

УДК 577.171.55

Изменения уровня глюкозы и некоторых показателей свертывания крови у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом под действием нового аминокислотного комплекса

**З.Х. Паронян, Р.С. Хачатрян, А.А. Степанян,
Л.С. Григорян, Л.Н. Аракелян**

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа (СД1), аминокислотный комплекс, гемостаз, фибриноген, этаноламин – О – сульфат, ГАМК, β-аланин, глутамин

Сахарный диабет (СД) характеризуется разнообразными изменениями в системе гемостаза, что, в свою очередь, обуславливает выраженное атеротромботическое состояние и повышение развития сердечно-сосудистых осложнений [9,16,], которые, среди прочего, связаны с повышением уровня фибриногена в плазме [14]. При СД, независимо от типа, наблюдается усиление постоянного внутрисосудистого свертывания крови вплоть до развития хронического синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС - синдром) [3]. У крыс с СД1 нарушения обусловлены развитием эндотелиальных дисфункций, повышением адгезивных свойств тромбоцитов, усилением активности прокоагулянтов на фоне угнетения активности антикоагулянтов, нарушением синтеза антитромбина III (АТ III) из-за метаболических изменений в печени.

В коагуляционном гемостазе частыми нарушениями при СД являются: количественные изменения плазменных факторов (фактор VII, фибриноген, тромбин), снижение уровня антикоагулянтов (протеин С, S, тромбомодулин, АТIII), усиление синтеза ингибитора фибринолиза – ингибитора тканевого активатора плазминогена (ИТАП) [13,20].

Несмотря на многолетние изучения СД, использование новых методов лечения, болезнь продолжает прогрессировать. Современная диабетология располагает множеством хорошо изученных препаратов, которые активно применяются для лечения СД и его осложнений, однако, по данным Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD) и Американской диабетической ассоциации (ADA), около двух третей пациентов с СД не достигают удовлетворительных результатов, что требует дальней-

шего поиска препаратов, способных обеспечить эффективный контроль гликемии [4]. В настоящее время зарегистрирован ряд лекарственных препаратов, состав которых представлен аминокислотами в различных комбинациях [6]. Для подавления гипергликемического эффекта аллоксана проф. Р.Г. Камалян и др. использовали комплекс нейроактивных аминокислот, состоящий из гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), этаноламин – О – сульфата (ЭОС) и глутамина. Было показано, что введение этого комплекса в течение пяти дней после индукции диабета аллоксаном снижает содержание глюкозы с $26,7 \pm 2,1$ до $6,2 \pm 0,4$ ммоль/л, т.е. имеет место нормализация уровня глюкозы в крови крыс [11].

В настоящем исследовании для лечения экспериментального аллоксанового диабета использован аминокислотный комплекс (АК комплекс), который имеет четвертый компонент – β -аланин. Одновременно изучены изменения в системе свертывания крови крыс с аллоксановым диабетом и после лечения АК комплексом.

Нормализация ключевых показателей системы гемостаза при СД безусловно является важным процессом, который необходимо учитывать при выборе или разработке гипогликемического средства. Целесообразность выбранного проф. Р.Г. Камаляном АК комплекса в этом смысле можно обосновать, ознакомившись с его составляющими:

ГАМК – значение ГАМК заключается в том, что она корректирует причины СД1, т. е. регенерирует инсулин-продуцирующие β -клетки поджелудочной железы, активизирует их пролиферацию и развитие до четких субпопуляций, воздействует на иммунную систему, останавливая разрушение β -клеток, снижает уровень глюкозы крови, увеличивая скорость ее выделения у животных с индуцированным диабетом [17]. Все эти действия необходимы для обратного развития болезни и предотвращения ее рецидивов [19]. Производные ГАМК снижают агрегацию эритроцитов и тромбоцитов, ограничивая гиперкоагуляцию плазмы, удлиняя протромбиновое и тромбиновое время, снижая уровень фибриногена, улучшая реологию и микроциркуляцию крови [5].

