

УДК 611.018.74:616.379-008.64-085

НАРУШЕНИЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПЕПТИДНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

А.А. Елагина, Ю.Д. Ляшев, Е.Б. Артюшкова, А.Ю. Ляшев

*ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии*

Пептидные препараты дельталицин и семакс, обладающие антиоксидантным, антигипоксическим, мембраностабилизирующим действием, могут рассматриваться как потенциальные вазопротекторы, поэтому изучение их влияния на антитромботические свойства эндотелия при сахарном диабете является актуальным. Крысам с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом вводили дельталицин в дозе 100 мкг/кг, семакс в дозе 200 мкг/кг, сулодексид в дозе 30 ЕВЛ и их комбинации. Установлено, что применение дельталицина или сулодексида увеличивает протромбиновое время, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время и снижает концентрацию фибриногена в плазме у животных с сахарным диабетом. Эффекты дельталицина и сулодексида статистически достоверно не отличались, а семакс не оказывал влияния на показатели свертывания. Наибольший эффект показан при введении комбинации дельталицина и сулодексида.

Ключевые слова: сахарный диабет, свертывание крови, дельталицин, семакс.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-156-159

VIOLATION OF THE ANTITHROMBOTIC PROPERTIES OF THE ENDOTHELIUM IN DIABETES MELLITUS AND THEIR CORRECTION BY PEPTIDES

A.A. Elagina, Ju.D. Ljashev, E.B. Artjushkova, A.Ju. Ljashev

*FSBEI HE «Kursk State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Department of pathophysiology*

Peptide drugs daltalycin and semax having antioxidant, antihypoxic, membranostabilizing action, may act as potential vasoprotectors, that's why the investigation of their influence on the antithrombotic properties of endothelium is actual. Daltalycin at the dose 100 mcg/kg, semax at the dose 200 mcg/kg, sulodexid at the dose 30 ULR and their combinations were injected to the rats with experimental streptozotocin diabetes. It was established that the administration of daltalycin and sulodexid increases the prothrombin time, thrombin time, activated partial thromboplastin time and decreases the concentration of fibrinogen in the plasm. There were no significant differences in the effects of daltalycin and sulodexid, and semax didn't influence the coagulation indices. The most correcting action has been shown after the injection of daltalycin and sulodexid combination.

Key words: diabetes mellitus, blood coagulation, daltalycin, semax.

В последние годы эндотелий рассматривается как уникальная метаболическая система, играющая важную роль в процессах регуляции тонуса сосудов, защите сосудистой стенки от воздействия повреждающих факторов. Показано, что эндотелиальный слой сосудов предупреждает активацию гемостатических свойств крови, включая агрегацию тромбоцитов [3]. Нарушение физиологических свойств эндотелия – эндотелиальная дисфункция (ЭД), развивающаяся при его продолжительном повреждении, в том числе и при сахарном диабете, приводит к усилению продукции агрегантов, тромбогенных и вазоконстрикторных факторов [5].

Известно, что пептидные препараты, включая дельталицин и семакс, обладают уникальной совокупностью свойств. Показано, что дельта-сон индуцирующий пептид, который является действующим веществом препарата дельталицин, а также семакс обладают антиоксидантным, антигипоксическим, антистрессорным, мембранопротекторным, иммуномодулирующим действием [1, 4, 8]. В связи с этим представляет интерес анализ

влияния дельталицина и семакса на развитие нарушений антитромботических свойств эндотелия при экспериментальном сахарном диабете.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния дельталицина, семакса и их комбинаций на антитромботические свойства эндотелия при сахарном диабете.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 100 крысах-самцах Вистар весом 210–230 г. 8 животных оставались интактными, а остальным моделировали сахарный диабет путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе 45 мг/кг на цитратном буфере (pH = 4,5) [6]. Спустя 72 часа в крови определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом с использованием набора Глюкоза-ФКД (Россия). Для дальнейших экспериментов отбирали крыс с концентрацией глюкозы в крови 12,0 ммоль/л и более [7].

Исследуемые препараты экспериментальным животным вводили ежедневно в течение 10 дней внутримышечно в дозах: дельталицин – 100 мкг/кг массы тела, семакс – 200 мкг/кг массы тела. В качестве препарата сравнения был выбран сулодексид (препарат «Вессел Дуэ Ф» фирмы «Альфа-сигма С.п. А», Италия), который применяли внутривентриально в дозе 30 ЕВЛ (единицы высвобождения липопроотеидлипазы) в течение 28 дней.

