

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ КОРНЕЙ ПИОНА НА СОСТОЯНИЕ ИНСУЛЯРНОЙ И ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗВИТИИ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА.

УЛЬЯНОВ А.М., ТАРАСОВ Ю.А., ЛЯПИНА Л.А., ПАСТОРОВА В.Е., УСПЕНСКАЯ М.С.

Лаборатория защитных систем крови им. Б.А.Кудряшова, Биологический факультет МГУ, Москва, Россия, 119899.

Пероральное введение препарата из корней пиона обеспечивает стойкий профилактический эффект в отношении развития экспериментального аллоксанового диабета. Этот препарат, как и его комплексное соединение с аспирином способствует сохранению нормального статуса гемостатической системы и смягчает нарушения со стороны инсулярной системы организма, повышая тем самым выживаемость животных.

Ключевые слова: диабет, пион, гепарин, инсулин, гемостаз.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что при развитии инсулинзависимого сахарного диабета у крыс, после введения им аллоксана, наблюдается резкое подавление функции инсулярной системы, что выражается в высокой степени гипергликемии, гипoinsулинемии, повышении резистентности к инсулину, снижении толерантности к глюкозе. При этом также развивается глубокая депрессия антикоагулянтного звена гемостаза [1]. Одновременно нами [2], а также другими авторами [3,4] было показано участие гепарина в гомеостатических реакциях организма, направленных на поддержание нормального уровня сахара в крови. В дальнейшем было установлено, что гепарин, являясь практически единственным из известных антикоагулянтов прямого действия животного происхождения [5], при пероральном введении оказывает выраженное антидиабетогенное действие [6]. Однако имеются данные о гепаринрезистентности [7], а также об отрицательном эффекте проявления тромбоэмболических осложнений после отмены гепарина [5]. В этой связи представлял интерес поиск антикоагулянтов прямого действия из других источников, в частности, из растительных, что приводит к обнаружению в водных экстрактах из корней древовидного пиона *Paeonia suffruticosa Andrews* высокой антикоагулянтной активности, проявляющейся после его перорального введения животным [8]. Было установлено, что этот антикоагулянтный препарат, являясь гликопептидом, содержит в своей структуре элементы структуры гепарина [9].

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния перорального введения препарата из корней пиона на состояние инсулярной системы и гемостаза у животных при развитии экспериментального сахарного диабета.

МЕТОДИКА. Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах массой тела 180-220 г. Кровь для анализа отбирали из яремной вены шприцем, содержащим в качестве консервантов: 3,8%-ный раствор цитрата натрия либо 1%-ный раствор ЭДТА (для определения инсулина), при соотношении кровь:консервант - 9:1. Кровь

центрифугировали 10 минут при 1800 об/мин, и плазму использовали для определения исследуемых показателей.

Развитие экспериментального диабета осуществлялось у животных, содержащихся на специальной диете [10] и голодавших в течение 18-24 часов перед внутривенным введением аллоксана фирмы "Спофа" (Чехословакия) в дозе 37,5 мг/кг. Препарат из пиона, выращенного в Ботаническом саду МГУ, получали экстрагированием в течение 15 минут из 2 г сухого материала корней в 100 мл физиологического раствора при 100° С. Исследуемый кроме этого комплексный препарат антикоагулянта из корней пиона с аспирином содержал 1 мг аспирина на каждые 6 мл препарата из пиона. Все изучаемые препараты и контрольный 0,85%-ный раствор NaCl вводили перорально в объеме 2 мл с помощью зонда за 5 минут до введения аллоксана и затем два раза в сутки в течение первых 7 дней опыта. В плазме крови определяли суммарную и неферментативную фибринолитическую активность по методу Кудряшова и др. [11], активатор плазминогена по методу [12], активность фактора XIII - по методу [13], концентрацию фибриногена - по методу Bidwell в модификации [14], активность антитромбина III - по методу [15]. Состояние инсулярной системы крыс контролировали по уровню сахара в крови [16] и по содержанию иммунореактивного инсулина - с помощью наборов рино-ИНС-ПС-125-I (Беларусь). О степени тяжести развившегося диабета судили по степени гипергликемии, полиурии, полидипсии, а также по общему состоянию крыс.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась по методу Фишера-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. У животных контрольной группы, получавшей 0,85%-ный NaCl, наблюдалось развитие сахарного диабета. Так, концентрация сахара в их крови ко 2-4-й неделям после введения аллоксана соответственно в 3,1 и 2,4 раза превышала его исходный уровень. Одновременно в плазме крови в 5-10 раз снижалась концентрация иммунореактивного инсулина (табл. 1).

