

УДК 616.379-008.64.-0.92:612.115.35:615.357.37

© Коллектив авторов

ИНСУЛЯРНАЯ СИСТЕМА ЖИВОТНЫХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕФИЦИТЕ ГЕПАРИНА.

А.М. УЛЬЯНОВ, Ю.А. ТАРАСОВ

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

Дефицит гепарина в организме животных (крыс), обусловленный длительным ежедневным введением протамин-сульфата, способствует развитию устойчивой депрессии функции инсулярной системы. Это проявляется в стойкой гипергликемии, а также в снижении толерантности к глюкозе и появлении резистентности к инсулину. Введение гепарина способствует восстановлению нормогликемии.

Ключевые слова: гепарин, протамин-сульфат, глюкоза, инсулин

ВВЕДЕНИЕ. Ряд фактов свидетельствует о важной роли гепарина в физиологических реакциях организма, направленных на поддержание гомеостаза глюкозы. Так, введение гепарина защищает от диабетогенного действия аллоксана и снижает гипергликемию на ранних этапах развития экспериментального диабета, способствуя даже восстановлению β -клеток [1,2]. Инсулин в комплексе с гепарином оказывает более сильное гипогликемическое действие [3,4]. Напротив, связывание эндогенного гепарина протамин-сульфатом повышает диабетогенный эффект аллоксана и диабетогенного фактора плазмы крови (ДФФ) [5], а при связывании протамин-сульфатом всего имеющегося в циркуляции эндогенного гепарина у здоровых крыс развивается состояние резистентности по отношению к гипогликемическому действию как эндогенного, так и экзогенного инсулина [6]. У животных с пониженным содержанием гепарина (при аллоксановом диабете, у старых животных, у крыс, длительное время находящихся на атерогенном рационе) гипогликемическое действие инсулина значительно снижено. Эта резистентность к инсулину эффективно устранялась путем введения таким животным гепарина [7].

В связи с вышеизложенным представляет значительный интерес исследование состояния инсулярной системы при длительном поступлении в организм протамин-сульфата с целью развития состояния хронического дефицита гепарина в кровотоке.

МЕТОДИКИ. Работа проведена на беспородных самцах белых крыс массой тела 180-200г. Животных содержали на обычном лабораторном рационе. Введения препаратов и взятия крови (антикоагулянт - 3,8%-ный цитрат натрия) осуществляли через *v. jugularis*. Протамин-сульфат вводили как внутривенно, так и внутримышечно, в течение 3-х недель (2 мг на 200г массы тела в объеме 0,5 мл 0,85%-ного NaCl, 3 раза в сутки). В опытах использовали препараты: протамин-сульфат и инсулин для инъекций отечественного производства, гепарин фирмы «Рихтер» (Венгрия).

Содержание сахара в крови определяли модифицированным методом Хагедорна-Йенсена [8]; концентрацию гепарина в крови определяли по методу Wagen R., Wysocki A. [9]; концентрацию иммунореактивного инсулина (ИРИ) в плазме крови - радиоиммунологическим методом с помощью отечественных наборов рис-ИНС-¹²⁵I. Активность ДГФ в плазме крови тестировали разработанным нами биологическим методом [10].

Полученные результаты обрабатывали статистически по методу Фишера-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Длительное введение протамин-сульфата вызывает достоверное повышение концентрации сахара в крови уже через 2 недели после начала введения (как внутривенного, так и внутримышечного) (табл.1) После отмены введения протамин-сульфата у животных в течение длительного времени сохраняется гликемия, уровень

Таблица 1 Концентрация сахара (в мг/100 мл) в крови животных при длительном (в течение 3-х недель) введении им протамин-сульфата.

Группа животных	Время после начала инъекций протамин-сульфата (недели)				Время после отмены протамин-сульфата (недели)		
	Исх. уровень	1	2	3	2	4	8-10
I. Контроль: P ₀	84,9±10,3 -	85,3±6,7 >0,5	104,0±4,1 >0,1	93,3±3,2 >0,2	89,0±4,5 >0,5	87,2±3,1 >0,5	92,8±1,1 >0,2
II. Опыт I P ₀ P ₁	83,0±6,2 - >0,5	102,6±4,2 <0,05 <0,05	138,8±6,9 <0,001 <0,001	136,5±4,4 <0,001 <0,001	126,3±3,5 <0,001 <0,001	124,4±1,9 <0,001 <0,001	152,0±3,4 <0,001 <0,001
III. Опыт II P ₀ P ₁ P ₂	101,0±6,4 - >0,1 >0,05	94,3±3,4 >0,2 >0,2 >0,05	143,8±9,4 <0,01 <0,01 >0,5	132,0±3,2 <0,001 <0,001 >0,5	126,9±3,0 <0,001 <0,001 >0,5	138,1±6,0 <0,001 <0,001 >0,05	154,7±7,6 <0,001 <0,001 >0,5