ЭОС – ингибитор трансаминазы ГАМК, который предотвращает метаболизм ГАМК. Он используется как биохимический инструмент в исследованиях с участием ГАМК. Показано, что внутрибрюшинное введение крысам ЭОС в дозе 50мг/100г в течение трех дней предотвращает гипергликемический эффект вводимого на четвертый день аллоксана. Введение ЭОС сопровождается повышением концентрации ГАМК в мозге и поджелудочной железе [10].

Глутамин – многофункциональная аминокислота, особенно его α -форма, самая распространенная аминокислота в крови. С помощью глутамина организм вырабатывает другие аминокислоты, витамин В3, глутатион, глюкозамин, серотонин. Из глутамина и глутаминовой кислоты под воздействием фермента глутаматдекарбоксилазы синтезируется

ГАМК. Глутамин регулирует уровень инсулина в крови, стабилизируя уровень глюкозы.

β -аланин – входит в состав целого ряда биологически активных соединений, в организме образуется при распаде карнозина. Совместно с гистамином β -аланин является прямым предшественником карнозина, который является важным биогенным дипептидом, выполняющим функцию рН-буфера, т.е. его присутствие позволяет мышцам работать дольше и интенсивнее. Во время анаэробной нагрузки расщепляется глюкоза, образуя лактат, из-за которого мышечная среда становится более кислой (снижается рН), это приводит к утомлению мышц и снижению их работоспособности. Карнозин способен утилизировать лактат, стабилизируя уровень рН. Было доказано, что карнозин является антиоксидантом, имеет нейпротекторный эффект, активный модулятор иммунной системы [1,12].

Таким образом, при выборе АК комплекса были учтены указанные выше свойства его компонентов.

Материал и методы

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах-самцах массой 180-200г. Животные содержались на обычном рационе вивария. Всего были использованы 72 животных, которые были распределены на 3 группы: I – контрольная, получила внутривентриально 0,5мл/100г массы тела физ. раствора, II – однократная внутривентриальная инъекция аллоксана, 15мг/100г массы тела, III – индукция диабета аллоксаном и инъекция АК комплекса, пять дней по 0,5мл/100г массы тела.

АК комплекс состоит из ГАМК, β -аланина, ЭОС и глутамина (1:1:2:2).

Модель считалась полученной, когда уровень глюкозы в крови достигал ≥ 20 ммоль/л. Регистрация уровня глюкозы в крови крыс проводилась утром перед кормлением. Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра Сателлит (Россия).

Состояние свертывающей системы оценивали по времени свертывания крови и рекальцификации [15], показателям времени тромбообразования и активности факторов протромбинового комплекса, изменению тромбинового времени [18], концентрации фибриногена [8].

В опытах использовали тромбин и стандартные аминокислоты фирмы Sigma Chemical Company (USA), тромбопластин фирмы Delta (Армения). Для определения статистической достоверности различий между контролем и опытными выборками использовали непараметрический критерий Манн – Уитни U. Данные представлены mean $\pm$ SEM. Уровень значимости $p < 0,05$ считали достоверным по сравнению с контролем.

Результаты и обсуждение

Тестирование указанного АК комплекса на крысах с экспериментальным диабетом показало, что у контрольных животных средний уровень глюкозы, 6,1 ммоль/л, при аллоксановом диабете повышается до 22 ммоль/л, а уже через пять дней после введения АК комплекса уровень глюкозы падает до 5,5 ммоль/л (таблица). Можно сделать вывод, что исследуемый комплекс имеет высокую эффективность для нейтрализации гипергликемической активности аллоксана.

