

УДК: 612.115.3



КОМПЛЕКСНОЕ СОЕДИНЕНИЕ PRO-GLY-PRO-LEU С ГЕПАРИНОМ: ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ, ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЙ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЙ ЭФФЕКТЫ У КРЫС С ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ

Т.Ю. Оберган¹, Н.Ф. Мясоедов², М.Е. Григорьева¹, Л.А. Ляпина¹, Т.А. Шубина¹, Л.А. Андреева²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б. А. Кудряшова
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, 1/12

² Институт молекулярной генетики РАН
123182, Россия, Москва, ул. Курчатова, 2

E-mail: tobergan@mail.ru

Получено 20.09.2019

Рецензия (1) 09.10.2019

Рецензия (2) 15.10.2019

Принята к печати 21.10.2019

Ранее показано, что применение регуляторных пептидов семейства глипролинов способствует нормализации системы гемостаза и уровня глюкозы крови при экспериментальной стойкой гипергликемии у крыс, подобной сахарному диабету 2 типа у человека. Также известно, что антикоагулянт гепарин подавляет свертывание крови и проявляет гипогликемическое действие в организме.

Цель исследования. Получить комплекс пептида Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) и нефракционированного гепарина, изучить его влияние на уровень глюкозы и антикоагулянтно-фибринолитические свойства и показать его способность восстанавливать нарушенные функции инсулярной и свертывающей систем крови при экспериментальной гипергликемии у крыс.

Материалы и методы. Использовались лабораторные крысы-самцы линии Wistar, интактные и с экспериментально вызванной гипергликемией. Было создано комплексное соединение PGPL и гепарина при соотношении компонентов 1: 1 (моль/моль), которое вводили один раз в сутки в течение 5 дней интраназально в дозе 1 мг/кг гипергликемическим крысам. Подобным образом вводили составные части комплекса в эквивалентных количествах. Определяли антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени, параметры фибринолиза по тестам суммарной, ферментативной и неферментативной фибринолитической активности, а также активности тканевого активатора плазминогена. Кроме того, проводилось измерение уровня глюкозы крови с использованием специальных тест-полосок.

Результаты. Применение комплекса PGPL-гепарин у животных с гипергликемией приводило к нормализации уровня глюкозы крови, повышению антикоагулянтного и фибринолитического фона плазмы крови. Эти эффекты сохранялись в течение 6 дней после прекращения введения крысам пептидно-гепаринового комплекса.

Выводы. Комплекс PGPL с гепарином проявляет комбинированное гипогликемическое, антикоагулянтное и фибринолитическое ферментативной и неферментативной природы действие при развитии экспериментальной гипергликемии. Исследуемый пептидно-гепариновый комплекс в перспективе может применяться для профилактики и лечения сахарного диабета 2 типа, осложняющегося повышенной свертываемостью крови.

Ключевые слова: антикоагулянтная активность; уровень глюкозы крови; комплексное соединение; фибринолиз; глипролиновые пептиды; гипергликемия; сахарный диабет 2 типа

Для цитирования: Т.Ю. Оберган, Н.Ф. Мясоедов, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина, Т.А. Шубина, Л.А. Андреева. Комплексное соединение pro-gly-pro-leu с гепарином: гипогликемический, фибринолитический и антикоагулянтный эффекты у крыс с гипергликемией. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5):300-307. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-300-307

© Т.Ю. Оберган, Н.Ф. Мясоедов, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина, Т.А. Шубина, Л.А. Андреева, 2019

For citation: T.Yu. Obergan, N.F. Myasoedov, M.E. Grigorjeva, L.A. Lyapina, T.A. Shubina, L.A. Andreeva. Complex compound of pro-gly-pro-leu with heparin: hypoglycemic, fibrinolytic and anticoagulant effects in rats with hyperglycemia. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5):300-307. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-300-307

COMPLEX COMPOUND OF PRO-GLY-PRO-LEU WITH HEPARIN: HYPOGLYCEMIC, FIBRINOLITIC AND ANTICOAGULANT EFFECTS IN RATS WITH HYPERGLYCEMIA

T.Yu. Obergan¹, N.F. Myasoedov², M.E. Grigorjeva¹, L.A. Lyapina¹, T.A. Shubina¹, L.A. Andreeva²

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Laboratory of protective blood systems
n. a. prof. B. A. Kudryashov, 1/12, Leninskiye gory, Moscow, Russia 119234

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 2, Kurchatov St., Moscow, Russia 123182

E-mail: tobergan@mail.ru

Received 20 September 2019

Review (1) 09 October 2019

Review (2) 15 October 2019

Accepted: 21 October 2019

Previously it was shown that the use of regulatory peptides of the glyprolin family helps to normalize the hemostasis system and blood glucose levels in experimental resistant hyperglycemia in rats, similar to type 2 diabetes mellitus in humans. It is also known that the anticoagulant heparin inhibits blood coagulation and exhibits a hypoglycemic effect in the body.

