

## **ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА НА СОДЕРЖАНИЕ КОЛЛАГЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ**

**Переведенцева С.Е., Савинова Н.В., Трофимова С.Р., Данилова О.В., Наумова Н.Г.**

*ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России», Удмуртская Республика, Ижевск, e-mail: Perevedenceva69@mail.ru*

В последние десятилетия хронические заболевания печени вызывают огромный интерес медиков всего мира. Различные заболевания сопровождаются негативным влиянием на этот орган, вызывая развитие стеатоза, что приводит к повреждению гепатоцитов, воспалительным процессам и развитию фиброза. Фиброз печени характеризуется избыточным накоплением межклеточного матрикса соединительной ткани, который способен быстро менять свой состав под действием повреждающих факторов. Одним из предикторов развития такой ситуации является сахарный диабет. В исследовании изучалось содержание свободного гидроксипролина, нейтральносолеорастворимой фракции коллагена и суммарного коллагена в гомогенатах печени крыс с аллоксановым диабетом и его сочетанием с системным введением даларгина. Результаты, полученные авторами в ходе эксперимента, свидетельствуют об интенсификации процессов накопления коллагена в печени при аллоксановом диабете, что способствует фиброзированию этого органа. Это может быть связано с усилением процесса гликозилирования коллагена и повышением его устойчивости к действию протеаз, а также трансформацией звездчатых клеток печени в миофибробласты под действием провоспалительных факторов. При введении даларгина на фоне аллоксанового диабета отмечалось менее активное накопление коллагена, вероятно, за счет нормализации баланса прооксидантной и антиоксидантной систем, что предотвращает развитие цитолитического синдрома и может способствовать восстановлению функциональной активности печени.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, печень, коллаген, даларгин.

## **THE EFFECT OF THE SYNTHETIC ANALOGUE OF LEY-ENKEFALIN ON THE COLLAGEN CONTENT IN THE LIVER OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES**

**Perevedentseva S.E., Savinova N.V., Trofimova S.R., Danilova O.V., Naumova N.G.**

*Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, e-mail: Perevedenceva69@mail.ru*

In recent decades, chronic liver diseases have aroused great interest among doctors around the world. Various diseases are accompanied by a negative effect on this organ, causing the development of steatosis, which, in turn, leads to damage to hepatocytes, inflammatory processes and the development of fibrosis. Liver fibrosis is characterized by excessive accumulation of extracellular matrix of connective tissue, which is able to quickly change its composition under the influence of damaging factors. One of the predictors of the development of such a situation is diabetes mellitus. The work investigated the content of free hydroxyproline, neutral salt-soluble collagen fraction and total collagen in liver homogenates of rats with alloxan diabetes and its combination with systemic injection of dalargin. The results obtained by the authors during the experiment indicate the intensification of the processes of collagen accumulation in the liver in alloxan diabetes, which contributes to the fibrosis of this organ. This may be due to an increase in the process of glycosylation of collagen and an increase in its resistance to the action of proteases, as well as the transformation of stellate liver cells into myofibroblasts under the action of pro-inflammatory factors. When dalargin was injection against the background of alloxan diabetes, less active accumulation of collagen was noted, probably due to normalization of the balance of pro-oxidant and antioxidant systems, which prevents the development of cytolytic syndrome and may contribute to the restoration of functional activity of the liver.

Keywords: alloxan diabetes, liver, collagen, dalargin.

В последние десятилетия хронические заболевания печени вызывают огромный интерес медиков всего мира. Печень является уникальным органом, выполняющим большое количество разнообразных функций. Это обусловлено особенностями ее строения и наличием многообразных мультиферментных комплексов. Различные заболевания сопровождаются

негативным влиянием на этот орган, вызывая развитие стеатоза, приводящего к воспалительным процессам, разрушению клеток печени и развитию фиброза. Фиброз печени характеризуется избыточным накоплением межклеточного матрикса соединительной ткани (коллагена, неколлагеновых белков, гликозаминогликанов, протеогликанов), который способен быстро менять свой состав под действием повреждающих факторов. Одним из предикторов развития такой ситуации является сахарный диабет. Во-первых, дефицит инсулина сопровождается дефицитом глюкозы в клетках, что сопровождается активацией липолиза, поступлением свободных жирных кислот в клетки печени, снижением скорости выведения липопротеинов из гепатоцитов и, как следствие, накоплением липидов в гепатоцитах. Во-вторых, длительная гипергликемия при сахарном диабете является прооксидантным фактором и приводит к развитию оксидативного стресса, вызывающего повреждение мембран и разрушение гепатоцитов [1, 2]. По данным некоторых исследователей, фиброз печени может быть обратимым процессом при условии своевременного устранения этиологического и патогенетического факторов [3, 4]. Но исследований, посвященных особенностям развития фиброза печени при сахарном диабете, немного и выводы не всегда однозначны. Кроме того, продолжается поиск лекарственных препаратов, направленных на снижение скорости фиброобразования печени и оказывающих этиотропное, антиоксидантное, противовоспалительное, цитопротективное действия. В данной работе авторы использовали даларгин, который является аналогом лей-энкефалина, но с более высокой устойчивостью к протеолитическим ферментам. Данный препарат создан в 1978 году и включает в себя определенную последовательность аминокислот, характерную для большинства опиоидов, действующих через  $\delta$ - и  $\mu$ -опиатные рецепторы. Но, в отличие от природных центральных опиатов, даларгин не проникает через гематоэнцефалический барьер и в проведенных экспериментах не вызывал развития толерантности и физической зависимости. Произведенная замена аминокислоты глицин во втором положении аминокислотной цепи лей-энкефалина на аминокислоту D-аланин увеличила стабильность пептида в организме, обеспечивая устойчивость к действию эндопептидаз. Он прошел все стадии доклинического и клинического исследования и был разрешен к клиническому применению для лечения язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки с целью ускорения процессов регенерации тканей. Доказано, что симпатическая нервная система активирует репаративную регенерацию разных органов и тканей, включая печень. Даларгин оказывает модулирующее влияние на активность симпатoadреналовой системы в различных стрессовых ситуациях за счет подавления активности ферментов ДОФА-декарбоксилазы и, в меньшей степени, дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, а также уменьшения высвобождения норадреналина из симпатических окончаний [5]. Это приводит к сохранению депо катехоламинов в