Таблица

Изменение уровня глюкозы у крыс с аллоксановым диабетом до и после введения АК комплекса (n= 6)

Уровень глюкозы в крови крыс (ммоль/л)		
Контроль	Аллоксановый диабет	После введения аминокислотного комплекса
6.1 ± 0.12	22 ± 0.75	5.5 ± 0.4

p< 0.05

Как известно, жидкое состояние крови обеспечивается динамическим взаимодействием прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических реакций. Результатом этого взаимодействия является свертываемость цельной крови, позволяющая оценить ее состояние в целом. Полученные данные свидетельствовали об ускорении свертывания крови (28%) после введения диabetогена. Ускорение свертывания крови обусловлено не только увеличением активности факторов, стимулирующих коагуляцию, но снижением уровня соединений, тормозящих его [7]. После использования АК комплекса в качестве регулятора и лечения аллоксанового диабета, скорость свертывания крови нормализуется (рис.1 А).

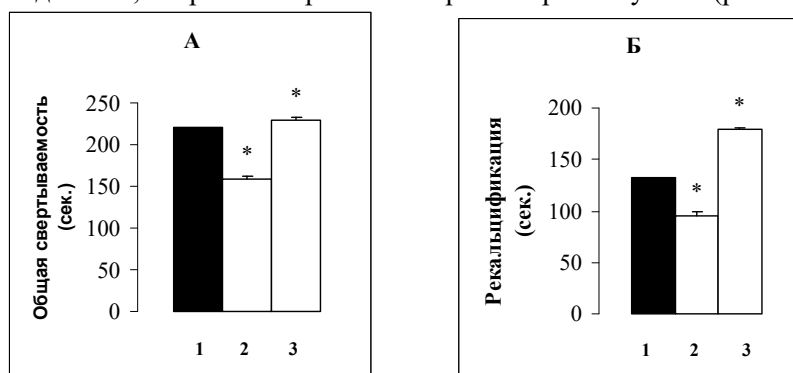


Рис.1. Изменение в гемостазе у крыс с СД1 под действием АК комплекса:

А – общая свертываемость, Б – рекальцификация;

1 – контроль, 2 – СД1, 3 – СД1 + АК комплекс.

* Достоверные различия между контролем и опытом (p<0,05), (n=6)

Анализ данных по выявлению действий сначала аллоксана, затем АК комплекса на время рекальцификации плазмы крови, по сравнению с контролем, имеет следующие результаты: время рекальцификации укорачивается на 30% в первом случае и увеличивается на 35,5% во втором (рис.1 Б). Укорочение времени рекальцификации плазмы указывает на повышение свертываемости крови, а увеличение – на замедление. Следующий параметр, который характеризует плазменный гемостаз – протромбиновое время. У крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом, по сравнению с контрольными животными, протромбиновое время плазмы крови сокращается на 21%, но через пять дней после ежедневного введения тестируемого комплекса увеличивается на 42% (рис.2 А).

Один из параметров, отражающих состояние свертывающей системы крови – тромбиновое время – время, необходимое для образования сгустка фибрина в плазме, зависит от концентрации фибриногена и активности ингибиторов тромбина и оценивает как образование фибрина, так и состояние естественных и патологических антикоагулянтов. Как видно из рис.2 Б, у диабетических крыс, по сравнению со здоровыми животными, тромбиновое время укорачивается на 29%, а после подавления гипергликемического эффекта аллоксана АК комплексом, по сравнению с контролем, тромбиновое время увеличивается на 20%.