Были выделены следующие экспериментальные группы: 1) интактная; 2) контрольная № 1 (сахарный диабет и внутримышечное введение физиологического раствора); 3) контрольная № 2 (сахарный диабет и внутривентриальное введение физиологического раствора); 4) контрольная № 3 (сахарный диабет внутривентриальное-внутримышечное введение физиологического раствора); 5) опытная № 1 (сахарный диабет и введение дельталицина); 6) опытная № 2 (сахарный диабет и введение семакса); 7) опытная № 3 (сахарный диабет и введение сулодексида); 8) опытная № 4 (сахарный диабет и введение дельталицина + семакса); 9) опытная № 5 (сахарный диабет и введение дельталицина + сулодексида); 10) опытная № 6 (сахарный диабет и введение семакса + сулодексида).

Животных выводили из опыта на 28-е сутки и определяли показатели, характеризующие гемостатическую функцию крови: протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), концентрацию в плазме фибриногена (по методу Клаусса).

Исследования проводили с соблюдением положений, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к лабораторным животным (2000 г.), директивы Европейского сообщества (86/609ЕС). Выполнение исследований разрешено Региональным этическим комитетом (протокол № 3 от 07 октября 2016 г.).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров с помощью программного обеспечения MS Excel и Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование сахарного диабета путем внутривенного введения стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг приводит к повышению содержания фибриногена в плазме крови в 2,1 раза ($p < 0,001$), снижению ТВ на 28,2–30,2 % ($p < 0,001$), ПВ – на 24,0–27,6% ($p < 0,001$), АЧТВ – на 33,0–34,5 % ($p < 0,001$) по сравнению с интактной группой (таб.).

Влияние дельталицина, семакса, сулодексида и их комбинаций на показатели гемостаза и антитромботическую функцию эндотелия у крыс с сахарным диабетом, $n = 8$

| Группа | Концентрация фибриногена, г/л | Тромбиновое время, с | Протромбиновое время, с | Активированное частичное тромбопластиновое время, с |
|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---|
| Интактная группа | 1,86 ± 0,12 | 29,1 ± 0,8 | 25,0 ± 0,9 | 39,4 ± 1,2 |
| Контрольная группа № 1 | 3,90 ± 0,13 ^x | 20,3 ± 1,0 ^x | 18,1 ± 0,6 ^x | 25,8 ± 0,5 ^x |
| Контрольная группа № 2 | 3,88 ± 0,11 ^x | 20,6 ± 0,7 ^x | 18,9 ± 0,9 ^x | 26,0 ± 0,6 ^x |
| Контрольная группа № 3 | 3,93 ± 0,14 ^x | 20,9 ± 1,1 ^x | 19,0 ± 0,7 ^x | 26,4 ± 0,8 ^x |
| Введение дельталицина | 3,05 ± 0,09 ^{***} | 24,0 ± 0,7 [*] | 22,0 ± 0,6 ^{**} | 33,9 ± 0,8 ^{***} |
| Введение семакса | 3,71 ± 0,10 | 20,4 ± 0,6 | 20,0 ± 0,7 | 26,5 ± 1,5 |
| Введение дельталицина и семакса | 2,89 ± 0,10 ^{***} | 24,1 ± 0,8 [*] | 23,4 ± 0,5 ^{***} | 34,6 ± 0,7 ^{***} |
| Введение сулодексида | 3,03 ± 0,10 ^{***} | 23,8 ± 0,9 [*] | 22,0 ± 0,5 [*] | 32,9 ± 0,6 ^{***} |
| Введение дельталицина и сулодексида | 2,55 ± 0,06 ^{***} | 26,6 ± 0,7 ^{***} | 25,1 ± 0,5 ^{***} | 35,8 ± 0,5 ^{***} |
| Введение семакса и сулодексида | 2,91 ± 0,11 ^{***} | 24,0 ± 0,7 [*] | 22,1 ± 0,5 ^{**} | 33,4 ± 0,5 ^{***} |

^x $p < 0,001$ по сравнению с интактными животными; ^{*} $p < 0,05$ по сравнению с контрольными животными; ^{**} $p < 0,01$ по сравнению с контрольными животными; ^{***} $p < 0,001$ по сравнению с контрольными животными.