The aim of the study is to obtain a complex of the Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) peptide and the unfractionated heparin, to study its effect on glucose and anticoagulant fibrinolytic properties and show its ability to restore the impaired functions of the insular and coagulating blood systems in experimental hyperglycemia in rats.

Materials and Methods. Laboratory Wistar male rats, intact and with experimentally induced hyperglycemia, were used in the experiment. A complex compound of PGPL and heparin was created with a component ratio of 1:1 (mol/mol), which was administered intranasally to hyperglycemic rats once a day for 5 days at the dose of 1 mg/kg. Similarly, the constituent parts of the complex were administered in equivalent amounts. The anticoagulant activity was determined by the test of activated partial thromboplastin time, fibrinolysis parameters – by tests of total, enzymatic and non-enzymatic fibrinolytic activities, as well as the activity of a tissue plasminogen activator. In addition, blood glucose was measured using special test strips.

Results. The use of the PGPL-heparin complex in the animals with hyperglycemia led to normalization of blood glucose levels, an increase in the anticoagulant and fibrinolytic background of blood plasma. These effects persisted for 6 days after the cancellation of the peptide-heparin complex administration to rat.

Conclusion. In the development of experimental hyperglycemia, the PGPL complex with heparin exhibits a combined hypoglycemic, anticoagulant and fibrinolytic enzymatic and non-enzymatic nature of the effect. In the future, the studied peptide-heparin complex can be used for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus, complicated by increased blood coagulation.

Key words: anticoagulant activity; blood glucose level; complex compound; fibrinolysis; glyprolin peptides; hyperglycemia; type 2 diabetes mellitus (T2DM)

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что заболеваемость сахарным диабетом 2 типа (инсулиннезависимым, СД2) постоянно растет. Сахарный диабет – это комплекс физиологических дисфункций, характеризующихся стойким повышением глюкозы крови (гипергликемия), обусловленное инсулинорезистентностью, недостаточной секрецией инсулина и избыточным выделением глюкогона в кровь [1, 2]. Гипергликемия и развитие сахарного диабета обычно сопровождаются дисфункцией противосвертывающей системы (ПСС) и гиперкоагуляцией, проявляющейся повышением агрегации тромбоцитов, снижением антикоагулянтной и фибринолитической активности крови [3, 4].

Имеются данные о том, что такие аминокислоты как аргинин, лейцин играют важную роль в профилактике сахарного диабета. Лейцин стимулирует выработку инсулина поджелудочной железой, что приводит к нормальному уровню глюкозы в крови больных сахарным диабетом [5, 6].

Короткие регуляторные пролин- и глицинсодер-

жащие пептиды (глипролины) постоянно вырабатываются в организме в процессе синтеза и деградации коллагена [7]. Некоторые глипролины (Arg-Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Arg, Leu-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu) проявляют защитный антидиабетогенный эффект, одновременно стабилизируя показатели гемостаза при метаболических нарушениях. Показано, что многократное интраназальное введение этих пептидов крысам со стойкой гипергликемией (подобной начальной стадии СД2 человека) приводило к положительным изменениям в инсулярной и свертывающей системах организма. При этом отмечено снижение уровня глюкозы, повышение антикоагулянтного и фибринолитического потенциала плазмы, а также угнетение агрегации тромбоцитов в плазме крови животных [3, 4, 8, 9].

Один из природных антикоагулянтов системы гемостаза – гепарин является компонентом внутренней среды организма, который синтезируется тучными клетками печени, базофильными лейкоцитами и другими клетками. Он относится к антикоагулянтам быстрого действия, ингибирует тромбин-свертываю-

шую активность, а также проявляет гипогликемическое действие в организме. Гепарин способен образовывать комплексы с аминокислотами и пептидами за счет наличия в его молекуле структурных областей связывания с этими лигандами [10, 11]. Экспериментально показано, что введение животным гепариновых комплексов с глипролинами приводило к повышению антикоагулянтной, фибринолитической и антитромботической активности крови [12, 13].

Было установлено, что интраназальное введение комплекса гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro животным с гипергликемией повышает антикоагулянтные свойства плазмы крови, фибринолитическую активность ферментативной и неферментативной природы, снижает агрегацию тромбоцитов и защищает крыс от развития сахарного диабета [13].