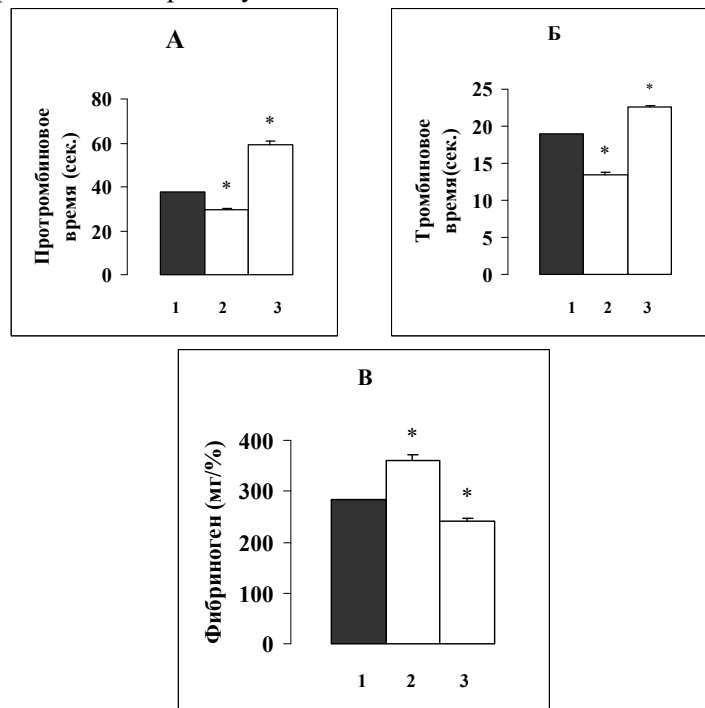


Рис.2. Изменение в гемостазе у крыс с СД1 под действием АК комплекса:

А – протромбиновое время, Б – тромбиновое время,

В – концентрации фибриногена; 1 – контроль, 2 – СД1, 3 – СД1 + АК комплекс.

* Достоверные различия между контролем и опытом ($p < 0,05$), ($n=6$)

Одним из важных показателей свертывающей системы является фибриноген, который относится к белкам острой фазы, и его концентрация в плазме повышается при инфекции, воспалении, травмах, стрессе. Повышение концентрации фибриногена является прогностическим показателем развития сахарного диабета, инфаркта миокарда, инсульта [2]. У крыс с аллоксановым диабетом, по сравнению с контрольными животными, в плазме крови концентрация фибриногена увеличивается на 26,3% (рис. 2В). Через пять дней введения АК комплекса уровень фибриногена не только нормализуется, но и снижается на 15%.

Результаты настоящих исследований еще раз доказали, что существует корреляция между болезнью СД и повышением свертываемости крови, как и между лечением заболевания и нормализацией свертываемости крови. Однако в этом случае нет простой нормализации коагуляционной способности крови. На рисунках четко показаны изменения в плазме крови диабетических крыс после инъекции АК комплекса, по сравнению с контролем: продлеваются время рекальцификации (35,3%), протромбиновое время (20%), тромбиновое время (42%), снижается концентрация фибриногена (15%). Продление времени общего свертывания крови меньше, так как она оценивает общую коагуляционную активность цельной крови, что является ориентировочным показателем многоступенчатого процесса свертывания крови.

Анализируя полученные данные можно заключить, что после введения АК комплекса происходит количественное изменение плазменных факторов в крови, повышение уровня антикоагулянтов и их активация, уменьшение концентрации фибриногена, стимуляция активаторов фибринолиза – повышение ингибиторов.

Принимая во внимание эти обстоятельства, можно сделать вывод, что АК комплекс, который мы изучаем впервые, помимо успешно нейтрализующего гипергликемического действия аллоксана, обладает противосвертывающей активностью и может применяться в качестве регулятора свертывающей системы крови.

Поступила 18.05.21

**Գլյուկոզի մակարդակի և հեմոստազի որոշ ցուցանիշների
փոփոխությունը նոր ամինաթթվային կոմպլեքսի ազդեցության տակ
փորձարարական փորձանային դիաբետով առնետների մոտ**

**Ջ.Խ. Պարոնյան, Հ.Ս. Խաչատրյան, Հ.Ա. Ստեփանյան,
Լ.Ս. Գրիգորյան, Լ.Ն. Առաքելյան**

Ժամանակակից դիաբետոլոգիան իր տրամադրության տակ ունի բազմաթիվ լավ ուսումնասիրված դեղամիջոցներ, որոնք ակտիվորեն օգտագործվում են շաքարային դիաբետը և նրանով պայմանա-

