

УДК 577.171.55

DOI:10.54503/0514-7484-2022-62.4-78

**Влияние аминокислотного комплекса на
фибринолитический потенциал крови здоровых
и с экспериментальным диабетом крыс**

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

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

Ключевые слова: сахарный диабет, аминокислотный комплекс, фибринолиз,
фибриноген, этаноламин –О– сульфат, ГАМК, β-аланин,
глутамин

Гипергликемия – фактор риска для сердечно-сосудистых и цереброваскулярных процессов. Независимо от других факторов риска, у больных с сахарным диабетом (СД) отмечается значительный (более чем вдвое) рост частоты развития сердечно-сосудистых осложнений, увеличение числа ишемической болезни сердца, ишемического инсульта [9]. Для СД характерно увеличение активности плазменных факторов свертывания (фактор VII, фибриноген, тромбин), активация калликреин – кининовой системы, изменение в фибринолизе. Сведения о состоянии фибринолитической активности достаточно противоречивы: в некоторых работах описывается повышенный или неизменный тромболиз, но большинство исследований показывают снижение потенциала фибринолиза [10,11]. Лечение СД1 предполагает пожизненные инъекции инсулина, без чего заболевание прогрессирует до возникновения тяжелых осложнений (диабетическая кардиомиопатия, инсульт, почечная недостаточность, кетоацидоз), приводящих к инвалидности или смерти. С другой стороны, длительный прием инсулина может вызвать ряд осложнений. Очень высок риск гипогликемии, способствующий развитию атеросклероза и артериальной гипертензии. Чтобы избежать таких осложнений, важен поиск новых лекарственных средств, которые смогут избавить больного от ежедневного введения инсулина.

В настоящее время зарегистрирован ряд лекарственных препаратов, состав которых представлен аминокислотами в различных комбинациях [2,5]. Достаточно эффективным аминокислотным комплексом (АК комплекс) является изучаемая нами смесь, состоящая из гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), глутамина, β-аланина и этаноламин–О–сульфата (ЭОС).

Основной компонент АК комплекса – ГАМК в β -клетках поджелудочной железы индуцирует деполяризацию мембраны и увеличивает секрецию инсулина, оказывает разнонаправленное положительное воздействие на β -клетки, которые стимулируют клеточную пролиферацию и антиапоптоз, что делает ее эффективным средством для лечения диабета. Остальные компоненты АК комплекса способствуют активности ГАМК – известно, что введение ЭОС повышает уровень ГАМК в мозге и поджелудочной железе [4]. ЭОС ингибирует фермент ГАМК – трансаминазу, который предотвращает метаболизм ГАМК. Из глутамин и глутаминовой кислоты под воздействием глутаматдекарбоксилазы синтезируется ГАМК. β -аланин является прямым предшественником биогенного дипептида – карнозина, который в организме выполняет функцию рН-буфера, антиоксиданта, нейропротектора, активного модулятора иммунной системы [6].

При выборе или разработке гипогликемического средства необходимо учитывать те изменения, которые происходят при СД с ключевыми показателями системы гемостаза. Применение данного АК комплекса с целью регуляции уровня глюкозы у животных с экспериментальным аллоксановым диабетом показало, что помимо подавления гипергликемического действия аллоксана происходят количественные изменения плазменных факторов крови, повышение уровня антикоагулянтов и их активация, уменьшение концентрации фибриногена, т.е. АК комплекс проявляет противосвертывающую активность [3].

Целью настоящей работы было исследование влияния АК комплекса на фибринолитический потенциал плазмы крови здоровых крыс, после инициирования аллоксаном СД, и выздоровевших в результате пятидневного введения АК комплекса.

Материал и методы

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах-самцах массой 180–200 г. Животные содержались на обычном рационе вивария. Эксперименты на животных проведены в соответствии с этическими принципами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986 г.). Использовано 54 животных, которые были распределены на 4 группы: I – контрольная, внутрибрюшинная инъекция физиологического раствора 0,85% NaCl (0,25 мл/100 г массы тела), II – однократная внутрибрюшинная инъекция аллоксана (150 мг/1 кг массы тела), III – индукция диабета аллоксаном и инъекция АК комплекса, в течение пяти дней (75 мг/1 кг массы тела), IV – здоровые животные разделены на три подгруппы, которым внутривенно вводили разные дозы АК комплекса (5, 10, 15 мг/100 г массы тела). Забор крови для исследования проводили через 30 и 60 мин из той же вены с антикоагулянтом – 3,8% цитратом натрия в соотношении 9:1.