В настоящем исследовании изучались гипогликемические, антикоагулянтные и фибринолитические эффекты созданного нами комплекса пептида Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) с нефракционированным гепарином при его многократном интраназальном введении животным со стойкой гипергликемией, подобной СД2 у человека.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Получить комплекс пептида Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) и нефракционированного гепарина, изучить его влияние на уровень глюкозы и антикоагулянтно-фибринолитические свойства и показать его способность восстанавливать нарушенные функции инсулярной и свертывающей систем крови при экспериментальной гипергликемии у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение комплекса PGPL-гепарин

В данном исследовании мы использовали нефракционированный гепарин фирмы Serva (Германия). Пептид PGPL был синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН (Москва, Россия). Комплексное соединение этого пептида с гепарином при соотношении компонентов 1:1 (моль/моль) было создано по ранее описанному протоколу с некоторой нашей модификацией [12].

Гепарин и пептид PGPL растворяли в дистиллированной воде, перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, pH 7.2. Продукт реакции осаждали 1%-ой уксусной кислотой, pH 5.0–5.2 и центрифугировали в течение 30 мин при 3000xg, осадок растворяли в 0.85%-м NaCl (физиологическом растворе), pH 7.2–7.4.

Образование связи между гепарином и пептидом оценивали с помощью перекрестного электрофореза при 20°C в 0,053 М фосфатном буфере, pH 7.0 при градиенте потенциала 7.3 в/см в течение 2 ч. Далее электрофореграммы окрашивали 0,033%-ым раствором Азура II, который выявляет кислые группы гепарина [12].

Животные, дизайн исследования и введение препаратов

50 крыс-самцов линии Wistar (возраст 10 мес., масса

тела 320–350 г) были получены из Научного центра биомедицинских технологий, филиал «Столовая» (Москва, Россия). Животные содержались в пластиковых клетках в стандартных условиях вивария при температуре окружающей среды (21–24°C), 12-часовом цикле день/ночь и относительной влажности воздуха 60±10% при свободном доступе к пище и воде в период эксперимента. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с соблюдением этических принципов по использованию лабораторных животных и были одобрены локальным этическим комитетом (Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия).

После адаптации в течение 10 дней все животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой (рис. 1).

Группа 1 – крысы с гипергликемией, получавшие 0,85%-й физиологический раствор.

Группа 2 – крысы с гипергликемией, получавшие комплекс PGPL-гепарин (1 мг/кг массы тела).

Группа 3 – крысы с гипергликемией, получавшие PGPL (20 мкг/кг массы тела).

Группа 4 – крысы с гипергликемией, получавшие гепарин (0,98 мг/кг массы тела).

Группа 5 состояла из здоровых животных.

Растворенные в 0,85%-м растворе натрия хлорида препараты (комплексное соединение PGPL-гепарин, пептид PGPL и гепарин) готовили ежедневно перед введением животным. Доза комплекса PGPL-гепарин была выбрана на основании предыдущих исследований [13]. Дозы компонентов комплекса, т. е. пептида PGPL и гепарина, были эквивалентны их содержанию в комплексном соединении.

Экспериментальную стойкую гипергликемию (ГГ) у крыс групп 1–4 индуцировали ежедневным однократным внутрижелудочным введением 40%-го раствора глюкозы в дозе 2,5 мл/кг массы тела в течение 7 дней, после чего крысы этих групп продолжали получать раствор глюкозы в течение всего эксперимента. После развития ГГ крысам 2–4 групп интраназально вводили исследуемые препараты в объеме 25 мкл один раз в сутки в течение 5 дней. Крысы 1-й и 5-й групп в те же сроки получали интраназально 0.85%-й NaCl в качестве плацебо.

На 22-й день эксперимента, через 1 ч после последнего введения препаратов, у каждого животного отбирали кровь для биохимических анализов. В конце эксперимента (28-е сутки) повторный забор крови проводили через 1 ч после последнего введения глюкозы на фоне отмены приема препаратов.

Проведение биохимических анализов

Кровь для анализа брали из яремной вены (*vena jugularis*), используя в качестве консерванта 3.8%-й цитрат натрия в соотношении кровь:консервант как 9:1. В цельной крови определяли концентрацию глюкозы с помощью анализатора Accutrend GC (Roche, Германия) с использованием специальных тест-полосок.

