

УДК 615.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНОГО АКТИВАТОРА Ca-ЗАВИСИМОЙ NO-СИНТАЗЫ НА ГЕМОСТАЗ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.С. Орлова^{1*}, Е.В. Орлова², О.В. Петрова¹, Я.М. Станишевский¹

Резюме. В работе показано влияние нового препарата – селективного активатора Ca-зависимой NO-синтазы на процессы гемостаза в норме и при диабете 2 типа у лабораторных животных.

Ключевые слова: гемостаз, диабет 2 типа, Ca-зависимая NO-синтаза.

INVESTIGATION OF A CA-DEPENDENT INDUCER ON HEMOSTASIS PROPERTIES IN LABORATORY ANIMALS

V.S. Orlova^{1*}, E.V. Orlova², O.V. Petrova¹, Ya.M. Stanishevskiy¹

Abstract. The effect of a new drug – selective activator of Ca-dependent NO-synthase on the processes of hemostasis in norm and type 2 diabetes in laboratory animals is shown in this paper.

Keywords: hemostasis, type 2 diabetes, Ca-dependent NO-synthase.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 115093, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), 142290, Россия, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Institute of Theoretical and Experimental Biophysics (ITEB) RAS, 3, Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: eaglson@mail.ru

Тел.: 8 (499) 936 85 99

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее тяжелых проявлений сахарного диабета является поражение сердечно-сосудистой системы, развитие микро- и макроангиопатий [1], приводящих к поражению почек (нефропатии) [2], нервной системы (нейропатии) [3], глаз (ретинопатии) [4], ишемии мозга (инсульты) [1], сердца (инфаркты) [1], окклюзии периферических сосудов (трофические язвы, эндартерииты) [1]. В основе этих процессов лежит не только нарушение обмена веществ, но и нарушение гемостаза.

Система гемостаза обеспечивает сохранение крови в жидком состоянии в пределах кровеносных сосудов, образование тромбов в области повреждения стенки сосудов и уборку тромбов после восстановления сосудистой стенки. Условно гемостаз разделяют на три системы: свертывающую, противосвертывающую и фибринолиз, которые тесно взаимодействуют между собой, а также с эндотелиальными клетками, выстилающими внутреннюю стенку сосудов (так называемую интиму).

Каждая из этих систем многокомпонентна, состоит из целого ряда факторов крови, белков,

ферментов, ростовых факторов, микроэлементов, из которых наиболее важную роль играет ионизированный кальций, активирующий Ca-зависимую NO-синтазу, от активности которой зависит образование оксида азота (NO). Оксид азота является «модератором» всех функций эндотелия, так как регулирует активность и последовательность запуска всех остальных биологически активных веществ, продуцируемых эндотелием.

NO – базовый фактор антиатерогенеза, ответственен за расширение сосудов, блокирует образование на поверхности эндотелия клеток адгезии, соответственно блокирует адгезию и агрегацию тромбоцитов. Тромбоциты играют большую роль в гемостазе, они обеспечивают равновесие между свертывающей и противосвертывающей системами крови, а также влияют на структурно-функциональное состояние эндотелиальных клеток. Тромбоциты способны прилипать к эндотелию сосудистой стенки (адгезия) и образовывать комплексы друг с другом (агрегация). Физиологическая активность тромбоцитов начинается тогда, когда поврежден сосудистый эндотелий и обнажается субэндотелиальный внеклеточный матрикс.

Участие тромбоцитов в гемостазе заключается в следующем:

- 1) поддержание нормальной структуры и функции микрососудов, то есть репарации эндотелиальных клеток;
- 2) спазм поврежденных сосудов путем секреции vasoактивных веществ – серотонина, катехоламинов, тромбомодулина и других, содержащихся в плотных гранулах и α -гранулах тромбоцитов;
- 3) образование в поврежденном сосуде тромба путем адгезии тромбоцитов к субэндотелию сосудов и образование агрегатов, участие тромбоцитарных факторов в процессе свертывания крови и в регуляции фибринолиза;
- 4) стимуляция репарации поврежденной сосудистой стенки выделяющимися ростовыми факторами из адгезированных тромбоцитов.

Процессы агрегации и дезагрегации тромбоцитов строго дозированы, так как усиление одного или другого процесса может соответственно привести к коагулопатии или к кровотечениям.

При сахарном диабете регуляция процессов гемостаза нарушена, усиление агрегации тромбоцитов приводит к нарушению свертывающей системы крови вплоть до развития ДВС-синдрома, который является сигналом крайне тяжелого повреждения сосудистого русла.