Развитие заболевания СД регистрировали по клинической симптоматике (полиурия, снижение веса и т.д.) и уровню глюкозы в крови. Модель считали полученной, когда уровень глюкозы в крови достигал ≥ 17 ммоль/л. Уровень глюкозы в крови крыс измеряли утром перед кормлением с помощью глюкометра Сателлит (Россия).

Для определения тромболитического потенциала плазмы крови крыс использовали унифицированный метод определения фибринолитической активности путем лизиса эуглобулинов плазмы [1]. В опытах использовали стандартные аминокислоты фирмы Sigma Chemical Company (USA).

Для определения статистической достоверности различий между контролем и опытными выборками использовали непараметрический критерий Манн–Уитни U. Данные представлены $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Уровень значимости $p \leq 0,05$ считали достоверным по сравнению с контролем.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния АК комплекса на крысах с экспериментальным диабетом показало, что у контрольных животных был зарегистрирован средний уровень глюкозы $6,1 \pm 0,12$ ммоль/л, который при аллоксановом диабете повышается до $17 \pm 0,6$ ммоль/л, а после пятидневного введения АК комплекса падает до $5,9 \pm 0,4$ ммоль/л (таблица). Полученные данные доказывают, что исследуемый комплекс с высокой эффективностью нейтрализует гипергликемическое действие аллоксана.

Таблица

Уровень глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом до и после введения АК комплекса ($n = 6$)

Уровень глюкозы в крови крыс (ммоль/л)		
Контроль	аллоксановый диабет	АК комплекс
$6,1 \pm 0,12$	$17 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,4$

$p \leq 0,05$

Коагуляционная и фибринолитическая системы строго регулируются и взаимосвязаны посредством механизмов, обеспечивающих сбалансированный гемостаз. Неотъемлемая часть системы гемостаза – фибринолиз, предотвращает закупорку кровеносных сосудов сгустками фибрина, путем его протеолитического расщепления под воздействием основного фермента фибринолиза – пламина. При различных патологических процессах, когда соотношение между про- и антифибринолитическими составляющими крови нарушается, активизируются белки (ферменты), под влиянием которых из пламиногена образуется пламин. Как отмечалось выше, в литературе имеются противоречивые данные об

изменении фибринолитической активности у больных СД. Анализ полученных нами данных по выявлению воздействия сначала аллоксана, затем АК комплекса на время фибринолиза в плазме крови крыс показывает следующие результаты: по сравнению с контролем время тромболиза в первом случае увеличивается на 10 мин (7%), а во втором – уменьшается на 20 мин (14%), а по сравнению с временем фибринолиза при экспериментальном СД на 30 мин (20%) (рис.1).

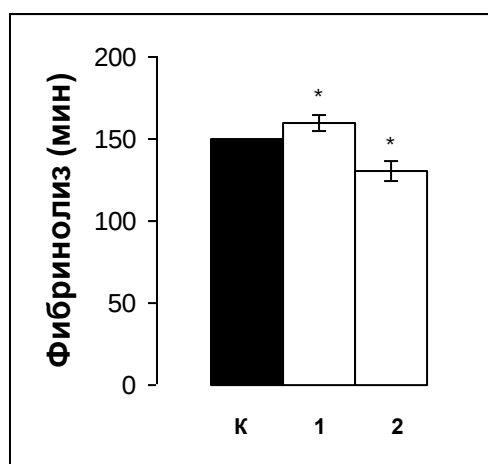


Рис.1. Фибринолитическая активность в плазме крови крыс с аллоксановым СД (1) и после пятидневного введения АК комплекса (2);
*достоверные различия между контролем и опытом ($p \leq 0,05$)

В последние годы большое внимание уделяется значению уровня фибриногена у больных СД, а его повышенный уровень учитывается как самостоятельный прогностический фактор повреждения сосудистой стенки [8]. Ранее нами было показано, что у крыс с аллоксановым диабетом, по сравнению с контрольными животными, в плазме крови уровень фибриногена увеличивается на 26,3%, а пятидневное введение АК комплекса не только нормализует, но и снижает его на 15% [3]. Повышенный уровень фибриногена в плазме (гиперфибриногенемия) коррелирует с риском сердечно-сосудистых заболеваний, артериального и венозного тромбоза. Было показано, что гиперфибриногенемия увеличивает содержание фибрина в тромбе, способствует более быстрому образованию фибрина и повышает устойчивость фибриновой сети, т. е. способствует тромбозу и резистентности к тромболизису [12].

