

## ГИПОКОАГУЛЯЦИОННЫЙ ЭФФЕКТ ОРИГИНАЛЬНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ГК-2

И. В. Озерова<sup>1</sup>, Л. В. Лютова<sup>2</sup>, Р. У. Островская<sup>1</sup>, Т. А. Гудашева<sup>1</sup>, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

Исследовано влияние оригинального димерного дипептидного миметика фактора роста нервов (NGF), ГК-2 (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), созданного на основе структуры β-изгиба 4-й петли NGF крыс, на некоторые показатели гемостаза и фибринолиза плазмы крови интактных и диабетических животных в разные периоды развития заболевания. Диабет у крыс-самцов Вистар вызывали введением стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 40 мг/кг внутривнутрино. Определяли уровень глюкозы, показатели гемостаза по расшифровке тромбоэластограммы и активность фибринолиза по скорости лизиса сгустка эуглобулинов. Эффект NGF-миметика изучали в условиях *ex vivo*, внося соединение в плазму крови. Через 10 сут после введения СТЗ отмечали ускорение образования тромбина, повышение индексов коагуляции *с<sub>1</sub>* и *I*, а также замедление лизиса эуглобулинового сгустка, что свидетельствует об опасности возникновения тромбоза. Добавление к плазме соединения ГК-2 ( $10^{-5}$  М) ведёт к нормализации этих показателей. У интактных животных ГК-2 также оказывает гипokoагуляционное действие. Это свойство соединения ГК-2, в сочетании с выявленным ранее антигипергликемическим влиянием этого NGF-миметика является чрезвычайно важным, т.к. при сахарном диабете отмечается нарушение микроциркуляции и повышена опасность тромбообразования.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; гипokoагуляция; дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2; стрептозотоцин

### ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) занимает 3-е место среди основных причин смертности. По данным ВОЗ, в настоящее время в мире насчитывается 285 млн больных СД, к 2025 г. их количество составит 380 млн, а к 2030 г. — 435 млн. В России на 1 января 2010 г. зарегистрировано более 3 млн больных СД [4]. Особенно опасным осложнением диабета является поражение сосудистого русла, которое может касаться как крупных сосудов — макроангиопатия, так и капилляров — микроангиопатия. Наиболее выраженные изменения происходят в сосудах сетчатки, почек, головного мозга, миокарда и нижних конечностей. В основе патогенеза многих осложнений лежит дисфункция систем плазменного и тромбоцитарного гемостаза и фибринолиза. Поэтому актуален поиск новых сахароснижающих препаратов, положительно влияющих на состояние этих систем.

Одним из патогенетических механизмов гипofункции β-клеток поджелудочной железы при диабете является дефицит нейротрофических факторов, таких как фактор роста нервов (NGF) [10]. NGF обладает свойствами агониста тирозинкиназного рецептора, играющего важную роль в осуществлении инсулином функции, направленной на поступление глюкозы в ткани организма [13]. Однако практическое использо-

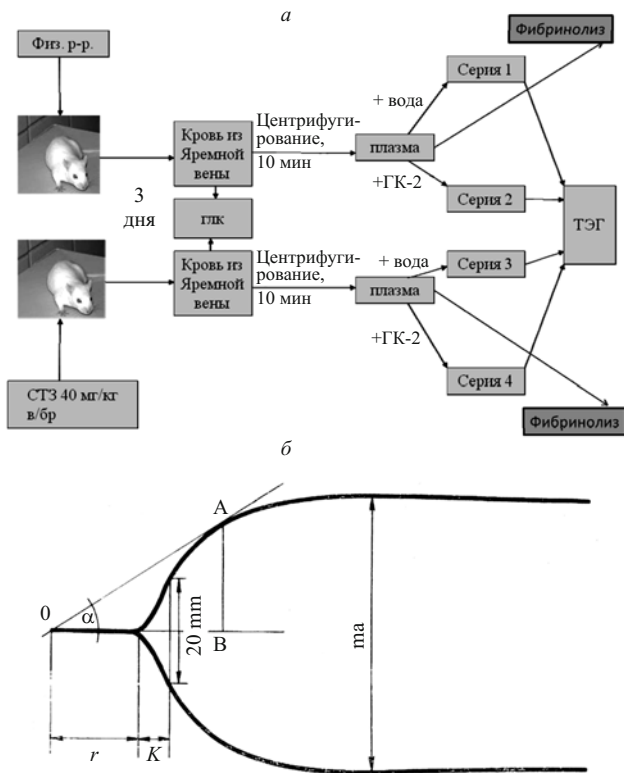
вание NGF с целью заместительной терапии невозможно в связи со сложностью его химической структуры, — плеiotропностью, низкой биологической устойчивостью и развитием побочных эффектов. Активность NGF проявляется только при локальном подведении к органу-мишени. Совокупность этих факторов обуславливает интенсивный поиск новых низкомолекулярных миметиков NGF, эффективных при системном введении.

В ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН на основе структуры β-изгиба 4-й петли NGF крысы создан оригинальный димерный дипептидный миметик ГК-2 (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) [3, 6]. Установлено, что ГК-2 активирует TrkA рецепторы [1], демонстрирует высокую NGF-подобную нейропротективную активность в экспериментах *in vitro* [2], а также проявляет эффективность *in vivo* на моделях ишемии мозга [7].

Ранее нами было установлено, что ГК-2 ослабляет гипергликемию, вызванную у крыс диабетогенным токсином, стрептозотоцином [5]. Стрептозотоцин (СТЗ) — алкилирующее соединение, производное нитрозомочевины, которое способствует генерации свободных радикалов, алкилирует ДНК, активирует поли-АДФ-рибозосинтетазу, подавляет синтез ДНК и пролиферацию β-клеток; угнетает активный транспорт кальция и кальмодулин-активированную протеинкиназу [12]. В больших дозах (60–90 мг/кг) СТЗ моделирует диабет 1 типа, а в малых (30–45 мг/кг) — диабет 2 типа [14]. Изучение ГК-2 на модели диабета

<sup>1</sup> ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

<sup>2</sup> МГУ имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, лаборатория защитных систем крови имени Б. А. Кудряшова.



**Рис. 1.** А. Схема эксперимента — моделирование стрептозототинового диабета у крыс, изучение эффекта ГК-2 в опытах *ex vivo* (а), тромбозастрограмма (б).

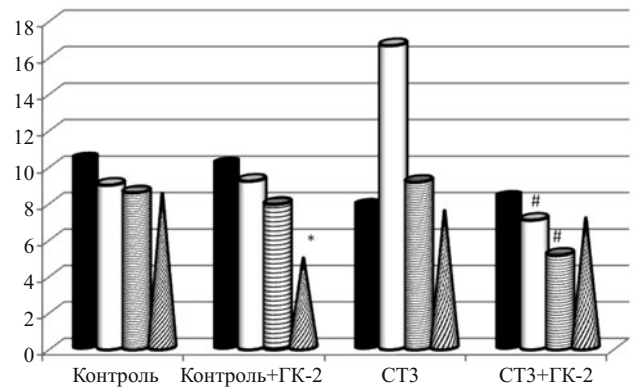
может дать важную информацию о возможных клинических перспективах этого NGF-миметика. На первом этапе исследований целесообразно изучать эффект потенциального препарата в экспериментах *ex vivo* с тем, чтобы в дальнейшем оценить его эффект в условиях целого организма [9].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ГК-2 *ex vivo* на некоторые показатели гемостаза и фибринолиза интактных и диабетических животных.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на двух группах крыс-самцов Вистар массой 300–350 г, которым внутрибрюшинно вводили диабетогенный токсин стрептозототин (СТЗ, “Sigma”, США) в дозе 40 мг/кг (группа активного контроля), либо физиологический раствор (группа пассивного контроля). Эксперимент был проведен в условиях *ex vivo*: добавление соединения ГК-2 к плазме крови, взятой у животных обеих групп (рис. 1, а).

Кровь для исследования брали из яремной вены животных обеих групп при помощи шприца, содержащего 3,8% раствор цитрата натрия (соотношение 9:1) через 4, 10, 18 и 45 суток от начала эксперимента. С помощью глюкометра One touch Ultra (США) измеряли концентрацию глюкозы, затем кровь центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. От каждого об-



**Рис. 2.** Сравнение динамики показателя *ci* у животных групп пассивного (физиаствор) и активного (СТЗ диабет) контролей без добавления и с добавлением *ex vivo* ГК-2.