վորված բարդությունները բուժելու համար, սակայն հիվանդների 2/3-ի մոտ չեն նկատվում բավարար արդյունքներ, ուստի կա նոր դեղամիջոցների պահանջարկ: Ներկայումս գրանցված են բազմաթիվ դեղամիջոցներ, որոնք կազմված են ամինաթթուների տարբեր համակցություններից: Պրոֆեսոր Ռ.Գ. Քամալյանի կողմից առաջարկվել և հաջողությամբ փորձարկվել են մի քանի այդպիսի կոմպլեքսներ, որոնցից մեկը մեր ուսումնասիրության առարկան է: Այն բաղկացած է ԳԱԿԹ-ից (Գամմա ամինակարապաթթու), գլուտամինից, β -ալանինից և ԷՕՍ-ից (Էթանոլամին-Օ-սուլֆատ): Ուսումնասիրվել է տվյալ կոմպլեքսի ազդեցությունը փորձարարական ալոքսանային դիաբետով առնետների գլյուկոզի մակարդակի և արյան մակարդման որոշ ցուցանիշների վրա: Ըստ ստացված տվյալների՝ ՇՂ1-ով առնետների մոտ, ամինաթթվային կոմպլեքսի ամենօրյա ներարկումից հինգ օր անց գլյուկոզի մակարդակը միջինը 22 մմոլ/լ-ից իջել է 5.5 մմոլ/լ: Դրական փոփոխություններ են տեղի ունենում նաև հեմոստազի համակարգում՝ ամինաթթվային կոմպլեքսի ներարկումից հինգ օր հետո հիվանդ առնետների մոտ, համեմատած ստուգիչ կենդանիների հետ, տեղի են ունենում հետևյալ փոփոխությունները. ռեկալցիֆիկացիայի ժամանակը երկարում է 35.3%-ով, պրոտրոմբինային և տրոմբինային ժամանակները երկարում են համապատասխանաբար՝ 20% և 42%-ով, իսկ ֆիբրինոգենի մակարդակը իջնում է 15%-ով:

Հաշվի առնելով ստացված արդյունքները՝ կարող ենք եզրակացնել, որ նման բաղադրությամբ առաջին անգամ մեր կողմից փորձարկվող ամինաթթվային կոմպլեքսը, բացի ալոքսանի հիպերգլիկեմիկ ազդեցությունը չեզոքացնելուց, ունի նաև հակամակարդիչ ակտիվություն և կարող է կիրառվել որպես արյան մակարդման համակարգի կարգավորիչ:

Alteration of Glucose Level and Some Hemostasis Parameters under the Action of the New Amino Acid Complex in Rats with Experimental Alloxan Diabets

**Z.Kh. Paronyan, H.S. Khachatryan, H.A. Stepanyan, L.S. Grigoryan,
L.N. Araqelyan**

Modern diabetology has many well-studied drugs actively used to treat diabetes and its complications. However, in 2/3 of the patients there are not seen satisfactory results, so a further search for drugs is required. Many medical preparations are currently registered containing various amino acid combinations. Professor R. G. Qamalyan proposed and successfully tested several amino acid complexes, one of which was the subject of our

research. It consists of GABA, glutamine, β -alanine und ethanolamine – O – sulfate. The effect of this complex on changes in glucose levels and some parameters of hemostasis were studied in rats with experimental alloxan diabetes.

According to data obtained in rats with diabetes1, five days after everyday injection of the amino acid complex, the average glucose level decreases from 22mmol/L to 5.5mmol/L, which is even lower by 10% than in control animals. There are also positive changes in the hemostasis system. On the fifth day after the injection of the amino acid complex, the following changes occur in the blood plasma of patients with diabetes1, in comparison with the control: the recalcification period is extended by 35.3%, the prothrombin time - by 20%, the thrombin time - by 42%, the concentration of fibrinogen is decreased by 15%.