ДВС-синдром – это избыточное внутрисосудистое свертывание крови, приводящее к геморрагической коагулопатии потребления и тяжелым осложнениям со стороны сердечно-сосудистой системы. Крайним выражением ДВС-синдрома является выраженная кровоточивость. Эта фаза внутрисосудистого свертывания получила название коагулопатии потребления или тромбогеморрагического синдрома [5].

Не меньшее значение в нарушении гемостаза имеют и эритроциты. Их основная функция – транспортировка кислорода – присуща не всем формам эритроцитов. Это должны быть хорошо сформированные клетки (двояковогнутые дискоциты), легко деформируемые и ответственные за микрореологические параметры крови.

Повышение способности эритроцитов к агрегации и уменьшение их деформируемости приводит к нарастанию вязкости крови, что затрудняет ее продвижение по микроциркуляторному руслу и, соответственно, к нарушению процессов гемостаза.

Наиболее доступный метод изучения агрегации эритроцитов – это определение агрегированных эритроцитов в мазке крови.

Таким образом, при сахарном диабете необходимо является не только компенсация обмена веществ, но и возможное воздействие на процессы агрегации в русле крови, особенно для предотвращения развития ДВС-синдрома.

В связи с этим задачей исследования явилось изучение влияния препарата «Витанам» на агрегированные тромбоциты и эритроциты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крыс содержали в клетках Т₄ по 5 особей в клетке, кроликов – по 1 особи при температуре 22±3 °С и относительной влажности 60±10%. Освещение – искусственное, продолжительность светлого и темного периодов – 12 ч. В помещении поддерживался 12-кратный воздухообмен, животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму и к питьевой воде. Все животные получали стандартный комбикорм К-122, изготовленный НПО «Сельскохозяйственные технологии», состав, пищевая ценность, содержание витаминов и микроэлементов которого указаны в таблице 1.

Комбикорм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам, витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов.

Таблица 1.

Состав и показатели качества гранулированного корма К-122 для мелких лабораторных животных

В состав корма входят	%	Показатели качества	%
Овес	5	Сырой протеин	17,3
Кукуруза, ячмень	12,1		
Пшеница	14,2		
Шрот подсолнечниковый	7,6	Обменная энергия	247,0 ккал
Отруби пшеничные	15	Сырая клетчатка	9,95
Дрожжи кормовые	2,9	Сырой жир	2,78
Травяная мука 1 класса	27	Са	0,75
Соль поваренная	0,3	Р	0,51
Премикс минерально-витаминный	1	Натрий хлористый	0,54
Мука рыбная	2,8	Лизин	0,75
Мел кормовой	1,6	Мет. + Цист.	0,54

Содержание витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма в мг:

А – 7,00 тыс. МЕ; В₁₂ – 0,02; В₂ – 3,00; В₃ – 20,00; В₄ – 292,00; В₅ – 20,00; В₆ – 4,00; Е – 5,00; Н – 0,10; К₃ – 1,00; Сu – 2,5; Fe – 10; J – 0,7; Mn – 70; Zn – 70 (сертификат соответствия № РОСС RU. П081. ВОО113 ГОСТ 50258-92).

Метод определения тромбоцитов основан на свойстве плазмы крови изменять ее оптическую плотность в зависимости от степени агрегированности тромбоцитов. По определению процента падения оптической плотности плазмы по отношению к контролю можно судить о процессах дезагрегации.

Полученную плазму крови смешивали с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Исследование агрегации тромбоцитов проводили по методу Борна (G. Born), принцип которого заключается в измерении степени изменения оптической плотности плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении к ней индуктора агрегации АДФ фирмы «Технология-Стандарт» в концентрации 10⁻⁵ М. Плазму, богатую и бедную тромбоцитами, получали при центрифугировании со скоростью 1000 об/мин и 3000 об/мин. Плазма, бога-

тая тромбоцитами, должна содержать в среднем $2,5 \times 10^9$ тромбоцитов в одном миллилитре. Подсчет тромбоцитов производился автоматически на агрегометре фирмы Chrono-log (США).

При оценке агрегационной способности тромбоцитов использовали показатель – процент падения оптической плотности плазмы, отнесенный к таковому в контроле. Все исследования проводились максимально приближенно к требованиям GLP (Good Laboratory Practice).

Эксперименты проводились по двум направлениям.