Таблица 1. Влияние препарата из корней пиона (Препарат 1) и его комплекса с аспирином (Препарат 2) на концентрацию сахара (мг%) и инсулина (мкМЕ/мл) в плазме крови при пероральном введении.

Исследуемый показатель	Время после введения аллоксана (недели)	Контроль	Препарат 1	Препарат 2
Сахар крови	исходный показатель	89,6 ± 4,5	88,9 ± 1,9	89,5 ± 3,3
	1 неделя	171,6 ± 11,5***	104,5 ± 15,4	156,2 ± 25,5*
	2 неделя	276,0 ± 37,3***	129,9 ± 21,6 ^б	148,7 ± 17,9*** ^а
	4 неделя	213,0 ± 20,5***	114,8 ± 13,3 ^б	191,7 ± 26,2***
Инсулин	исходный показатель	4,9 ± 1,0	5,9 ± 1,7	4,9 ± 0,7
	1 неделя	0,4 ± 0,1***	1,9 ± 0,3* ^б	3,1 ± 1,0 ^а
	2 неделя	1,0 ± 0,2***	2,9 ± 0,7 ^а	1,4 ± 0,4***
	4 неделя	0,5 ± 0,1***	3,1 ± 0,3 ^б	0,4 ± 0,4***

Примечания. Представлены средние значения 2-14 опытов. Здесь и в остальных таблицах звездочками указана значимость различий с исходным показателем: * p 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Буквами указана значимость различий исследуемых параметров с соответствующей контрольной группой: ^а - p < 0,05, ^б - p < 0,01, ^в - p < 0,001.

Пероральное введение в указанных выше условиях таким животным препарата из корней пиона обеспечивает эффективную защиту организма от развития аллоксанового диабета. Концентрация сахара на протяжении 4-х недель наблюдения достоверно не

отличается от исходной и на 2-й и 4-й неделях этот показатель соответственно в 2,1 и в 1,86 раза ниже, чем у контрольных крыс. При этом концентрация инсулина в их крови в 3-6 раз выше, чем у контрольных животных с развивающимся диабетом, а через 2-4 недели после начала опыта этот показатель достоверно не отличается от исходного уровня.

В данной работе было также исследовано влияние на развитие экспериментального диабета комплексного препарата экстракта из корней пиона и аспирина. Ранее нами было показано, что в сходных условиях комплекс гепарин-аспирин при хроническом пероральном введении крысам с развившимся диабетом, обеспечивает стойкое гипогликемическое действие, превышающее соответствующий эффект одного гепарина [17]. Именно в этой связи было интересно проверить эффективность антидиабетогенного действия препарата из корней пиона, содержащего гепариноподобный компонент, в комплексе с аспирином. Однако, через 1-2 недели после введения аллоксана гипогликемический эффект этого комплексного препарата был выражен слабее, чем у препарата только из корней пиона в эквивалентной концентрации, а к 4-й неделе опыта как концентрация сахара, так и инсулина в плазме крови уже достоверно не отличалась от таковых у контрольных крыс с развивающимся диабетом, получавших физиологический раствор (табл. 1).

Как было показано ранее [17], при диабете наблюдается депрессия функциональной активности противосвертывающей системы. Действительно, как видно из наших данных, развитие гипергликемии и гипоинсулинемии сопровождается достоверным снижением суммарной фибринолитической активности (СФА) и неферментативного фибринолиза (НФ) (табл. 2). При этом резко нарастает концентрация фибриногена в плазме крови, особенно ко 2-й неделе эксперимента, когда его концентрация в 3,1 раза превышает исходную. Однако, со стороны ферментативного фибринолиза (ФФ), активатора плазминогена (АП) и антитромбина III достоверных сдвигов в сторону гиперкоагуляции не наблюдается.

Пероральное введение животным препарата из корней пиона обеспечивает сохранение нормального физиологического статуса системы гемостаза. В частности, СФА и НФ к 1-й неделе эксперимента по абсолютной величине даже превосходят исходные значения, соответственно в 2 и в 1,5 раза превышая соответствующие показатели контрольной группы крыс, получавших 0,85%-ный раствор NaCl. Через 2 и 4 недели показатели СФА и НФ не отличаются от исходных значений (табл. 2). Наблюдается также повышение уровня активности ФФ, который в течение всего срока эксперимента достоверно в 1,5-2,3 раза превышает его уровень у контрольных крыс. Уровень АП также выше в 2,5-3,5 раза, чем в контрольной группе, а антитромбин III остается неизменным (табл. 3). Концентрация фибриногена снижается в 2 раза и практически не отличается от исходной, активность же фактора XIII не изменяется в течение всего эксперимента и не отличается от таковой у контрольных крыс (табл. 4).