Based on the results obtained, we can conclude that the amino acid complex being tested for the first time with such a composition, in addition to neutralizing the hyperglycemic effect of alloxan, possess the own anti-coagulant activity and can be used as a regulator of the blood clotting system.

Литература

1. Баева Г. Бета-аланин: действие на организм. Zaryad – zh; zni.ru.
2. Бокарев И.Н., Доронина А.М., Липинская Б. Фибриноген и его роль в атерогенезе при сахарном диабете. Клиническая медицина, 2007, 85 (7), с.52 - 55.
3. Витковский Щ.А., Кузник Б.И., Солтов А.В. и др. Сравнительная характеристика состояния иммунитета и гемостаза при сахарном диабете 1 и 2 типов. Тромбоз, гемостаз и реология, 2009, 4, с.33 - 47.
4. Древалъ А.В., Мисникова И.В. Новые перспективы в лечении сахарного диабета. Рус.мед журнал. Эндокринология, 2006, 14 (13), с. 956 - 958.
5. Едигарова Л.В., Акопян В.Г. Антиагрегантная активность сосудистой стенки и возможность ее коррекции ГАМК-ергическими средствами в условиях гипокинезии. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2000, 5, с. 41 - 43.
6. Левит Ш.Б. Комбинация для регенеративной терапии больных сахарным диабетом 1 типа. JD:39270164, номер патента: RU 2694527, 2019, с.1
7. Луговской Э.В. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. Киев, 2003.
8. Рудберг П.А. Лабораторное дело, 1961, с. 6.
9. Солун М.Н., Киричук В.Ф., Духт Н.И. Особенности микроциркуляторного гемостаза при сахарном диабете.Фундаментальные исследования,2008, 6, с.67 - 70.
10. Хачатрян Н.Х., Варданян А.Г., Тароян С.Г., Хачатрян Р.С., Камалян Р.Г. Влияние метаноламин – О – сульфата на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс в норме и при экспериментальном аллоксановом диабете. Биол. журн. Армении, 2017,69(1), с. 68 - 72.
11. Хачатрян Р.С., Хачатрян Н.Х., Камалян Р.Г. Антидиабетогенное действие комплекса нейроактивных аминокислот на модели аллоксанового диабета. Биол. журн. Армении, 2019, 4(71), с. 66 - 69.
12. Чеза М. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование карнозиновой добавки, fitness.imperia-br.ru.
13. Creager M.A., Luscher T.F., Cogentino F., Bechman J.A. Diabetes and Vascular disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy, Part 1. Circulation, 2003, 108(12), p. 1527 - 1532.

14. *Folsom A., Wu K., Rasmussen M.* Determinants of population changes in fibrinogen and factor VII over 6 year. *Trombosis*, 2000, 20, p. 601.
15. *Lee R., White P.* clinical study of the coagulation time of blood. *Amer. J. Med.*, 1973, VC XLY 4, p. 495 - 503.
16. *Missov R., Stolk R., Van der Bom et al.* *Diabetes Care*, 1996, 19, 1578211, 159.
17. *Purwana I., Zheng J., Deurboo X..Li., Son Do, Zhang Z., Liang C., Shen E. et al.* *diabetes*, 2014, 63(12), p. 4197 - 4205.
18. *Riggezi Z.M., J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1(7), p. 1335 - 1342.
19. *Soltani nopton, Qio Hongmin, aleksis Mila, Glinka Yelna, Zhao Fang, Liu Rui et al.* GABA exerts protective and regeneration effects on islet beta cels and reverses diabetes. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 2011, 108(28), p. 11692 - 11697.
20. *Stratmann B., Tschoepe D.* Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. *Diabets and vascular disease reaearch. Official journal of the International Socity of Diabets and Vascular disease*, 2005, 2(1), p.16 - 23.