Введение дельталицина в дозе 100 мкг/кг внутримышечно ежедневно в течение 10 суток вызывает снижение содержания фибриногена на 21,8 % ($p < 0,001$), увеличение ТВ на 18,2 % ($p < 0,05$), ПВ на 21,5 % ($p < 0,01$), АЧТВ – на 31,4 % ($p < 0,001$) у животных с сахарным диабетом. Применение семакса не оказывало существенного влияния на исследуемые показатели. Внутривентриальное введение сулодексида в дозе 30,0 ЕВЛ ежедневно в течение 28 дней приводило к снижению концентрации фибриногена на 21,9 % ($p < 0,001$),

повышению ТВ на 15,5 % ($p < 0,05$), ПВ – на 16,4 % ($p < 0,05$), АЧТВ – на 26,5 % ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными животными. При применении комбинации дельталицина и семакса не установлено статистически достоверных различий с эффектами использования одного дельталицина ($p > 0,05$). Введение комбинации препаратов дельталицина и сулодексида оказалось наиболее эффективным. Показано, что содержание фибриногена снизилось на 34,6 % ($p < 0,001$), ТВ увеличилось на 29,1 % ($p < 0,001$), ПВ – на 38,6 % ($p < 0,001$), АЧТВ – на 38,8 % ($p < 0,001$). При этом исследуемые показатели были статистически достоверно выше, чем у крыс, получавших только дельталицин или сулодексид ($p < 0,05–0,01$).

Применение комбинации сулодексида и семакса оказывало корректирующее влияние на исследуемые показатели у крыс с сахарным диабетом: снижение концентрации фибриногена составило 26,0 % ($p < 0,001$), увеличение ТВ – на 14,8 % ($p < 0,05$), ПВ – на 16,3% ($p < 0,01$), АЧТВ – на 26,5 % ($p < 0,001$). Однако не установлено существенных различий между группами, получавшими комбинацию сулодексида и семакса или только сулодексид.

Полученные результаты подтверждают данные литературы об активации гемостатических свойств крови при развитии ЭД при сахарном диабете [7]. Поражение эндотелия при сахарном диабете сопровождается обнажением субэндотелиального слоя, что приводит к адгезии и агрегации тромбоцитов, активации свертывания и повышению вязкости крови [5]. Известно, что ведущую роль в повреждении эндотелия при сахарном диабете играет активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3]. Ранее показано, что дельталицин обладает антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием [1, 4]. Таким образом, можно предположить, что снижение ПОЛ под влиянием дельталицина тормозит развитие ЭД и активацию гемостатических свойств крови. Выраженный протективный эффект комбинации сулодексида и дельталицина объясняется влиянием указанных препаратов на различные механизмы развития ЭД, а также потенцирующим действием дельталицина.

В работе не установлено корректирующего влияния семакса на показатели гемостаза у животных с сахарным диабетом. Ранее показано, что пептиды, имеющие подобно семаксу в своем составе аминокислоты глицин и пролин, препятствуют агрегации тромбоцитов [2]. Однако, если агрегация тромбоцитов индуцирована адреналином или АДФ, то эффекты семакса не проявляются [2]. По нашему мнению, активация коагуляции при сахарном диабете связана с включением механизмов, на которые семакс не оказывает влияния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе установлено, что применение препарата дельталицин в дозе 100 мкг/кг животным с сахарным диабетом снижает патологическую активацию свертывания крови, что проявляется увеличением ПВ, ТВ, АЧТВ, снижением концентрации фибриногена в плазме. Применение комбинации дельталицина и сулодексида оказывает наибольший корректирующий эффект на нарушения коагуляции крови при сахарном диабете. В работе показано, что применение семакса не оказывает влияния на изменение ПВ, ТВ, АЧТВ, концентрации фибриногена у животных с сахарным диабетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко Т.И., Кутилин Д.С., Михалева И.И. Влияние дельта сон-индуцирующего пептида на состояние мембран лизосом и интенсивность лизосомального протеолиза в разных тканях крыс при физиологическом старении организма // Успехи геронтологии. – 2014. – № 3 (27). – С. 488–495.
2. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е. и др. Современная концепция регуляторной роли пептидов глипролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // Известия Российской академии наук. Серия «Биология». – 2013. – № 4. – С. 453–462.
3. Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия // Кардиология. – 2005. – № 12. – С. 62–67.
4. Михалева И.И., Иванов В.Т., Оноприенко Л.В. и др. Антиоксидантная и детоксицирующая активность аналогов пептида дельта-сна // Биоорганическая химия. – 2014. – № 1 (40). – С. 3–11.
5. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. – СПб., 2003. – 184 с.
6. Спасов А.А., Чепляева Н.И., Ленская К.В., Снигур Г.Л. Влияние лимиглидола на ДПП-4 и морфологические особенности островкового аппарата поджелудочной железы при стрептозотоциновом сахарном диабете // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – № 5 (78). – С. 8–12.
7. Тюренок И.Н., Воронков А.В., Слиеца А.А., Оганесян Э.Т. Влияние флавоноидов на основные параметры гемостаза крови и антитромботическую функцию эндотелия при сахарном диабете // Фармация. – 2012. – № 4. – С. 34–36.
8. Яснецов В.В., Черторыжский Е.А., Белый П.А. и др. Изучение нейропротективных, антигипоксических и антиамнестических эффектов новой смеси трипептидов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – № 1 (78). – С. 3–8.

