

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ГИМНЕМЫ ЛЕСНОЙ ПРИ СРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

А. А. Спасов¹, М. П. Самохина¹, А. Е. Буланов², Л. В. Науменко¹,
Д. Ю. Агарков¹, Е. В. Сорокина¹

Экстракты гимнемы лесной (ГЛ) обладают гемореологической активностью. При этом наиболее эффективным оказался экстракт ГЛ в 25 % гравиметрической концентрации. Его применение снижает вязкость крови и взвеси отмытых эритроцитов во всем диапазоне скорости сдвига в 1,3 раза; снижает степень деформируемости красных клеток крови; увеличивает степень осмотической резистентности эритроцитов на 21,3 %; повышает интенсивность флуоресценции зонда ДСМ⁺ в эритроцитарной взвеси в 1,5 раза, улучшает вязкостно-эластические свойства мембраны эритроцитов, препятствует агрегации тромбоцитов.

Ключевые слова: диабет, гимнема лесная, система крови

ВВЕДЕНИЕ

Патологические изменения при сахарном диабете в значительной степени определяются гемореологическими нарушениями в системе микроциркуляции [1]. В свою очередь активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), индуцируемая хронической гипергликемией, характеризуется количественными и качественными изменениями липидного спектра мембран красных клеток крови [2, 3]. Это приводит к повышению микровязкости глубоких слоев липидного бислоя мембран эритроцитов. Возникающие при этом микро и макроангиопатии способствуют ослаблению функционирования факторов поддерживающих нормальный гемостаз. Поскольку эти нарушения возникают в ранние сроки заболевания и являются наиболее лабильными, медикаментозное воздействие на реологические свойства крови может “смягчить” или отсрочить клинические проявления поздних осложнений диабета [1]. В настоящее время препараты ДИА-β (Россия) и Про-β (США), созданные на основе сухого экстракта гимнемы лесной (ГЛ), применяются в комплексном лечении сахарного диабета [4 – 7]. Использование ГЛ способствует восстановлению белкового и липидного обмена [7], нивелирует активацию процессов перекисидации [5], влияет на регенерацию β-эндокриноцитов [6]. Гемореологическая активность ГЛ при сахарном диабете не была изучена, поэтому представилось целесообразным исследовать влияние экстрактов ГЛ на реологические свойства

крови при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились с использованием сертифицированных препаратов сухих экстрактов ГЛ в 25 %, 50 %, 75 % гравиметрических процентных концентрациях (процентное содержание активных веществ в пересчете на абсолютное сухое сырье, сертификат анализа GYM-030706 от 1.06.2003). Эксперименты выполнены на 120 белых беспородных крысах массой 320 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария, на сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (мышей и крыс), ГОСТ Р50258 – 92. Экспериментальные исследования проводили согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351000.3-96 и 51000.4-96).

Формирование тяжелой формы экспериментального сахарного диабета вызывали у крыс стрептозотоцином (“Sigma”, США) в дозе 45 мг/кг в вену. Через 72 ч уровень гипергликемии определяли ферментативным способом с использованием наборов Глюкоза ФКД. Через 7 дней после начала эксперимента было сформировано 6 групп: 1 — интактные животные; 2 — животные с сформированным диабетом, получавшие дистиллированную воду; 3 – 5 — животные с диабетом, получавшие экстракт ГЛ в концентрациях 25 %, 50 %, 75 % в дозе 280 мг/кг в желудок 2 раза в день; 6 — животные с диабетом, получавшие препарат сравнения танакан в дозе 7 мг/кг в желудок 2 раза в день. Продолжительность введения изучаемых веществ составила 21 день, последнее введение препаратов — за 120 мин до начала эксперимента. Забор крови прово-

¹ Кафедра фармакологии (зав. — член-корр. РАМН А. А. Спасов) Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 400131, пл. Павших борцов, 1.

² Российский НИИ здоровья, Москва.

дили под эфирным наркозом из брюшной аорты. В ходе работы определяли вязкость крови на анализаторе крови реологическом АКР-2 (Россия). Влияние веществ на агрегацию эритроцитов оценивали по индексу агрегации, рассчитываемому как отношение вязкости крови при скорости сдвига 3 с^{-1} к вязкости крови при 100 с^{-1} (L. Dintenfass, 1989).