Примечания: Показатель достоверности P₀ рассчитан по отношению к исходному уровню, P₁ - по отношению к контрольной группе, P₂ - по отношению к группе II. Протамин вводили внутривенно (опыт I) или внутримышечно (опыт II). Контрольной группе животных вводили внутривенно 0,85% раствор NaCl. В каждой группе было по 5-8 животных

которой даже через 8 недель после окончания введения в 1,54-1,83 раза выше исходного. Концентрация же гепарина в кровотоке уже через 1 неделю после введения протамин-сульфата составляла 6,2±0,5мкг/мл, а через 8 недель после прекращения введения его содержание составляло 39,8±1,9 мкг/мл, что в 1,25 раза меньше, чем концентрация гепарина в группе здоровых крыс (50,2±5,4; P < 0,05). Таким образом, как длительное внутривенное, так и внутримышечное введение крысам протамин-сульфата обеспечивает устойчивый хронический дефицит гепарина в организме. Такие крысы и были использованы нами в

дальнейшем как модель животных с устойчивым дефицитом гепарина и развивающейся на этом фоне гипергликемией. При введении плазмы крови животных, получавших внутримышечно в течение 3-х недель протамин-сульфат здоровым крысам, у последних развивается значительное повышение сахара в крови (табл. 2). Поскольку известно, что подобным диабетогенным действием обладает плазма крови животных и людей с инсулинзависимым сахарным диабетом [11], мы можем предположить, что в данном случае в крови также

Таблица 2. Диабетогенная активность плазмы крови крыс после 3-х недельного внутримышечного введения протамин-сульфата.

Группа животных	Сахар крови (в мг/100 мл) у крыс-реципиентов	
	Исходный	Через 7 дней после введения исследуемой плазмы крови
I. Контроль	105,0±2,1	102,8±2,1
P ₀	-	>0,2
II. Опыт (протамин-сульфат)	106,3±2,7	142,7±3,5
P ₀	-	<0,001
P ₁	-	<0,001

Примечания: показатель достоверности P₀ рассчитан по отношению к исходному уровню, P₁ - по отношению к контролю. В каждой группе по 6-8 животных.

Таблица 3. Концентрация сахара (в мг/100 мл) и инсулина (мкМЕ/мл) при внутрижелудочной нагрузке глюкозой животных, после 3-х недельных внутримышечных инъекций им протамин-сульфата.

Группа животных	Время после введения глюкозы							
	Исходный уровень		30 мин		1 час		2 часа	
	сахар	инсулин	сахар	инсулин	сахар	инсулин	сахар	инсулин
I. Контроль	98,5±3,9	9,5±5,3	67,0±5,3	10,7±5,2	81,5±3,9	8,5±3,9	58,2±10,7	7,0±3,4
P ₀	-	-	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5	<0,01	>0,5
II. Опыт (протамин-сульфат)	140,3±7,7	7,2±4,66	154,3±12,2	11,0±4,8	232,7±8,8	6,3±2,6	215,3±10,6	8,8±2,6
P ₀	-	-	>0,2	>0,5	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5
P ₁	<0,01	>0,5	>0,2	>0,5	<0,001	>0,5	<0,01	>0,5

Примечания: P₀ - рассчитан по отношению к исходному уровню, P₁ - по отношению к контролю. 40%-ный раствор глюкозы вводили из расчёта 1 мл на 200г массы тела. В каждой группе 4-6 животных

проявляется диабетогенный фактор. Тогда становится очевидным, что уменьшенное содержания гепарина после отмены инъекций протамин-сульфата может поддерживаться, в частности, наличием в кровотоке ДГФ. Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о снижении толерантности к глюкозе, развивающейся вследствие хронического связывания эндогенного гепарина. Мы не обнаружили заметного отличия в содержании эндогенного инсулина между животными, которым внутримышечно вводили протамин-сульфат и животными из контрольной группы (табл. 3, исходный уровень). Во время проведения теста с внутрижелудочной нагрузкой глюкозой также не отмечалось достоверного отличия в содержании этого гормона в обеих группах животных. Однако, можно видеть, что нагрузка глюкозой крыс, длительное

время получавших протамин-сульфат, приводит к развитию достоверно более выраженной гипергликемии через 1 и 2 часа после перорального введения глюкозы, нежели в контрольной группе животных.