В случае применения препарата антикоагулянта из корней пиона в сочетании с аспирином также наблюдается положительная динамика со стороны показателей системы гемостаза, аналогичная той, которая отмечается при применении препарата только из корней пиона.

Полученные данные могут служить косвенным подтверждением наличия функционально активного гепариноподобного компонента в составе исследуемого препарата из корней пиона *Paeonia suffruticosa Andrews*, способного оказывать длительный и весьма значительный положительный эффект на депрессированные при развитии экспериментального диабета инсулярную и гемостатическую системы. Об этом свидетельствует, прежде всего, выраженный гипогликемический эффект и гиперинсулинемическое действие исследуемого препарата. Последнее может найти свое

объяснение, в частности, в том факте, что гепаринотерапия оказывает положительное влияние на образование биологически активных форм инсулина [4]. Вероятно, что

Таблица 2. Влияние перорального введения препарата из корней пиона (Препарат 1) и его комплекса с аспирином (Препарат 2) на суммарную фибринолитическую активность (СФА) (мм²) и неферментативный фибринолиз (НФ) плазмы крови.

Исследуемый показатель	Время после введения аллоксана (недели)	Контроль	Препарат 1	Препарат 2
СФА	исходный показатель	31,1 ± 1,4	33,9 ± 0,9	34,8 ± 1,8
	1 неделя	23,2 ± 2,7*	44,9 ± 5,1* ^б	36,5 ± 6,6
	2 неделя	18,7 ± 1,4***	33,9 ± 1,7 ^а	32,8 ± 2,3 ^а
	4 неделя	22,5 ± 2,9*	35,2 ± 3,2 ^б	37,0 ± 2,3 ^б
НФ	1 неделя	14,6 ± 1,7*	25,4 ± 2,8 ^б	24,1 ± 4,8
	2 неделя	16,0 ± 2,1	21,5 ± 1,6	21,0 ± 2,4
	4 неделя	14,0 ± 2,3*	21,9 ± 1,5 ^б	24,4 ± 2,2 ^а

Пояснения приведены в примечании к таблице 1.

Таблица 3. Влияние перорального введения препарата из корней пиона (Препарат 1) и его комплекса с аспирином (Препарат 2) на активатор плазминогена (АП) (мм²) и активность антитромбина III (АТ III) крови (%).

Исследуемый показатель	Время после введения аллоксана (недели)	Контроль	Препарат 1	Препарат 2
АП	исходный показатель	2,4 ± 0,6	4,7 ± 0,9 ^а	4,8 ± 0,7 ^а
	1 неделя	4,2 ± 1,3	10,4 ± 1,1*** ^а	6,1 ± 1,2
	2 неделя	2,7 ± 1,4	9,5 ± 1,7** ^б	8,2 ± 1,3* ^а
	4 неделя	2,0 ± 0,0	4,9 ± 1,1 ^а	6,9 ± 1,7 ^а
АТ III	исходный показатель	76,7 ± 13,0	98,2 ± 9,5	96,0 ± 6,3
	1 неделя	104,6 ± 14,6	76,6 ± 7,2	86,8 ± 11,8
	2 неделя	143,0 ± 32,5	87,3 ± 12,0	93,3 ± 10,4
	4 неделя	131,8 ± 29,8	88,3 ± 11,6	69,8 ± 12,2

Пояснения приведены в примечании к таблице 1.

Таблица 4. Влияние перорального введения препарата из корней пиона (Препарат 1) и его комплекса с аспирином (Препарат 2) на концентрацию фибриногена (мг%) и активность фактора XIII (Ед/мл) в плазме крови.

Исследуемый показатель	Время после введения аллоксана (недели)	Контроль	Препарат 1	Препарат 2
Фибриноген	исходный показатель	276,3 ± 14,8	270,6 ± 16,7	290,8 ± 22,2
	1 неделя	349,0 ± 45,0	308,5 ± 7,4	412,0 ± 50,0*
	2 неделя	846,0 ± 143,8**	473,6 ± 83,3*	527,0 ± 69,9**
	4 неделя	640,0 ± 213,9	324,0 ± 51,7	418,0 ± 35,4*
Фактор XIII	исходный показатель	121,4 ± 1,9	115,8 ± 2,2	118,3 ± 2,5
	1 неделя	112,0 ± 2,9*	112,8 ± 2,3	104,1 ± 3,6**
	2 неделя	93,7 ± 13,7	108,2 ± 4,5	119,6 ± 2,5
	4 неделя	111,0 ± 0,0***	107,2 ± 4,6	121,0 ± 1,9

Пояснения приведены в примечании к таблице 1.