Динамические характеристики эритроцитов оценивали с помощью фильтрационного теста и методом вискозиметрии. Деформабельность эритроцитов исследовали методом фильтрации, при этом измеряли время прохождения взвеси через фильтр Millipore (Франция) с диаметром пор 5 мкм. Затем рассчитывали среднюю скорость фильтрации и выражали в мл/мин. Влияние изучаемых веществ на деформабельность эритроцитов оценивали также вискозиметрическим методом при стандартизированном гематокрите 45 %. Вязкость взвеси эритроцитов измеряли на ротационном вискозиметре АКР-2 (Россия) при скоростях сдвига 300, 30, 3 с^{-1} . На спектрофлуориметре Hitachi MPF-400 (Япония) проводили определение заряда мембраны эритроцитов с использованием положительно заряженного зонда *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ⁺) и степень анизотропии с использованием зонда ДСП-6 (*n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-гексилпиридиния). Влияние веществ на АДФ-индуцированную (5 мкмоль) агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA, НПФ “Биола”, Москва) по методу G. Born (1962) в модификации З. А. Габбасова (1989). Интенсивность агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. На гемокоагулометре SOLAR с использованием наборов реактивов производства “Технология — стандарт” (Россия), были определены тромбиновое и протромбиновое время, активированное парциальное тромбопластиновое время, содержание фибриногена с использованием классических методик, основанных на автоматическом определении клоттингового времени (З. С. Баркаган, А. П. Момот, 1999). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. (StatSoft, США). Проводили расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды. Результаты биохимических исследований оценивали с использованием парного *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферони ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено увеличение показателей вязкости крови в группе крыс с сахарным диабетом по отношению к интактным животным во всем диапазоне скоростей сдвига (300 с^{-1} — на 22,3 %; 10 с^{-1} — на 48,43 %) и увеличение индекса агрегации эритроцитов на 35,16 % по отношению к группе здоровых крыс. Это может свидетельствовать о выраженных нарушениях

структуры и функции эритроцитарных мембран, а также об активации процессов агрегатообразования. Развитие стрептозотоцинового диабета у животных вызывает выраженные изменения и в механических свойствах красных клеток крови. Так, показатель кислотной резистентности снижался на 49,97 %, а индекс доставки кислорода в ткани на 22,23 % ($p < 0,05$) по отношению к интактным животным. О снижении заряда мембран эритроцитов в результате количественных и качественных изменений липидного спектра мембран красных клеток крови свидетельствует уменьшение интенсивности флуоресценции зонда ДСМ во взвеси эритроцитов на 35,2 %. Увеличение анизотропии зонда ДСП-6 в 1,5 раза может быть признаком повышения жесткости мембран эритроцитов при сахарном диабете. При моделировании указанной патологии достоверно усиливались процессы агрегации тромбоцитов, что доказывается повышением индекса агрегации тромбоцитов и скорости агрегации, снижением индекса дезагрегации кровяных пластинок. Показатели коагуляционных тестов определили статистически значимый сдвиг в системе регуляции агрегатного состояния крови в сторону гиперкоагуляции (повышение содержания фибриногена в плазме крови на 74,88 %, уменьшение протромбинового и тромбинового времени на 23,34 % и на 7,83 % соответственно, по сравнению с контролем).

Исследуемые экстракты гимнемы лесной 25 %, 50 %, 75 % концентрации и препарат сравнения танакан при курсовом введении способствовали снижению вязкости крови во всем диапазоне скорости сдвига. Однако наибольшая эффективность была выявлена у 25 % препарата ГЛ при низких скоростях сдвига (в 1,3 раза меньше по сравнению с контролем), что представляется особенно важным, учитывая, что при этих скоростях сдвига определяющими характеристиками являются вязкость самой мембраны и клеточная геометрия эритроцита. После курсового применения 25 %, 50 % и 75 % экстрактов отмечено увеличение осмотической резистентности эритроцитов на 21,3; 13,33 и 5,45 % соответственно. Под влиянием 25 % препарата скорость фильтрации взвеси увеличивалась на 27,45 % по сравнению с контрольными значениями. Кроме того, после применения 25 % препарата ГЛ в 1,5 раза повышалась интенсивность флуоресценции зонда ДСМ⁺ в эритроцитарной взвеси, что свидетельствует об увеличении электроотрицательности мембран эритроцитов. В свою очередь уменьшение показателя анизотропии является доказательством улучшения вязкостно-эластических свойств мембраны эритроцитов. О снижении выраженности основных проявлений гиперагрегации тромбоцитов после курсового введения 25 % экстракта ГЛ свидетельствует уменьшение величины АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в 2 раза по сравнению с 50 % и 75 % препаратами. Оба последних препарата превосходят по эффективности танакан. При применении 25 % препа-

рата отмечена относительная нормализация гиперкоагуляционного статуса проявляющаяся в достоверном снижении вязкости плазмы крови на 14,03 % и нормализации показателей коагуляционного гемостаза: содержание фибриногена в плазме крови — $6,36 \pm 0,67$ (г/л); тромбинового и протромбинового времени $20,0 \pm 1,09$; $84,63 \pm 9,59$ (сек) соответственно; активированного парциального тромбопластинового времени $27,12 \pm 1,56$ (сек).