Ежедневное пероральное введение 40% раствора глюкозы (группы 1–4)												
1 день		11 день			18 день			22 день			28 день	
Адаптация к условиям вивария					Интраназальное введение: Группа 1 – 0,85% физ.р-р Группа 2 – Комплекс Группа 3 – PGPL Группа 4 – Гепарин Группа 5 – 0,85% физ. р-р							
								1-е взятие крови			2-е взятие крови	

Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента

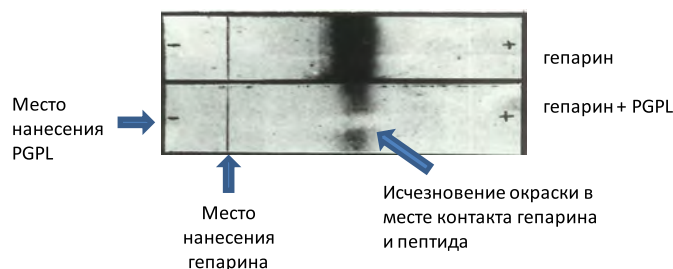


Рисунок 2 – Электрофореграммы передвижения в электрическом поле отдельно гепарина и гепарина, взаимодействующего с пептидом.

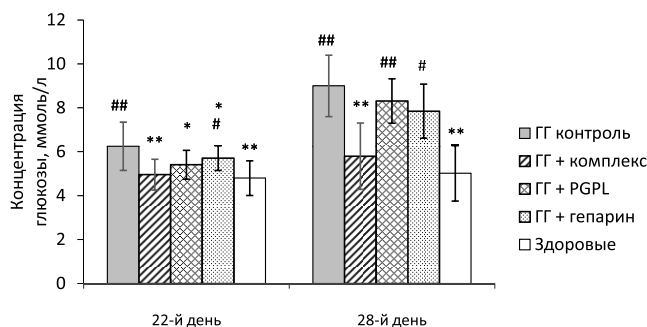


Рисунок 3 – Уровень глюкозы крови (ммоль/л) на 22-й день (через 1 ч после 5-го введения препаратов) и на 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены введения препаратов).

Примечание: * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ – по сравнению с ГГ контролем (группа 1), # $P < 0.05$ и ## $P < 0.01$ – по сравнению со здоровыми животными (группа 5).

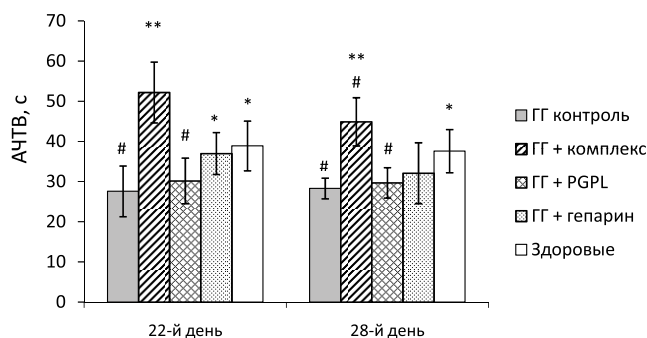


Рисунок 4 – Антикоагулянтная активность плазмы крови (по тесту АЧТВ) на 22-й день (через 1 ч после 5-го введения препаратов) и на 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены введения препаратов).

Примечание: * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ – по сравнению с ГГ контролем (группа 1), # $P < 0.05$ и ## $P < 0.01$ – по сравнению со здоровыми животными (группа 5).

Далее кровь центрифугировали при 2000×g в течение 15 мин при комнатной температуре для получения бедной тромбоцитами плазмы, в которой оценивали антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на анализаторе свертывания крови «АСК 2-01» (Россия); показатели фибринолиза по тестам суммарной (СФА), неферментативной (НФ) фибринолитической активности на нестабилизированном фибрине, ферментативной фибринолитической активности (ФФ) и активности тканевого активатора пламиногена (ААП) в эуглобулиновой фракции плазмы на стабилизированном фибрине [14].

Все данные обработаны статистически и выражены в виде среднего ± SD (стандартное отклонение). Нормальность распределения выявляли по критерию Шапиро-Уилка, групповые различия анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считались значения $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение комплексного соединения

PGPL-гепарин

Установлено образование комплексного соединения пептида PGPL с гепарином в чистой системе. Это соединение было получено с оптимальным молярным соотношением компонентов 1:1. Использование перекрестного электрофореза показало взаимодействие и возникновение химической связи между аминокетонами пептида PGPL и кислотными группами гепарина. Как видно на рис. 2, при перпендикулярном нанесении на носитель растворов гепарина и пептида PGPL и их последующей миграции в электрическом поле, наблюдалось исчезновение окраски на кислые карбоксильные и сульфатные группы гепарина (краситель Азур II) в месте встречи веществ.

Далее изучали гипогликемическое действие и влияние на систему гемостаза комплексного соединения PGPL-гепарин и его компонентов – пептида PGPL и гепарина в эквивалентных дозах в условиях стойкой ГГ у крыс.