Приведенные фигуры отражают данные для 4-х, 10-х, 18-х и 45-х суток соответственно.

\* — достоверность по Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ , между пассивным контролем (физиаствор) и группой, которой вводили физиаствор и вносили *ex vivo* ГК-2. # — достоверность по Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ , между активным контролем (СТЗ) и группой, которой вводили СТЗ и вводили *ex vivo* ГК-2.

разца полученной плазмы отделяли 0,2 мл для определения фибринолиза, а оставшуюся плазму делили на 2 равные части (по 0,7 мл). К одной части плазмы крыс из группы активного контроля добавляли 0,035 мл дистиллированной воды (серия 1), к другой — 0,35 мл свежеприготовленного раствора ГК-2 в дистиллированной воде в концентрации  $10^{-5}$  М (серия 2). Аналогичным образом обрабатывали группу пассивного контроля (серии 3 и 4 соответственно). Все образцы инкубировали в течение 10 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Затем в них определяли некоторые показатели гемостаза по расшифровке данных тромбозастрограммы (ТЭГ), записанной на тромбозастрографе фирмы Hellige. 0,735 мл плазмы, проинкубированной с водой или ГК-2, помещали в кювету прибора, добавляли 0,03 мл 1,9% раствора хлорида кальция и производили запись. Полученные результаты позволяли оценить ряд параметров гемостаза (антикоагулянтную активность плазмы и свойства образующегося сгустка):  $r$  — время реакции, соответствующее тромбинообразованию,  $k$  — время начала образования сгустка, появления фибриновых нитей,  $ma$  — максимальная амплитуда и угол  $\alpha$  (рис. 1, б). На основании этих параметров вычислялись следующие показатели:  $E$  — плотность сгустка ( $E = 100ma/(100 - ma)$ ),  $I$  и  $ci$  — индексы коагуляции, равные  $160 \cdot \text{tg}\alpha$  и  $ma/r + k$ . Фибринолитическую активность оценивали по времени лизиса сгустка эглобулиновой фракции. Статистическую обработку полученных данных проводили по непараметрическому методу Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание глюкозы в крови крыс группы пассивного контроля на протяжении всего эксперимента со-

ставляло  $5,36 \pm 0,12$  ммоль/л. У животных группы активного контроля через 4 сут после введения токсина уровень глюкозы был равным  $20,03 \pm 1,65$  ммоль/л, через 10 сут —  $20,1 \pm 1,54$  ммоль/л, через 18 сут —  $20,83 \pm 1,32$  ммоль/л, через 45 сут —  $14,45 \pm 0,96$  ммоль/л. Согласно многочисленным литературным данным содержание глюкозы более 13–15 ммоль/л рассматривается как показатель диабета.

Ранее на модели диабета, вызванного введением СТЗ, было показано, что этот токсин ускоряет время образования тромбина и вызывает гиперкоагуляцию [8]. В наших экспериментах, проведенных в разные сроки после введения токсина, показано, что максимально выраженные изменения гемостаза (ускорение генерации тромбина, резкое возрастание индексов коагуляции при замедленном фибринолизе) развиваются через 10 суток, а к 45-м суткам происходит постепенная нормализация показателей. Из данных, представленных в таблице, следует, что на 4-е сутки эксперимента на фоне близких к норме показателей гемостаза добавление к плазме соединения ГК-2 вызывает лишь некоторое ускорение образования тромбина, которое нейтрализуется замедлением образования фибриновых нитей. На 10-е сутки эксперимента в условиях ускоренного образования тромбина, повышения индексов коагуляции (сi и I) у диабетических крыс (серия 1) добавление к плазме соединения ГК-2 (серия 2) ведёт к замедлению процесса тромбообразования, снижению плотности сгустка и индексов коагуляции и ускорению фибринолиза. На 18-е сутки гипокоагуляционный эффект ГК-2 также частично сохраняется и выражается в более медленном образовании тромбина и фибрина, почти в двухкратном снижении плотности сгустка и в полуторакратном — индекса коагуляции сi, также наблюдалась тенденция к снижению индекса коагуляции I. Через 45 сут на фоне снижающейся гипергликемии гемостаз нормализуется и добавление к

плазме соединения ГК-2 не сопровождается дополнительными изменениями показателей коагуляции (рис. 2).