Развивающееся состояние гипогепаринемии создаёт предпосылки к развитию резистентности к инсулину. Введение экзогенного инсулина (0,2 ЕД/200г массы тела) животным, длительное время получавших антагонист гепарина - прогамин-сульфат, вызывает снижение концентрации сахара в крови через 30 и 60 минут после введения, соответственно на 26,7 и на 26,2 % от его исходного уровня. В группах здоровых крыс аналогичное внутривенное введение инсулина вызывает падение уровня сахара в крови на 40% и 37% соответственно. Следует отметить, что абсолютные значения уровня сахара в крови у животных с дефицитом гепарина остаётся в пределах нормы (105 мг/100 мл), тогда как у здоровых крыс развивается значительная гипогликемия (58 мг/100 мл) (табл.4).

Таблица 4. Гипогликемическое действие инсулина (уровень сахара крови в мг/100 мл) на крыс с гипергликемией, вызванной 3-х недельным внутримышечным введением протамин-сульфата.

Группа животных	Вводимый препарат	Время после введения препарата		
		Исходный уровень	Через 30 минут	Через 60 минут
Гипергликемия, вызванная протамин-сульфатом	— P ₀	143,8± 7,6 -	148,0± 5,8 >0,5	153,5± 10,4 >0,2
	Инсулин - P ₀ P ₁	143,3± 4,2 - -	105,0± 3,5 <0,001 <0,001	105,8± 2,7 <0,001 <0,001
Здоровые животные	NaCl P ₀	76,8± 1,9 -	96,3± 4,2 <0,001	113,5± 2,7 <0,001
	Инсулин - P ₀ P ₁	94,4± 4,7 - -	57,1± 5,5 <0,001 <0,001	58,8± 7,5 <0,01 <0,001

Примечания: показатель достоверности P₀ рассчитан по отношению к исходному уровню, P₁ - по отношению к контролю в пределах одной группы. Инсулин вводили в дозе 0,2 ЕД/200 г. В каждой группе по 7-8 животных.

Если низкий уровень гепарина обуславливает комплекс явлений, способствующих депрессии инсулярной системы и развивающейся вследствие этого гипергликемии, то можно предположить, что восстановление уровня гепарина таких животных должно способствовать и нормализации концентрации сахара в их крови. Действительно, данные, представленные в таблице 5, подтверждают вышесказанное. Внутривенное введение 100 МЕ гепарина крысам с гипергликемией, вызванной хроническим введением протамин-сульфата, уже через 30 минут снижает концентрацию сахара в крови до нормы (88,1 мг/100мл). Нормогликемия сохраняется в течение 2-х часов наблюдения, т.е. в тот период, пока гепарин сохраняется в крови в достаточной концентрации. Ранее было показано, что период полужизни гепарина в кровотоке составляет у здоровых крыс 1,6 часа [12]. В той же работе было установлено, что активация противосвёртывающей системы удлиняет период полужизни гепарина до 2,4 часа. Можно предположить, что антагонисты гепарина, такие как протамин-сульфат, способствуют ускорению выведения гепарина из кровотока. Так или

иначе, но уже через 1 сутки гипогликемический эффект экзогенного гепарина уже не проявляется.

Таблица 5. Гипогликемическое действие гепарина (уровень сахара крови в мг/100мл) на крыс с гипергликемией, вызванной 3-х недельным внутримышечным введением протамин-сульфата (2мг 3 раза в день)

Группа животных	Время после введения препарата				
	Исх. уровень	30 минут	1 час	2 часа	24 часа
Контроль P ₀	127,9± 3,9	138,6± 4,8 >0,1	139,4± 3,5 >0,1	149,1± 4,7 <0,01	147,8± 5,4 <0,01
Гепаринизация P ₀	136,4± 3,5	88,1± 3,1 <0,001	94,0± 2,0 <0,001	98,5± 2,0 <0,001	139,4± 4,2 >0,5
P ₁	>0,1	<0,001	<0,001	<0,001	>0,2

Примечания: показатель достоверности P₀ рассчитан по отношению к исходному уровню, P₁ - по отношению к контролю (введение NaCl). Гепарин вводили внутривенно в дозе 100 МЕ/200 г.