Влияние комплексного соединения

PGPL-гепарина на уровень глюкозы крови

После индукции гипергликемии на 18-ые сутки эксперимента уровень глюкозы в крови крыс с ГГ (группа 1) был достоверно выше, чем у здорового контроля (группа 5) (6.25 ± 0.35 ммоль/л против 4.8 ± 0.25 ммоль/л соответственно; $P < 0.01$), что составило 130%. Введение комплексного соединения

PGPL-гепарин крысам снижало этот показатель на 21% (4.96 ± 0.23 ммоль/л; $P < 0.01$). Введение составных частей комплекса (PGPL или гепарина) оказывало более слабый гипогликемический эффект, что приводило к меньшему снижению уровня глюкозы в крови на 13 и 9% соответственно (до 5.41 ± 0.21 ммоль/л с PGPL и 5.71 ± 0.56 ммоль/л с гепарином; $P < 0.05$). На 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены лечения) уровень глюкозы в крови крыс группы 1 продолжал повышаться и составил 179% относительно здоровых животных (группа 5) (9.0 ± 0.42 ммоль/л против 5.02 ± 0.32 ммоль/л; $P < 0,01$). В то же время уровень глюкозы в крови крыс группы 2, получавших комплекс, составил 5.8 ± 0.72 ммоль/л ($P < 0.01$), тогда как введение и PGPL, так и гепарина не изменяли этот показатель ($P > 0.05$) (рис. 3).

Влияние комплексного соединения

PGPL-гепарин на антикоагулянтную активность плазмы крови по тесту АЧТВ

Как видно на рис. 4, на 18-й день эксперимента у крыс с ГГ (группа 1) антикоагулянтная активность плазмы крови составила 27.6 ± 6.32 с, т.е. была снижена на 29% по сравнению со здоровыми нормальными крысами ($P < 0.01$). Этот вывод подтверждает, что через 12 дней после индукции ГГ прокоагулянтная активность крови повышается в организме ГГ животных. У ГГ крыс антикоагулянтная активность после терапии комплексом и гепарином достоверно увеличивалась на 89 и 34%, соответственно (52.2 ± 7.58 с – группа 2; $P < 0.01$ и 37.0 ± 5.22 с – группа 4; $P < 0.05$), тогда как введение PGPL не изменяло антикоагулянтную активность плазмы крови крыс ($P > 0.05$).

На 28-й день эксперимента, т.е. через 6 дней после отмены введения препаратов антикоагулянтная активность крови достоверно отличалась от ГГ контроля (28.3 ± 3.52 с) только в группе 2 после применения комплекса PGPL-гепарин (44.9 ± 5.01 с; $P < 0.01$) на 58% (рис. 4). Введение составных частей комплекса (PGPL и гепарина) не приводило к достоверному изменению данного параметра ($P > 0.05$).

Влияние комплексного соединения

PGPL-гепарин на фибринолитическую активность (СФА, НФ, ФФ и ААП) плазмы крови

Показано, что у крыс с ГГ (группа 1) угнеталась фибринолитическая активность плазмы крови по сравнению со здоровыми животными группы 5 (табл. 1). Так, показатели СФА, НФ и ФФ у ГГ животных были снижены на 19, 28 и 32%, соответственно, по сравнению с таковыми у здоровых крыс ($P < 0.05$). Также у крыс группы 1 ААП была меньше на 36% по сравнению с крысами группы 5 ($P < 0.01$).

Таблица 1 – Фибринолитическая активность (мм²) плазмы крови животных на 22-й день (через 1 ч после 5-го введения препаратов) и на 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены введения препаратов)