Что касается фибринолитической активности, было показано, что время растворения сгустка у группы активного контроля на 4-е сутки эксперимента при внесении в плазму соединения ГК-2 замедляется. Однако во все последующие дни скорость фибринолиза нарастает в 1,3 раза.

У интактных животных при введении ГК-2 в плазму наблюдается тенденция к гипокоагуляции (рис. 2) и ускорению фибринолиза, однако этот эффект выражен меньше, чем у диабетических крыс.

Таким образом, в результате выполненных исследований впервые выявлен гипокоагуляционный эффект оригинального низкомолекулярного системно-активного аналога NGF, ГК-2. Эксперименты *ex vivo* не позволяют сделать окончательного заключения о механизмах гипокоагуляционного действия ГК-2. Однако, учитывая представления о том, что этот NGF-миметик воспроизводит эффекты нативной молекулы [1], следует проанализировать литературные данные, касающиеся эффектов NGF в отношении процессов коагуляции и фибринолиза. Описана способность NGF стимулировать активность базофилов и вызывать высвобождение гепарина в кровь, осуществляемую за счёт взаимодействия с TtkA рецепторами [15]. Учитывая известные свойства гепарина, как антикоагулянта, а также исходя из выявленного факта взаимодействия соединения ГК-2 с TtkA рецепторами [1], можно предположить, что способность усиливать высвобождение гепарина вносит свой вклад в осуществление гипокоагуляционного действия изучаемого миметика NGF в условиях диабета. Вероятность образования тромба может быть снижена также ускорением фибринолиза — эффектом, описанным для NGF [11]. Таким образом, на модели стрептозотоцинового диабета ГК-2 проявляет не только антигипергликемические свойства

Влияние ГК-2 на показатели тромбоэластографии плазмы крыс с СТЗ-диабетом ( $M \pm m$ )

Сроки после СТЗ	R, мм	K, мм	E, ед	сi, ед	I, Ед
<b>4 суток</b>					
Серия 1	$6,33 \pm 0,88$	$2,67 \pm 1,67$	$157,8 \pm 33,22$	$7,98 \pm 2,05$	$282,7 \pm 101,80$
Серия 2	$0,2 \pm 0,05^*$	$4,5 \pm 2,29$	$156,7 \pm 36,88$	$8,42 \pm 1,42$	$307,3 \pm 66,75$
<b>10 суток</b>					
Серия 1	$2,92 \pm 0,40$	$2,58 \pm 0,70$	$90 \pm 14,30$	$16,68 \pm 5,73$	$531,4 \pm 41,20$
Серия 2	$4,29 \pm 0,80^{*#}$	$2,58 \pm 0,92$	$80,16 \pm 14,37^{#}$	$7,11 \pm 10^*$	$329,5 \pm 34,95^*$
<b>18 суток</b>					
Серия 1	$2,33 \pm 0,75$	$4,08 \pm 0,9$	$149,1 \pm 28,30$	$9,19 \pm 1,18$	$328,9 \pm 21,60$
Серия 2	$3,08 \pm 1,02^{#}$	$7,75 \pm 2,92^*$	$90,52 \pm 4,93^{*#}$	$5,19 \pm 1,63^{*#}$	$262,9 \pm 66,07$
<b>45 суток</b>					
Серия 1	$6 \pm 2,04$	$2,5 \pm 1,19$	$162,8 \pm 21,30$	$7,46 \pm 0,35$	$273 \pm 13,63$
Серия 2	$5,75 \pm 2,10^{#}$	$2,5 \pm 1,19$	$151,9 \pm 28,10$	$7,06 \pm 0,33$	$269,1 \pm 32,92$

\* — достоверность различий по критерию Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ , между сериями 1 и 2 опытной группой (введение внутривенно СТЗ и в плазму соединения ГК-2).

# — достоверность различий по критерию Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ , в пределах серии 2 между 4-м и последующими сутками.

ва [5], но также и гипокоагуляционные. Такое сочетание свойств является чрезвычайно важным, т.к. при сахарном диабете отмечается нарушение микроциркуляции и повышена опасность тромбообразования. Сочетание антикоагулянтной и фибринолитической активности может внести вклад и в осуществление нейрорепрогективного действия NGF-миметика и при ишемических поражениях мозга.