Результаты исследования убеждают в том, что функциональное состояние инсулярной системы животных с вызванным хроническим дефицитом гепарина депрессировано. Об этом свидетельствует прежде всего появление в кровотоке ДГФ, который и может быть одной из основных причин развивающейся гипергликемии. Полученные данные убеждают в целесообразности учёта состояния противосвёртывающей системы крови, в частности, концентрации гепарина и его физиологической активности в крови при оценке нарушений гомеостаза глюкозы, поскольку при наличии физиологических концентраций гепарина в крови происходит, с одной стороны, эффективная нейтрализация в крови ДГФ [11], а с другой - обеспечивается полноценное действие эндогенного инсулина [6]. В то же время дефицит гепарина является фактором, способствующим накоплению в кровотоке ДГФ. Активация противосвёртывающей системы, сопровождающаяся повышением содержания в кровотоке эндогенного гепарина, создаёт естественный барьер против диабетогенного действия аллоксана [5].

Фактический материал, представленный в данной работе, показывает возможность использования животных с искусственно вызываемым хроническим дефицитом гепарина в качестве перспективной модели гипергликемических состояний, обусловленных резистентностью к инсулину. Действительно, концентрация инсулина при связывании эндогенного гепарина достоверно не изменяется и остаётся в пределах нормы (табл.3). Можно полагать, что помимо представленного в данной статье, механизм действия гепарина может быть обусловлен его протекторным действием в отношении антителообразования [13], а также его свойствами вещества, модулирующего трансмембранный транспорт [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов Б.А., Пытель Ю.А., Баскакова Г.М., Ляпина Л.А., Чакалева И.И. (1978). *Вопр. мед. химии*, **24**, 520-524.
2. Кудряшов Б.А., Пытель Ю.А., Баскакова Г.М., Соколова Г.А., Ляпина Л.А. (1982) *Патол. физиол. эксп. тер.*, № 2, 67-70.
3. Кудряшов Б.А., Пытель Ю.А., Ляпина Л.А., Баскакова Г.М. (1981) *Вопр. мед. химии*, **27**, 547-552.
4. Ульянов А.М., Шатино Ф.Б., Ляпина Л.А. (1989) *Патол. физиол. экспер. тер.*, №1, 54-56.
5. Кудряшов Б.А., Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (1989) *Вопр. мед. химии*, **35**, 128-131.
6. Kudrjashov B.A., Shapiro F.B., Ulyanov A.M. (1987) *Acta Physiol. Hung.*, **69**, 197-202.
7. Ульянов А.М., Шатино Ф.Б., Базазьян Г.Г. (1987) *Бюлл. эксперим. биол. мед.* **103**, 522-524.
8. Канторович Л.С. (1963) *Авт. свидет. СССР № 158399*, *Бюллетень изобретений*, **21**.
9. Warren R., Wysocki A. (1958) *Surgery*, **44**, 435-441.
10. Кудряшов Б.А., Пытель Ю.А., Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (1986) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **102**, 16-18.
11. Кудряшов Б.А. (1993) *Изв. Акад. наук, сер. Биол.*, **5**, 694-702.
12. Ульянов А.М. (1978) *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, **85**, 651-654.
13. Новицкая С.А. (1977) *Автореф. дисс. канд.-М.*
14. Лукашин Б.П. (1982) *Патол. физиол. эксперим. тер.*, **5**, 81-87.

Поступила 24.12.97.

THE INSULAR SYSTEM OF RATS EXPOSED TO CHRONIC HEPARIN DEFICIENCY

A. M. ULJANOV, YU. A. TARASOV

The laboratory of protective blood systems, School of Biology, Moscow State University,
Moscow, 119899 Russia

The chronic heparin deficiency achieved by long-term treatment (for 3 weeks) with protamine-sulfate is accompanied by the development of stable hyperglycemia, decreased glucose tolerance, and the appearance of insulin resistance. Administration of exogenous heparin promotes the restoration of normoglycemia.

Key words: heparin, protamine-sulfate, glucose, insulin.