase was prepared by dissolving accurately weighed quantities of drug, phosphatidylcholine, and cholesterol in the chloroform: methanol mixture (2:1, v/v) in 250 ml round bottom flask containing glass beads. The solvent mixture was removed from lipid phase by rotary evaporation at 45°-50°C (STRIKE – 102, Italy) to obtain a thin film of lipids on the wall of flask and the surface of beads. Subsequently the flask was kept overnight under vacuum to ensure complete

del matraz y sobre la superficie de los gránulos. Seguidamente, se mantuvo el matraz al vacío durante una noche para garantizar la eliminación completa del disolvente residual. Se hidrató la película lipídica seca con una solución salina de tampón fosfato con un pH equivalente a 7,4 a una temperatura de $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se agitó la dispersión obtenida durante dos minutos aproximadamente. La dispersión se mantuvo a temperatura ambiente durante dos horas para permitir la dilatación completa de la película lipídica y obtener una suspensión vesicular⁵.

PARTE EXPERIMENTAL

Animales

En el estudio se utilizaron ratas albinas adultas de ambos sexos, con un peso comprendido entre 150 y 200 gm. Los animales los proporcionó el Instituto de Farmacia, previa autorización del Comité de ética institucional de la Universidad de Bundelkhand, Jhansi (India).

Los animales se alojaron, en grupos de cuatro, en jaulas de polipropileno, con acceso libre a una dieta estándar de laboratorio y agua proporcionada *ad libitum*. Las ratas se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa del $50\pm 15\%$ y condiciones normales de iluminación (12 horas de luz/12 horas de oscuridad).

Método para determinar el nivel de glucosa en plasma de sangre

Durante el experimento, el nivel de glucosa en sangre de los animales se determinó mediante el *Método enzimático de glucosa oxidasa y peroxidasa (God-Pod)*. Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola. Se tomaron aproximadamente 100 μl de sangre en un tubo Eppendorf (1,5 ml de capacidad) al que previamente se añadió anticoagulante (potasio EDTA y fluoruro de sodio en una proporción 2:1). La sangre se mezcló y centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. De ella, se utilizaron 10 μl de plasma con un 1 ml de solución enzimática. Durante 15 minutos se incubó la mezcla de plasma y enzimas a 37°C . A continuación, se registró la absorbancia de la solución rosa formada a 500 nm. El valor de

removal of residual solvent. The dry lipid film was hydrated with phosphate saline buffer pH 7.4 at a temperature $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. The dispersion thus obtained was vortexed for about 2 minutes. The dispersion was left undisturbed at room temperature for 2 hours to allow complete swelling of the lipid film and hence to obtain vesicular suspension⁵.

EXPERIMENTAL

Animals

The animals used for the study were adult albino rats of either sex, weighing 150-200 gm. All animals were procured from Institute of Pharmacy, and approved by the Institutional Ethics Committee, Bundelkhand University, Jhansi.

The animals were housed in polypropylene cages, 4 per cage, with free access to standard laboratory diet and water were provided *ad libitum*. The rats were maintained under standard laboratory condition at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, relative humidity $50\pm 15\%$ and normal photo period (12h dark/12h light) were used for experiment.

Method for Determination of Plasma Blood Glucose Level

In the experiment the blood glucose level of the animals were estimated by *Glucose Oxidase-Peroxidase Enzymatic Method (God-Pod)*. Blood from the tail vein was collected. About 100 μl of blood was taken in Epindroff's tube (1.5 ml capacity) to which anticoagulant (potassium EDTA + sodium fluoride, 2:1) was previously added. Blood was mixed properly and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. out of it 10 μl of plasma was further used with 1ml of enzyme solution. Thoroughly mixed plasma and enzyme were incubated at 37°C for 15 min. Then the absorbance of pink colored solution formed was noted at 500 nm. Further glucose value was calculated using 100 mg/dl standard solution of glucose.

$$\text{Glucose conc. (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbance (sample)}}{\text{Absorbance (standard)}} \times 100$$

glucosa se calculó mediante una solución estándar de glucosa de 100 mg/dl.

$$\text{Conc. de glucosa (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbancia (muestra)}}{\text{Absorbancia (estándar)}} \times 100$$

Inducción de la diabetes en ratas

Durante 10 días se mantuvo un total de 40 ratas en condiciones de laboratorio para que se adaptaran al entorno. Después de someter a los animales a un período de ayuno de 18 horas, se les administró, mediante inyección intraperitoneal, una dosis de 150 mg/kg de peso corporal de monohidrato de alloxan disuelto en agua destilada.