Группы животных	СФА	НФ	ФФ	ААП
Через 1 ч после 5-го введения препаратов (22-й день)				
ГГ контроль (группа 1)	27.5 ± 5.05 ^{##}	16.7 ± 3.09 [#]	52.7 ± 11.3 [#]	17.8 ± 6.51 ^{##}
ГГ + комплекс (группа 2)	52.0 ± 10.1 ^{**##}	35.8 ± 6.29 ^{**#}	89.3 ± 8.54 ^{**#}	49.4 ± 10.1 ^{**##}
ГГ + PGPL (группа 3)	33.4 ± 6.24 [*]	21.8 ± 3.99	71.5 ± 5.25 [*]	24.1 ± 4.43 [*]
ГГ + гепарин (группа 4)	31.8 ± 4.78	19.4 ± 4.6	68.7 ± 7.48 [*]	27.3 ± 6.15 ^{**}
Здоровые (группа 5)	34.0 ± 5.98 ^{**}	23.1 ± 2.56 [*]	77.5 ± 12.4 [*]	28.0 ± 7.2 ^{**}
Через 6 дней после отмены введения (28-й день)				
ГГ контроль (группа 1)	28.7 ± 2.83 ^{##}	17.3 ± 3.4 ^{##}	37.1 ± 8.36 ^{##}	9.4 ± 3.61 [#]
ГГ + комплекс (группа 2)	38.7 ± 5.22 ^{**}	25.8 ± 2.86 ^{**}	60.6 ± 4.9 ^{**}	22.6 ± 4.38 ^{**}
ГГ + PGPL (группа 3)	32.2 ± 4.44	20.7 ± 3.74	45.2 ± 5.31 ^{*#}	15.7 ± 2.41 [*]
ГГ + гепарин (группа 4)	30.7 ± 6.27 [#]	22.8 ± 4.18	42.1 ± 6.06 ^{##}	12.5 ± 4.6
Здоровые (группа 5)	39.6 ± 4.33 ^{**}	25.0 ± 3.97 ^{**}	65.8 ± 5.05 ^{**}	19.0 ± 5.33 [*]

Примечание: * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ – по сравнению с группой 1 (ГГ контроль), # $P < 0.05$ и ## $P < 0.01$ – по сравнению с группой 5 (здоровые крысы). Данные представлены как $M \pm SD$. СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ – неферментативная фибринолитическая активность, ФФ – ферментативная фибринолитическая активность, ААП – активность тканевого активатора плазминогена.

После интраназального введения комплекса PGPL-гепарин, пептида PGPL и гепарина фибринолитическая активность плазмы крови крыс со стойкой ГГ приводило к повышению фибринолиза всех типов (СФА, НФ, ФФ, ААП), но в разной степени. Так, у крыс группы 2, получавших комплекс, на 22-й день эксперимента эти показатели увеличились на 89, 115, 69 и 177% ($P < 0.01$), соответственно, по сравнению с ГГ контролем (группа 1). При этом параметры фибринолиза превышали значения у здоровых животных (группа 5). В то же время применение пептида приводило к достоверному возрастанию СФА на 21% ($P < 0.05$), ФФ – на 36% ($P < 0.05$) и ААП – на 35% ($P < 0.05$) в плазме крови крыс группы 3, но не изменяло НФ по сравнению с ГГ контролем ($P > 0.05$). Введение гепарина вызывало достоверное увеличение только ФФ – на 30% ($P < 0.05$) и ААП – на 53% ($P < 0.01$) у крыс группы 4 по сравнению с ГГ контролем.

На 28-й день эксперимента у крыс с ГГ (группа 1), сохранялся пониженный фон фибринолиза: СФА, НФ, ФФ ($P < 0.01$ во всех случаях) и ААП ($P < 0.05$) были достоверно ниже (на 27, 30, 44 и 51% соответственно), чем у здоровых животных (группа 5). В то же время в группе 2 даже после прекращения применения комплекса отмечалось статистически значимое повышение фибринолитической активности: СФА – на 35%, НФ – на 49%, ФФ – на 63% и ААП – на 140% по сравнению с ГГ контролем ($P < 0.01$). Эти показатели соответствовали значениям здорового контроля. Кроме того, в группе 3 (PGPL) наблюдалось достоверное повышение только ФФ (на 22%, $P < 0.05$) и ААП (на 67%, $P < 0.05$). В этих условиях в группе 4 после прекращения введения гепарина достоверных отличий показателей фибринолитической активности по сравнению с ГГ контролем не выявлено ($P > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что прогрессирование сахарного диабета сопровождается подавлением ингибирования инсулярной [15] и противосвертывающей систем. Депрессия ПСС характеризуется усиленной агрегацией тромбоцитов, сниженной антикоагулянтной и фибринолитической активностью плазменного гемостаза, что приводит к повышению тромбогенного потенциала крови, а также часто вызывает образование тромбов [8].

По данным литературы у ГГ крыс подавление функции ПСС сопровождается повышением свертываемости крови, снижением фибринолиза и значительным возрастанием уровня глюкозы крови [3, 4, 13]. Подобный эффект наблюдался и в нашей модели экспериментальной гипергликемии.

В данном исследовании оценивалось влияние комплексного соединения PGPL-гепарин и его компонентов – гепарина и пептида PGPL на гемостатическую и инсулярную системы ГГ крыс. Показано, что в ситуации, когда развивалась стойкая гипергликемия, комплекс PGPL-гепарин оказывал защитное действие на функциональное состояние и инсулярной, и гемостатической систем организма, что нами выявлено впервые.