Таким образом, экстракт ГЛ обладает выраженной гемореологической активностью при курсовом применении у крыс с экспериментальным стрептозоточин-индуцированным сахарным диабетом. Однако наибольшее влияние на реологические свойства крови выявлено при применении экстракта ГЛ в 25 % концентрации. Так, установлено, что наибольшее влияние на реологические свойства крови оказывает экстракт ГЛ 25 % влияя на вязкость самой мембраны и клеточную геометрию клетки, определяющие показатели на степень деформируемости эритроцитов. Увеличение поверхностного заряда мембраны эритроцитов, выявленное после курсового применения ГЛ, способствует интенсификации процесса отталкивания одноименных зарядов, что в свою очередь способствует снижению процесса внутрисосудистой агрегации красных клеток крови, приводит к снижению травматизации и разрушения клеток в процессе гемодинамики [1]. Это предотвращает выделение в кровь эритроцитарных факторов свертывания, улучшая процессы микроциркуляции [2, 5]. Снижение агрегации тромбоцитов, может свидетельствовать об уменьшении их функциональной активности и способности к внутрисосуди-

стой агрегации, что в конечном счете препятствует развитию сосудистых поражений [1, 7].

ВЫВОДЫ

1. Экстракт гимнемы лесной снижает вязкость крови и степень агрегации эритроцитов, увеличивает индекс доставки кислорода к тканям, повышает кислотную и осмотическую резистентность мембраны эритроцитов при синдроме повышенной вязкости крови.
2. Экстракт гимнемы лесной уменьшает величину и скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.
3. Экстракт гимнемы лесной повышает интенсивность флуоресценции зонда ДСМ⁺ в эритроцитарной взвеси и увеличивает электроотрицательность мембран эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, *Пробл. эндокринолог.*, № 7, 29 – 34 (2000).
2. Т. П. Бондарь, Г. И. Козинец, *Лабораторно-клиническая диагностика сахарного диабета и его осложнений*, Медицинское информационное агенство, Москва (2003).
3. N. Nath, S. N. Chari, and A. B. Rathi, *Diabetes*, **33**, 586 – 588 (1984).
4. Y. Okabayashi, S. Tani, et al., *Diabetes*, № 9, 143 – 148 (1990).
5. S. J. Persaud, H. Al. Majed, A. Raman, and P. M. J. Jones, *Endocrinol*, № 163, 207 – 212 (1999).
6. E. R. Shanmugasundaram, Radha K. Shanmugasundaram, and V. M. Rajendran, *J. Ethnopharmacol*, № 30, 265 – 79 (1990).
7. UK Prospective Diabetes Study Group, *Lancet*, **352**, 837 – 853 (1998).

Поступила 23.01.07

HEMORHEOLOGICAL ACTIVITY OF *Gymnema Sylvestre* EXTRACTS IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

A. A. Spasov¹, M. P. Samokhina¹, A. E. Bulanov², L. V. Naumenko¹, D. Yu. Agarkov¹, and E. V. Sorokina¹

¹ Institute of Pharmacology, Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131, Russia

² Institute of Public Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Extracts of *Gymnema sylvestre* (GS) exhibit hemorheological activity. The most pronounced effect was observed for GL extract in 25 wt % concentration, which (i) induced a decrease in the viscosity of blood and washed erythrocyte suspensions in the entire range of shear rates by a factor of 1,3 (ii) reduced the degree of deformability of red blood cells, (iii) increased the degree of osmotic resistance of erythrocytes by 21.3 %, (iv) increased the intensity of fluorescence of DSM⁺ probe in erythrocyte suspensions by a factor of 1.5, and (v) decreased the degree of anisotropy, thus generally improving the viscoelastic properties of the erythrocyte membrane and preventing the thrombocyte aggregation. In this respect, the GS extract activity exceeded that of Tanakan.