Тот факт, что АК комплекс восстанавливает и ускоряет процесс тромболизиса в крови животных с экспериментальным аллоксановым диабетом, свидетельствует о его фибринолитической активности (рис.1). Чтобы уточнить влияние АК комплекса на фибринолитическую активность в крови здоровых животных, путем предварительных экспериментов были

выбраны три наиболее эффективные дозы АК комплекса (5, 10 и 15 мг/100 г массы тела) и подобраны оптимальные сроки его действия (30 и 60 мин). Как видно из рис.2, АК комплекс обладает хорошо выраженной тромболитической активностью у здоровых животных: при внутривенном введении доз по 5 и 10 мг/100 г после 30 и 60 минут фибринолитическая активность крови возрастает на 35% и 37% (практически одинаково), при более высокой дозе (15 мг/100 г) процесс тромболизиса ускоряется настолько (73–76%), что его можно считать гиперфибринолизом, конкретная причина которого не определяется с помощью этой методики, так как время лизиса эуглобулина используется для общей оценки фибринолитического потенциала крови, что и являлось нашей целью.

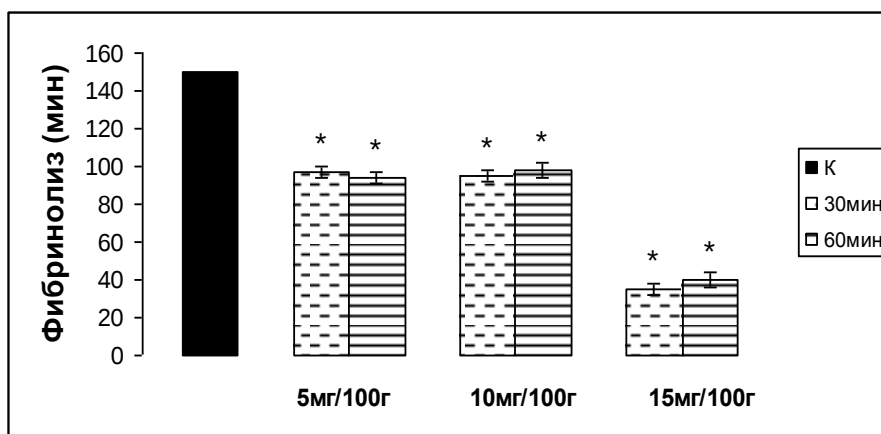


Рис.2. Изменение фибринолитической активности в плазме крови здоровых крыс под действием трех доз АК комплекса;

*достоверные различия между контролем и опытом ($p \leq 0,05$)

Ускорение лизиса фибринового тромба означает, что фибринолитический потенциал плазмы, который зависит от состояния эуглобулиновой фракции, увеличен. Известно, что фибринолитическая активность регулируется или действием прямых ингибиторов, или нарушением связывания фермента с субстратом. Так как в эуглобулиновой фракции плазмы исключается присутствие ингибиторов фибринолиза, скорость эуглобулинового лизиса может зависеть от содержания активаторов плазминогена, плазмина, фибриногена. Одной из причин увеличения фибринолитической активности, возможно, является отклонение содержания фибриногена в плазме в сторону понижения под действием АК комплекса [3]. По литературным данным, фибринолитическая активность зависит не только от активности ферментов, но и от свойств фибринового сгустка: полноты поперечной сшивки под действием фибринстабилизирующего фактора (XIIIa), плотности, толщины, разветвленности волокон и т.д. [13]. Она зависит также от таких физических факторов, какими являются про-

нищаемость ферментов, площадь поверхности фибриновых волокон, адсорбция и десорбция белков [14]. Для преодоления гипофибринолитического состояния и восстановления способности крови растворять тромбы применяются такие фибринолитические препараты (тромболитическая терапия), как препарат рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (t-PA) – альтеплаза и ряд его производных, стрептокиназа, урокиназа и др. [7]. Однако тромболитическая терапия имеет недостатки: кровоточивость, неэффективный тромболизис, быстрая инактивация применяемых препаратов в кровотоке.