Как пептид PGPL, так и гепарин в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе, стимулировали антикоагулянтно-фибринолитический фон крови и снижали уровень глюкозы. Установлено, что противосвертывающие эффекты комплекса превышали действие его составных частей: в плазме крови повышались СФА (в результате активации НФ и тканевого активатора плазминогена) и антикоагулянтная активность крови. Кроме того, действие комплекса PGPL-гепарин было пролонгированным, поскольку сохранялось и через 6 дней после окончания его применения.

Ранее действие пептидов PG, PGP и RGP, гепарина и их комплексных соединений оценивали у здоровых и гипергликемических крыс. У крыс, интраназально получавших гепарин, повышалась только антикоагулянтная активность, а при введении пептидов – усиливались и антикоагулянтные, и фибринолитические свойства крови [12, 13, 16]. Многократное интраназальное введение пептида PGPL в большей дозе (1 мг/кг), чем в настоящей работе, крысам со стойкой ГГ защищало организм от развития гиперкоагуляции. При этом наблюдалось увеличение суммарного и неферментативного фибринолиза крови животных. Положительные изменения в инсулярной и противосвертывающей системах наблюдались в течение 5 дней после окончания применения пептида [9].

Рассматривая механизм действия комплекса на нормализацию уровня глюкозы крови, можно предположить, что PGPL-гепарин оказывал данный эффект и предотвращал развитие СД2 вследствие наличия в его структуре аминокислоты лейцин, которая стимулирует выработку инсулина, обеспечивая нормогликемическое действие [6].

Механизм антикоагулянтного действия гепарина обусловлен блокадой активности тромбина и других коагулянтных белков [17]. В то же время гепарин усиливал активность тканевого активатора плазминогена, что и приводило к усилению ферментативного фибринолиза [10].

Некоторые пептиды являются эффективными ингибиторами тромбина, которые обладают антикоагулянтными свойствами, могут активировать ферментативный фибринолиз и предотвращать образование тромбов в кровотоке. Было установлено, что пролин и глицинсодержащие пептиды PG и PGP могут индуцировать растворение нестабилизированного фибрина [16]. Наличие рецепторов глипролина на эндотелии пока не установлено, но сообщалось о существовании специфических сайтов связывания

PGPL на цитоплазматической мембране базальных ядер головного мозга крыс [18]. Возможно, этот пептид, вводимый интраназальным путем, проходит через гематоэнцефалический барьер, проникая в структуры головного мозга и оказывая свое действие через специфические рецепторы. По данным литературы [19, 20], как и по результатам настоящего исследования, отдельные пептиды способны оказывать гипогликемический эффект и препятствовать прогрессированию СД2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный нами комплекс PGPL-гепарин усиливал гипогликемическое и антикоагулянтное действие входящих в его состав компонентов – гепарина и пептида благодаря своим структурным особенностям. Он предотвращал образование фибрина за счет наличия у него фибриндеполимеризационной активности, проявлял антикоагулянтную активность, обусловленную его ингибирующим действием на активность тромбина. Появление как PGPL, так и комплекса в кровотоке стимулирует высвобождение тканевого активатора плазминогена из сосудистого эндотелия, что приводит к повышению ферментативных фибринолитических свойств крови, причем действие комплекса оказывается более эффективным. Также показано, что комплекс в значительной степени улучшает функционирование инсулярной системы у гипергликемических крыс, а его составная часть – гепарин модулирует функцию антикоагулянтной системы, участвуя в предотвращении процесса гиперкоагуляции, сопровождающей развитие СД2.

В перспективе полученные нами результаты на модели крыс со стойкой гипергликемией могут быть применимы в клинической практике для пациентов с сахарным диабетом 2 типа, которые предрасположены к развитию тромботических осложнений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Это исследование не получило какого-либо конкретного гранта от финансирующих учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Blair M. Diabetes mellitus review // Urol. Nurs. 2016. Vol. 36. P. 27–36.
2. Ahrén B., Schweizer A., Dejager S., Dunning B.E., Nilsson P.M., Persson M., Foley J.E. Vildagliptin enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009. Vol. 94. P. 1236–1243.
3. Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Ульянов А.М., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е., Григорьева М.Е. Изучение сочетанного антидиабетогенного и противосвертывающего действия трипептида Gly-Pro-Arg на модели развития стойкой гипергликемии у крыс // Докл. Акад. Наук 2011. Т. 438. №2. С. 275–278.
4. Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. Антикоагулянтно-фибринолитическая и гипогликемическая