Durante 14 días y a intervalos constantes se comprobó el comportamiento general y el nivel de glucosa en sangre. Transcurrido el número de días especificado, se registró un aumento estabilizado del nivel de glucosa en sangre y los animales con más de 250 mg de glucosa por decilitro de sangre se separaron y seleccionaron para el experimento. Durante el período de inducción, murió un 20% de los animales y aproximadamente un 11-12 % no respondió al alloxan.

Procedimiento experimental

En el experimento, se empleó un total de 29 ratas, que se dividieron a su vez en cuatro grupos. El grupo 1, que incluía 5 ratas, se seleccionó como grupo de control y en los cuatro grupos restantes se incluyeron 6 ratas diabéticas.

Grupo 1. Grupo de control tratado con agua.

Grupo 2. Grupo de control diabético tratado con vehículo.

Grupo 3. Tratado con formulación (GLB-2).

Grupo 4. Tratado con glibenclamida 5mg/kg, vía oral como estándar.

RESULTADOS

Se evaluó a distintos intervalos de tiempo el efecto antihyperglucémico de las diferentes dosis de liposomas cargados con glibenclamida en ratas

Induction of Diabetes in Rats

Total 40 rats were kept at laboratory conditions for 10 days for adaptation of environment. After this the animals allowed to fast for 18 hrs were injected with alloxan monohydrate dissolved in distilled water at a dose of 150 mg/ kg body weight intraperitoneally.

The general behavior and blood glucose level were checked for 14 days at constant intervals. After completion of specified days a stabilized increased blood glucose level were registered and animals having more than 250 mg/dl blood glucose were separated and opted for experimentation. During the period of induction 20% death were registered and about 11-12 % of animals did not responded to alloxan.

Experimental Procedure

In the experiment total 29 surviving rats were used, which were further divided in to 4 groups. Group -1 was kept as normal, control group included 5 rats and rest 4 groups included 6 diabetic animals each.

Group 1. Normal control treated with water

Group 2. Diabetic control treated with vehicle

Group 3. Treated with Formulation (GLB-2)

Group 4. Treated with Glibenclamide 5mg/kg, p.o. as standard

RESULTS

The anti-hyperglycemic effect of different doses of glibenclamide loaded liposomes on fasting blood glucose level in diabetic rats were assessed at different time intervals. Data on blood glucose level is presented in figure 1, table 1. When glibenclamide solution (standard) was given, blood glucose level started to decrease from 2nd hour. From 4th to 8th hour blood glucose level reaches to normal but after 8th hour it started to increase again. In case of formulation blood glucose level started to decrease from 6th hour and it was maintained up to 16th hour. At 16th hour 110.5 mg/dl blood glucose level was noted. Thus on comparison it was found that formulation of Glibenclamide was effective up to the period of 16 hour and thereby reducing the glucose level to almost normal.

diabéticas en ayuno con niveles de glucosa en sangre. En la figura 1, tabla 1, se presentan los datos sobre los niveles de glucosa en sangre. Al administrar la solución de glibenclamida (estándar), los niveles de glucosa en sangre se empezaron a reducir a partir de la segunda hora. Entre la cuarta y octava hora, el nivel de glucosa en sangre alcanzó valores normales, pero a partir de la octava hora experimentó un nuevo ascenso. En el caso de la formulación de los niveles de glucosa en sangre, éstos se redujeron a partir de la sexta hora, manteniéndose estables hasta la decimosexta. Transcurridas 16 horas, se observó un nivel de glucosa en sangre de 110,5 mg/dl. En comparación, se detectó que la formulación de glibenclamida resultó eficaz durante un período de 16 horas, reduciendo el nivel de glucosa hasta un valor prácticamente normal.

FIGURA 1. Niveles de glucosa en sangre en ratas con diabetes inducida por alloxan.
FIGURE 1. Shows the blood glucose level of Alloxan induced Diabetic rats.

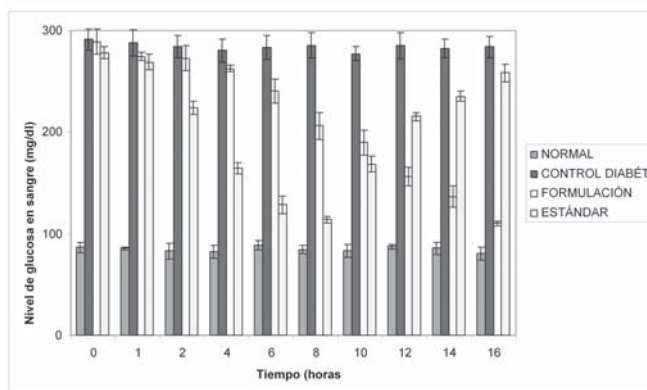


TABLA 1. Niveles de glucosa en sangre en ratas con diabetes inducida por alloxan.
TABLE 1. Shows the blood glucose level of Alloxan induced Diabetic rats.