1. *In vitro* – получали плазму от контрольных и экспериментальных животных, а также от доноров и больных сахарным диабетом. Добавлением АДФ индуцировали агрегацию тромбоцитов, а затем добавляли исследуемый препарат в разных концентрациях и определяли величину дезагрегации тромбоцитов под действием исследуемого препарата.

Забор крови у крыс производили непосредственно перед введением препарата, а затем через 30, 60, 120 мин после введения препарата «Витанам»: индуктор агрегации – АДФ (10^{-5} М).

Доза 10 мг дала пролонгированный во времени антиагрегационный эффект, который начинался с 30-й минуты, максимально проявлялся на 60-й минуте и снижался на 120-й минуте.

2. *In vivo* – опыты проводились на белых крысах линии Wistar, самцах, весом 180–200 г и на кроликах породы шиншилла, самцах.

Накануне эксперимента животные не получали корма, вода не ограничивалась. Препарат вводился перорально перед экспериментом. Доза вещества рассчитывалась с учетом оптимальных концентраций, полученных в опытах *in vitro*, с пересчетом на массу животного. Взятие крови, получение плазмы и дальнейшие действия проводились в соответствии с указанной выше методикой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод о наличии дезагрегационного действия препарата (таблицы 2, 3)

В настоящее время применяются антиагреганты нескольких видов, такие как аспирин, курантил, тиклид, плавикс, но все они дают побочные эффекты в виде кровоточивости, агранулоцитоза, головных болей, головокружения, дисфункции печени, некоторые из них вызывают диарею, тромбоцитопению, нейтропению. При применении их необходим постоянный контроль за кровью, определение лейкоцитарной формулы.

Исследуемый препарат «Витанам» выгодно отличается от указанных выше препаратов тем, что имеет выраженное дезагрегирующее действие и не имеет побочных действий.

Таблица 2.

Исследование препарата «Витанам»
на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс
при пероральном введении препарата (*in vivo*)

кол-во вещества	% падения оптической плотности плазмы, обогащенной тромбоцитами <i>in vivo</i>			
	контроль	30 мин	60 мин	120 мин
10 мг per os	56,2	48,7 (14%)	39,6 (30%)	46,5 (20%)
10 мг per os	53,4	40,5 (23%)	36,0 (34%)	50,6 (6%)
плазма крыс со стептоз. диабетом	60,7±1,8	50,1 (18%)	29,8 (50%)	54,2 (11%)

Таблица 3.

Исследование препарата «Витанам»
на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс
при пероральном введении препарата (*in vitro*)

	АДФ – 10^{-5} М	10 мг/мл	20 мг/мл	
		10^{-3} М	10^{-3} М	10^{-4} М
плазма нормальных крыс	49,5	–	38,0 (24%)	41,9 (8%)
плазма крыс со стептоз. диабетом	60,7	56,2 (8%)	28,0 (54%)	49,5 (19%)
плазма кролика (контроль)	61,2	60,0 (0%)	57,5 (7%)	60,8 (0%)
плазма кролика с аллоксановым диабетом	57,0	50,0 (14%)	32,6 (43%)	48,1 (15%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать заключение, что примененный на модели развития ДВС-синдрома препарат «Витанам» оказывает выраженное дезагрегирующее действие и не имеет побочных эффектов, что является новым шагом в разработке отечественных препаратов для терапии таких социально значимых заболеваний, как диабет 2 типа и ДВС-синдром, а также в понимании биохимических путей нормализации гемостаза.

Работа выполнена в рамках Программы реализации комплексных проектов по созданию высокотехнологичного производства (постановление Правительства РФ № 218 от 09.04.2010 г., шифр конкурса 2016-218-09). Договор № 03. G25.310258.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. Аметов, И.О. Курочкин, А.А. Зубков. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания // Русский медицинский журнал. 2014. № 13. С. 954–960.
2. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes-2007. Diabetes Care. 2007. V. 30. P. 4–41.
3. Diseases and Conditions. Diabetic neuropathy. 2015, Mayo Clinic.
4. Diseases and Conditions. Diabetic retinopathy. 2015, Mayo Clinic.
5. M. Diamant, R. Nieuwland, R.F. Pablo, A.W.A. Smit, K. Radder. Elevated Numbers of Tissue-Factor Exposing Microparticles Correlate With Components of the Metabolic Syndrome in Uncomplicated Type 2 Diabetes Mellitus // Circulation. 2002. V. 106. P. 2442–2447.