Учитывая тот факт, что АК комплекс дозозависимо ускоряет фибринолитическую активность плазмы крови на 35–76%, возникает предположение, что он может быть использован при лечении различных тромболитических состояний, которые поддаются лечению фибринолитическими препаратами.

Поступила 19.07.22

Ամինաթթվային կոմպլեքսի ազդեցությունը առողջ և փորձարարական շաքարախտով հիվանդ առնետների արյան ֆիբրինոլիտիկ պոտենցիալի վրա

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

Օգտագործելով արյան ֆիբրինոլիտիկ ակտիվության որոշման պլազմային էուզլոբուլինների լիգնի մեթոդը՝ ուսումնասիրվել են արյան մեջ տեղի ունեցող թրոմբոլիտիկ ակտիվության փոփոխությունները փորձարարական ալոքսանային շաքարային դիաբետով (ՇԴ1) առնետների մոտ և ամինաթթվային կոմպլեքսի (ԳԱԿԹ, β-ալանին, գլուտամին և էթանոլամին-Օ-սուլֆատ) ներարկմամբ գլյուկոզի մակարդակը կարգավորելուց հետո: Ըստ ստացված տվյալների՝ ՇԴ-ով առնետների մոտ, ստուգիչ կենդանիների հետ համեմատած, ֆիբրինոլիզի ժամանակը երկարում է 10 րոպեով (7%) և, ընդհակառակը, ամինաթթվային կոմպլեքսի 5-օրյա ներարկումից հետո կրճատվում է 20 րոպեով (14%), իսկ ՇԴ-ով կենդանիների հետ համեմատած այն կրճատվում է 30 րոպեով (20%): Այն փաստը, որ ամինաթթվային համալիրը վերականգնում և արագացնում է թրոմբոլիզի գործընթացը փորձարարական ՇԴ-ով կենդանիների արյան մեջ, վկայում է նրա ֆիբրինոլիտիկ ակտիվության մասին: Ֆիբրինոլիզի գործընթացում ամինաթթվային համալիրի դերը ճշտելու համար հետագա ուսումնասիրությունները կատարվել են առողջ կենդանիների վրա: Ըստ ստացված արդյունքների՝ ամինաթթվային համալիրի 5 և 10 մգ/100 գ չափաբաժինների ներերակային ներարկումներից 30 և 60 րոպե հետո ֆիբրինոլիտիկ ակտիվությունը բարձրանում է համապատասխանաբար՝ 35% և 37%-ով, իսկ ավելի բարձր չափաբաժինը՝ 15 մգ/100 գ, թրոմբոլիզի

պրոցեսն այնքան է արագացնում (73-76%), որ այն կարելի է համարել հիպերֆիբրինոլիզ, որի ճշգրիտ մեխանիզմը հնարավոր չէ պարզաբանել այս մեթոդի միջոցով, քանի որ էուզլոբուլինի լիզիսի ժամանակն օգտագործվում է արյան ֆիբրինոլիտիկ ներուժի վերաբերյալ ընդհանուր գնահատական տալու համար, որը և մեր ուսումնասիրության նպատակն էր:

Հաշվի առնելով այն փաստը, որ ամինաթթվային կոմպլեքսը՝ չափաբաժին-կախյալ, արագացնում է արյան պլազմայի ֆիբրինոլիտիկ ակտիվությունը 35 – 76%-ով, կարելի է ենթադրել, որ այն, ի թիվս այլ դեղամիջոցների, կարող է օգտագործվել տարբեր թրոմբոզային վիճակների թերապիայում:

Effect of the Amino Acid Complex on the Fibrinolytic Potential of Blood in Healthy and Experimental Diabetic Rats