Nº S. no	Grupo Group	Dosis mg/kg Dose mg/kg	Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) a diferentes horas después del tratamiento Blood Glucose Level (mg/dl) at different hours after Treatment									
			0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h
1.	Normal Normal	--	86,5 ±5,36	85,6 ±1,5	83,2 ±7,8	82,3 ±6,2	88,7 ±4,5	84,4 ±4,1	83,2 ±6,5	87,5 ±2,2	85,8 ±5,9	80,6 ±6,2
2.	Control diabético Diabetic control	--	291,4 ±10,8	288,3 ±12,6	284,4 ±11,2	280,6 ±11,3	283,5 ±11,6	285,6 ±12,5	277,4 ±6,6	285,3 ±12,8	282,9 ±9,2	284,3 ±10,6
3.	Formulación 1 Formulation 1	5	289,1 ±12,4	274,7 ±3,9	273,0 ±12,6	262,8 ±3,1	240,3 ±11,9	206,5 ±13,4	189,8 ±12,1	156,2 ±8,9	136,4 ±10,5	110,5 ±2,4
4.	Estándar Standard	5	278,5 ±5,8	269,2 ±7,8	223,9 ±6,5	164,8 ±5,2	128,7 ±8,9	114,2 ±3,2	168,6 ±7,8	215,6 ±4,3	235,2 ±4,9	258,6 ±8,7

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las principales características de la diabetes mellitus son la polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, debilidad muscular e hiperglucemia. En este trabajo se estudian los niveles de glucosa en casos de diabetes experimental inducida por alloxan en ratas. Se ha observado que el alloxan provoca una reducción masiva del número de células beta de los islotes de Langerhans e induce hiperglucemia. Se ha descubierto que la administración de alloxan conduce a la aparición de diabetes de larga duración en muchos tejidos animales. No se ha determinado el punto en el que el alloxan interactúa con la membrana celular. En el presente estudio, la suspensión liposómica produjo una reducción de la glucosa en sangre dosis-dependiente en el grupo diabético. Porcentualmente, la reducción de la glucosa en sangre producida por la suspensión liposómica es mayor que la de la solución de glibenclamida estándar. Sugerimos que la encapsulación de glibenclamida en liposomas facilita la secreción controlada y constituye una buena opción para sustituir a la solución de glibenclamida.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The main characteristics of diabetes mellitus are polydipsia, polyurea, polyphalagia, weight loss, muscle weakness and hyperglycemia. This work evaluated plasma glucose in experimental diabetes caused by alloxan in rats. Alloxan has been observed to cause massive reduction of beta cells of the islets of Langerhans and induce hyperglycemia. Alloxan administration has been found to lead to long lasting diabetes in many animal tissues. The site at which alloxan interact with cell membrane is uncertain. In this study, the liposomal suspension produced a dose dependent blood glucose reduction in diabetic group. The percentage blood glucose reduction produced by liposomal suspension is greater than standard glibenclamide solution. We suggest that encapsulation of glibenclamide in liposomes facilitates the controlled release and constitute a good choice to replace glibenclamide solution.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Davis SN, Granner DK. *Insulin, oral hypoglycemic agents and pharmacology of the endocrine pancreas*. 9th edition, McGraw hill, New York. 1996; 1487-1518.
2. Dastmalch S, Garjani A, Maleki N, Sheikhee G, Baghchevan V, Azad PJ, Valizadeh H, Jalali M.B. Enhancing dissolution, serum concentration and hypoglycemic effect of glibenclamide using solvent deposition technique. *Pharmaceut Sci* 2005; 8(2):MS-181.
3. Vyas SP, Khar RK. *Targeted and controlled drug delivery: Novel carrier system*. first reprint edition CBS publisher. 2004
4. Bhatia A, Kumar R, Katare O P. Tamoxifen in topical liposomes: Development, characterization and in vitro evaluation. *J Pharm pharmaceut sci* 2004;7(2):252-259.
5. Lino CDS, Diogenes JPL, Pereira BA, Faria RAPG. Antidiabetic activity of Bauhinia forficata extract in alloxan – diabetic rats. *Biol. Pharm Bull* 2004; 27(1): 125-127.
6. Kasiviswanath R, Alluri R, Kilari EK. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of Gmelina asiatica linn in normal and in alloxan induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull* 2005; 28(4): 729-732.