REFERENCES

1. Bondarenko T.I., Kutilin D.S., Mihaleva I.I. Vliyaniye delta son-induciruyushogo peptida na sostoyaniye membran lisosom I intensivnost' lisosomal'nogo proteoliza v raznykh tkanyah krys pri fiziologicheskom starenii organizma [The influence of delta-sleep-inducing peptide on the condition of lysosomal membranes and the intensity of lysosomal proteolysis in the different tissues of rats in the physiological aging of the organism]. *Uspehi gerontologii* [Successes

of Gerontology], 2014, no. 3 (27), pp. 488–495. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Grigoryeva M.E. i dr. Sovremennaja koncepcija reguljatornoj roli peptidov gliptrolinovogo rjada v korrekcii funkcii sistemy gemostaza pri razvitanii saharnogo diabeta [The modern concept of the regulatory role of gliptrolin peptides in the correction of hemostasis system function in the development of diabetes mellitus]. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya «Biologiya»* [Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Series «Biology»], 2013, no. 4, pp. 453–462. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Markov H.M. Molekulyarnye mehanizmy disfunktsii sosudistogo endoteliya [Molecular mechanisms of the dysfunction of vascular endothelium]. *Kardiologiya* [Cardiology], 2005, no. 12, pp. 62–67. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Mihaleva I.I., Ivanov V.T., Onoprienko L.V. i dr. Antioksidantnaya i detoksitsiruyushaya aktivnost' analogov peptida del'ta-sna [Antioxidant and detoxifying activity of the analogues of delta-sleep peptide]. *Bioorganicheskaya himiya* [Bioorganic chemistry], 2014, no. 1 (40), pp. 3–11. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Petrishev N.N. Disfunktsiya endoteliya. Prichiny, mehanizmy, farmakologicheskaya korrektsiya [Dysfunction of endothelium. Causes, mechanisms, pharmacological correction]. Saint Petersburg, 2003. 184 p.

6. Spasov A.A., Cheplyaeva N.I., Lenskaya K.V., Snigur G.L. Vliyanie limiglidola na DPP-4 i morfologicheskie osobennosti ostrovkovogo apparata podzheludochnoi zhelezy pri streptozototsinovom saharnom diabete [Influence of limiglidol on DPP-4 and morphological peculiarities of pancreatic islets in streptozotocin diabetes mellitus]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2015, no. 5 (78), pp. 8–12. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Turenkov I.N., Voronkov A.V., Slietsans A.A., Oganesyany E.Y. Vliyanie flavonoidov na osnovnyye parametry hemostaza krovi i antitromboticheskuyu funktsiyu endoteliya pri saharnom diabete [Influence of flavonoids on the basic parameters of blood hemostasis and antithrombotic function of the endothelium in the diabetes mellitus]. *Farmatsiya* [Pharmacy], 2012, no. 4, pp. 34–36. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Yasnetsov V.V., Chertoryzhskiy E.A., Belyi P.F. i dr. Izuchenie neiroprotektivnykh, antihypoxic and antigipoksicheskikh, antimnesticheskikh effektov novoi smesi tripeptidov [Investigation of neuroprotective, antihypoxic and antimnesic effects of the new mixture of tripeptides]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2015, no. 1 (78), pp. 3–8. (In Russ.; abstr. in Engl.).

Контактная информация

Ляшев Юрий Дмитриевич – д. м. н., профессор кафедры патофизиологии, Курский государственный медицинский университет, e-mail: ylyashev@yandex.ru