- активность тетрапептида ARG-PRO-GLY-PRO // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2012. Т. 153. №. 3. С. 304–307.
5. Mulukutla S.N., Hsu J.W., Gaba R., Bohren K.M., Guthikonda A., Iyer D., Ajami N.J., Petrosino J.F., Hampe C.S., Ram N., Jahoor F., Balasubramanyam A. Arginin metabolism is altered in adults with α - β + ketosis-prone diabetes // *J. Nutr.* 2018. Vol.148. № 2. P. 185–193. doi: 10.1093/jn/nxx032.
 6. Brunetta S.H., de Camargo C.Q., Nunes E.A. Does L-leucine supplementation cause any effect on glucose homeostasis in rodent models of glucose intolerance? A systematic review // *Amino Acids* 2018. Vol. 15. P. 1663–1678. Doi: 10.1007/s00726-018-2658-8.
 7. Golla K.I., Stavropoulos D., Shields D.S., Moran N.R. Peptides derived from cadherin juxta membrane region inhibit platelet function // *Soc. Open Sci.* 2018. Vol. 5. Doi:10.1098/rsos.172347.
 8. Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. Коррекция нарушений противосвертывающей и инсулярной систем организма пептидом Leu-Pro-Gly-Pro // *Изв. РАН Сер. биол.* 2013. № 3. С. 341–344.
 9. Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Пасторова В.Е. Участие пептида Pro-Gly-Pro-Leu в восстановлении функций противосвертывающей и инсулярной систем организма при развитии стойкой гипергликемии у крыс // *Вопр. биол. и фармац. хим.* 2013. №4. С. 38–42.
 10. Aster R.H. Heparin-induced immune thrombocytopenia – a clinical or laboratory diagnosis? // *J. Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 4. P. 757–758.
 11. Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. Регуляторная роль соединений гепарина с низкомолекулярными лигандами крови в плазменном и тромбоцитарном гемостазе // *Изв. РАН Сер. Биол.* 2011. № 2. С. 208–219.
 12. Смолина Т.Ю., Пасторова В.Е., Ляпина Л.А. Комплексобразование дипептида пролил-глицин с гепарином: исследование гемостатических свойств комплекса in vitro при внутривенном введении // *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2002. № 2. С. 38–41.
 13. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Пасторова В.Е. Комплекс гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro и его антикоагулянтно-фибринолитические и гипогликемические эффекты // *Изв. РАН Сер. биол.* 2012. № 1. С. 72–77.
 14. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: ООО «Авансед солишн». 2012. 159 стр.
 15. Dedov I.I., Shestakova M.V., Shestakova O.Y. Innovation in the treatment of type 2 diabetes mellitus: use of incretins // *Ter. Arkh.* 2010. Vol. 82. P. 5–10.
 16. Lyapina L.A., Pastorova V.E., G.E. Samonina G.E., Ashmarin I.P. The effect of prolyl-glycyl-proline (PGP) peptide and PGP-rich substances on haemostatic parameters of rat blood // *Blood Coagul. and Fibrinol.* 2000. Vol. 11 P. 409–414.
 17. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2007. Vol. 13 P. 146–153.
 18. Myasoedov N.F., Rochev D.L., Lyapina L.A., Obergan T.Y., Andreeva L.A. Leucine-containing glyprolines (Pro-Gly-Pro-Leu and Leu-Pro-Gly-Pro): participation in hemostatic reactions in vitro and in vivo in rats with blood coagulation and lipid metabolism disorders // *Dokl. Biol. Sci.* 2013. Vol. 453. P. 345–348.
 19. Valencia-Mejia E., Batista K.A., Fernandes J.J.A., Fernandes K.F. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*) // *Food Res. Int.* 2019. Vol. 121. P. 238–246. Doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.043.
 20. Kvapil M. Strategy and tactics of treatment of type 2 diabetes mellitus // *Vnitř. Lek.* 2019. Vol. 65. № 4. P. 273–278.

АВТОРЫ

Оберган Тамара Юрьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0002-3760-3943. E-mail: tobergan@mail.ru.

Мясоедов Николай Федорович – доктор химических наук, академик РАН, руководитель отдела Института молекулярной генетики РАН. ORCID 0000-0001-5927-3810. E-mail:nfm@img.ras.ru

Григорьева Марина Евгеньевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0003-0469-3943. E-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Ляпина Людмила Анисимовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0002-8983-652X. E-mail: lyapinal@mail.ru

Шубина Татьяна Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0003-1092-8382. E-mail: shubina@mail.ru .

Андреева Людмила Александровна – заведующий сектором Института молекулярной генетики РАН. ORCID 0000-0003-3291-8994, 0000-0003-4718-5033. E-mail: landr@img.ras.ru