гепариноподобная составляющая препарата из корней пиона, поступая в кровоток после перорального введения, обеспечивает также стойкое поддержание естественного антикоагулянтного фона крови. Это делает его особенно ценным, имея ввиду катастрофическую предрасположенность больных диабетом к тромботическим осложнениям [18]. Продемонстрированная в данной работе возможность использования в тех же целях комплексного препарата, полученного на основе аспирина и экстракта из корней пиона, несмотря в целом на более мягкий характер профилактического и терапевтического воздействия, может оказаться необходимой и полезной в определенной клинической ситуации. Важно особо подчеркнуть, что исследуемые препараты значительно повышают выживаемость животных, обеспечивая, в частности, сохранение в кровотоке устойчивой нормогликемии. Пероральное применение исключает более сложную и болезненную процедуру парентерального введения, сопряженного с ударным воздействием препарата на организм. Это обеспечивает более длительное воздействие исследуемых препаратов и открывает перспективу их эффективного применения в терапии сахарного диабета и у людей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ульянов А.М. (1994). Вестн. Моск. ун-та. - Сер. 16, Биология, 4, 32-37
2. Кудряшов Б.А., Шапиро Ф.Б., Ульянов А.М., Пытель Ю.А. (1984) Пробл. эндокринол. №1. 51-56
3. Ефимов А.С. (1989). в кн. "Диабетические ангиопатии" М. "Медицина". 253-256.
4. Альтшулер М.Ю., Юданова Л.С., Никитина А.А., Филатова И.И. (1995) Тезисы докладов II Российского национального конгресса "Человек и лекарство". М. 148.
5. Jaques L.B. (1980).- Pharmacol. Rev. 31, (2) 99-166.
6. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (1996).- Патол. физиол. и Экспер. тер. №1. 21-23
7. Бышевский А.Ш., Зубаиров Д.М., Терсенов О.А. (1993). "Тромбопластин" Новосибирск. Изд-во Новосибирского университета. 102-104.
8. Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Успенская М.С., Новиков В.С. (1995). Вестник Моск. ун. сер. 16, биология. 2. 28-31.
9. Ляпина Л.А., Аммосова Я.М., Новиков В.С., Осипова Н.Р., Пасторова В.Е., Успенская М.С., Смолина Т.Ю., Ляпин Г.Ю. (1995).- Известия РАН, серия биологическая. 2. 249-251.
10. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (1989). Пробл. эндокринол. - 35.(6). 78-81
11. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А., Баскова И.П. (1974). Вест. Моск. ун-та.-сер. Биол. и почвоведение, 5, 41-46
12. Astrup T., Mullertz S. (1952) Arch. Biochem. Biophys, 40, 346-351.
13. Buluk K., Januszko T., Olbromski J. (1961) Nature, 191, 1093-1094.
14. Андреев Г. В. (1962). Проблемы гематологии и переливания крови, 9, 31-34.
15. Abilgaard U., Graven Y., Godal H.C. (1970). Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 24.(12). 224-229.

16. Канторович Л.С. (1963) Бюллетень изобретений. 21.
17. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А., Ляпина Л.А. (1995) Известия РАН.сер.биологическая. 3. 464-467
18. Балаболкин М.И., Морозова Т.П., Чагашвили М.В., Балуда М.В. (1987.) Актуальные проблемы гемостаза в клинической практике".Тезисы докладов Всесоюзной конф.- М. 9-10.

THE PEONY ROOTS PREPERATION INFLUENCE ON THE INSULAR AND
HEMOSTATIC ANIMAL SYSTEMS STATE DURING ALLOXAN DIABETES
DEVELOPMENT.

ULJANOV A.M., TARASOV JU.A., LYAPINA L.A., PASTOROVA V.E.,
USPENSKAYA M.S.

Administration of peony roots preparations provides the stable prophylactic effect against the development of experimental alloxan diabetes. This preparation and its complex with aspirin conserves the normal hemostatic system status and moderates the insular system disturbances. These preparations provide greater survival of animals.

Key words: diabetes, peony, heparin, insulin, hemostatis.