## ВЫВОДЫ

1. На модели диабета, вызванного введением крысам стрептозотоцина, обнаружено повышение риска тромбообразования, наиболее выраженное через 10 сут после введения токсина.

2. Впервые выявлен гипокоагуляционный эффект оригинального низкомолекулярного системно-активного миметика NGF, ГК-2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Антипова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **73**(12), 6 – 8 (2010).
2. Т. А. Антипова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *Бюл. экпер. биол.*, **150**(11), 537 – 540 (2010).

3. Т. А. Гудашева, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин, *Доклады Академии Наук*, **434**(4), 549 – 552 (2010).
4. И. И. Дедов, *Сахарный диабет*, № 3, 6 – 13 (2010).
5. П. Ю. Поварнина, И. В. Озерова, Р. У. Островская и др., *Доклады Академии Наук*, **449**(3), 364 – 366 (2013).
6. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, Патент РФ № 2410392 (2010).
7. С. Б. Середенин, Д. Н. Силачев, Т. А. Гудашева и др., *Бюл. экпер. биол.*, **151**(5), 518 – 521 (2011).
8. H. R. Hansen, J. L. Wolfs, L. Bruggemann, et al., *Blood Coagul Fibrinolysis.*, **18**(7), 627 – 636 (2007).
9. M. L. Kalb, L. Potura, S. A. Kozek-Langenecker, *Platelets.*, **20**(1), 7 – 11 (2009).
10. J. H. Nielsen, E. D. Galsgaard, A. Møldrup, et al., *Diabetes.*, **50**, Suppl 1, S25 – 9 (2001).
11. N. S. Orenstein, H. F. Dvorak, M. H. Blanchard, et al., *Natl Acad Sci USA. November*, **75**(11), 5497 (1978).
12. D. A. Rees, *Diabet Med.*, **22**(4), 359 – 370 (2005).
13. L. K. Shawver, L. M. Strawn, and A. Ulrich, *Mulat. Res.*, **333**, 23 – 28 (1995).
14. K. Srinivasan & P. Ramarao, *Indian. J. Med. Res.*, **125**, Pp 451 – 472 (2007).
15. P. Welker, J. Grabbe, B. Gibbs, et al., *Immunology*, **99**(3), 418 – 426 (2000).

Поступила 16.04.13

## HYPOCOAGULANT EFFECT OF THE NOVEL DIPEPTIDE NGF MIMETIC GK-2

I. V. Ozerova<sup>1</sup>, L. V. Lyutova<sup>2</sup>, R. U. Ostrovskaya<sup>1</sup>, T. A. Gudasheva<sup>1</sup>, and S. B. Seredenin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

<sup>2</sup> Department of Biology, Moscow State University, Vorob'evy Gory 1/12, Moscow, 119234, Russia

The effect of an original dimeric dipeptide NGF mimetic, GK-2 (hexamethylenediamide bis-N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine, designed on the basis of the beta-turn of the 4th NGF loop) on the hemostasis and fibrinolysis was studied in intact and diabetic Wistar rats in various periods of disorder development. Model diabetes was induced by single streptozotocin (40 mg/kg i.p.) administration. Blood glucose level, main parameters of thromboelastograms, and euglobulin clot lysis time were measured. The effect of GK-2 was studied under *ex vivo* conditions, by adding freshly prepared peptide solution to the blood plasma. The maximum increase in the thrombosis probability was observed in ten days after streptozotocin injection, as manifested by an increase in coagulation indices CI and I together with a decrease in the euglobulin clot lysis time. Adding GK-2 ( $10^{-3}$  M) to the blood plasma was found to normalize these parameters. The tendency to hypocoagulant effect was also observed in experiments with GK-2 adding to the blood plasma of intact animals. The hypocoagulant effect of GK-2 in combination with its antihyperglycemic effect (revealed previously) is of great importance, since diabetes is known to be accompanied by violated microcirculation and increased risk of thrombosis.

**Keywords:** diabetes mellitus; hypocoagulant effect; dipeptide NGF mimetic GK-2; streptozotocin