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

Effect of the amino acid complex (GABA, β -alanine, glutamine amino acids, and ethanolamine-O-sulfate) on the blood thrombolytic activity was studied in rats with the experimental alloxan diabetes mellitus model, as well as in the diabetic rats after a five-day injection of the amino acid complex (AA complex). Method of the plasma euglobulins lysis has been used to determine the blood fibrinolytic activity. According to the data obtained, in rats with diabetes mellitus fibrinolysis time is increased by 10 minutes (7%) compared to control animals. On the contrary, after 5 days of intraperitoneal injection of the amino acid complex, fibrinolysis time is reduced by 20 minutes (14%), and 30 minutes (20%) compared to animals with diabetes. The fact that the AA complex restores and accelerates the process of thrombolysis in the blood of animals with experimental alloxan diabetes mellitus indicates its fibrinolytic activity. Further studies have been performed on the animals to determine the role of the AA complex in fibrinolysis under the normal conditions. Thus, the intravenous injection of the AA complex in 5mg/100g and 10mg/100g doses had a well-pronounced thrombolytic activity in the healthy animals after 30 and 60 minutes, increasing its fibrinolytic activity by 35% and 37%. But at a higher dose (15 mg/100g) of the AA complex, the thrombolysis process was accelerated by 73% -76% which could be considered as a hyperfibrinolysis. In this experiment, the specific cause of hyperfibrinolysis is not determined by the method used, as the time of euglobulin lysis is used to give a general estimate of the blood fibrinolytic potential, which was the goal of our study.

Data on the dose /dependent effect of the amino acid complex on the acceleration of blood plasma fibrinolytic activity suggest that it may be used in therapy with various thrombotic states.

Литература

1. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии, М., 2013, т.2, с. 223-224.
2. *Левит Ш.Б.* Комбинация для регенеративной терапии больных сахарным диабетом 1 типа. JD:39270164, номер патента: RU 2694527, 2019, с.1.

3. *Паронян З. Х., Хачатрян Р. С., Степанян А. А., Григорян Л. С., Аракелян Л. Н.* Изменения уровня глюкозы и некоторых показателей свертывания крови у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом под действием нового аминокислотного комплекса. Мед. наука Армении НАН РА, 2021, т. LXI, 3, с. 64-72.
4. *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, т. 69, 1, с. 68 - 72.
5. *Хачатрян Р. С., Хачатрян Н. Х., Камалян Р. Г.* Антидиабетогенное действие комплекса нейроактивных аминокислот на модели аллоксанового диабета. Биол. журн. Армении, 2019, т. 71, 4, с. 66 - 69.
6. *Чежа М.* Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование карнозиновой добавки, fitness.imperia-br.ru.
7. *Bell W. R.* Present-day thrombolytic therapy: therapeutic agents-pharmacokinetics and pharmacodynamics. Rev. Cardiovasc. Med., 2002, v.3, suppl. 2, pp. 34-44.
8. *Corrado E., Rizzo M., Muratori I.* Association of elevated fibrinogen and CRP levels with carotid lesions in patients with newly diagnosed hypertension or type 2 diabetes. Arch. Med. Res., 2006, v. 37, №8, pp.1004-1009.
9. *Cosentino F., Grant P.J., Aboyans V.* 2019 Рекомендации ESC/EASD по сахарному диабету, предиабету и сердечно-сосудистым заболеваниям Европейского общества кардиологов (ESC, EOK) и Европейской ассоциации по изучению сахарного диабета (EASD, EACD) II, Российский кардиологический журнал, 2020, 25(4), с.101-160.
10. *Dunn EI, Grant PI.* Type 2 diabetes: an atherothrombotic syndrome, Curr Mol Med 2005, 5, 323-32.
11. *Festa A., Williams K., Tracy RP et al.* Progression of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen levels in relation to incident type 2 diabetes. Circulation, 2006, 113, 1753-59.
12. *Keble R. Machlus, Jessika C. Cardenas, Frank C. Church, Alisa S. Wolberg.* Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice, Blood, 2011, 117 (18): 4953-4963.
13. *Weisel J. W.* Structure of fibrin: impact on clot stability, J. Thromb. Haemost. 5, Suppl.1, 2007, pp. 116-124.
14. *Weisel J. W., Litvinov R. I.* The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate, Cardiovasc. Hematol. Agents Med Chem., 2008, v. 6, pp. 161-180.