симпатических окончаниях и последующей симпатической (норадренергической) стимуляции репаративной регенерации. Доказана способность даларгина снижать генерацию активных форм кислорода и поддерживать уровень низкомолекулярных антиоксидантов, оказывать иммуномодулирующее и гипотензивное действия. Дальнейшие исследования механизмов действия даларгина позволили использовать его для лечения острых и хронических панкреатитов, панкреонекроза, инфаркта миокарда [6, 7], так как он обладает широким спектром биологической активности и действует на различные звенья патологического процесса, имея при этом специфическую направленность. Учитывая все вышесказанное, авторы исследовали влияние даларгина на метаболизм коллагена в печени при аллоксановом диабете, так как таких данных в литературе недостаточно.

Цель исследования: изучить влияние даларгина на некоторые показатели метаболизма коллагена печени экспериментальных животных в условиях аллоксанового диабета.

**Материал и методы исследования.** Для участия в эксперименте авторы отобрали 60 белых беспородных крыс-самцов массой 170–230 г. Для развития сахарного диабета использовали аллоксана тетрагидрата (мезоксалмочевина, производство «Fluka Chemika», Швеция), применяя однократное подкожное введение в дозировке 170 мг/кг массы животного. Аллоксан является структурным аналогом глюкозы, поэтому может связываться с глюкозными транспортерами и накапливаться в бета-клетках поджелудочной железы, вызывая в них генерацию активных форм кислорода в циклической реакции с диалуроновой кислотой [8]. Это вызывает повреждение молекул нуклеиновых кислот в бета-клетках, нарушение синтеза и секреции инсулина, что приводит к дефициту инсулина, нарушению поступления глюкозы в клетки и, как следствие, развитию хронической гипергликемии. После введения аллоксана экспериментальные животные находились на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде. Внутримышечные инъекции даларгина (Минздравмедпром России, НПО «Биомед») проводили через каждые 72 часа в течение 30 дней в дозе 100 мкг/кг массы животного. Контрольную группу составили крысы с подкожным введением 0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl через каждые 72 часа в течение 30 дней [9]. Животных выводили из эксперимента на 10-й и 30-й дни, соблюдая гуманное отношение к животным. У экспериментальных животных в крови определяли уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина с помощью стандартных наборов «Глюкоза GOD-PAР» (НПФ АБРИС+) и Lachema (Словакия) соответственно. В гомогенатах центральной доли печени исследовали количество свободного гидроксипролина с использованием парадиметиламинобензальдегида [10]. Содержание суммарного коллагена оценивали по уровню свободного гидроксипролина, образовавшегося в результате его гидролиза в ампулах в течение 6 часов при 106°C в 6,0 н растворе соляной кислоты. Определение нейтрально-соле-растворимой фракции коллагена

проводили по уровню свободного гидроксипролина после экстрагирования 0,2М NaCl при  $t=4^{\circ}$  в течение 24 часов и дальнейшего гидролиза в ампулах в течение 6 часов при  $106^{\circ}\text{C}$  в 6,0 н растворе соляной кислоты [11]. Количество изучаемых показателей в плазме крови выражали: глюкоза – ммоль/л, гликозилированный гемоглобин – в ммоль/г гемоглобина; в гомогенатах печени – все показатели в ммольх гидроксипролина на 1 кг сухой ткани (ммоль/кг). Все полученные результаты эксперимента авторы обработали с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft), применяя непараметрические методы, и представили их в виде медиан и интерквартильных интервалов. При межгрупповом сравнении полученных данных для анализа различий по количественным параметрам использовали U-критерий Манна–Уитни [12].

**Результаты исследования и их обсуждение.** О формировании аллоксанового диабета у экспериментальных животных судили по развитию гипергликемии и увеличению концентрации гликозилированного гемоглобина в крови. Содержание глюкозы в крови на 10-й и 30-й дни опыта превышало контроль на 147% ( $p<0,01$ ) и 216% ( $p<0,001$ ) соответственно (табл. 1). Количество гликозилированного гемоглобина также было повышенным в течение всего периода наблюдений: на 139,9% ( $p<0,001$ ) к 10-му дню и на 271,7% ( $p<0,001$ ) к 30-му дню, что свидетельствует о длительности гипергликемии (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови крыс с аллоксановым диабетом, протекающим на фоне системного введения даларгина

(Медиана [25; 75%])

| Показатели          | Контроль<br>(n=20)       | Дни эксперимента                                     |  |
|---------------------|--------------------------|--|--|
|                     |                          | 10 (n=10/10)   | 30 (n=10/10)   |
| Глюкоза,<br>ммоль/л | 5,34<br>[5,15; 5,5]      | <u>13,2 [11,96; 13,95]**</u><br>5,74 [5,38; 6,17] ## | <u>16,92 [15,14; 20,13]***</u><br>5,5 [5,25; 5,65] ### |
|                     | HbA1c, % от<br>общего Hb | 5,73<br>[5,48; 5,93]                                 | <u>13,75 [12,44; 14,7]***</u><br>6,12 [5,9; 6,73] ###  |

Примечание. В числителе – показатели в крови крыс с аллоксановым диабетом, в знаменателе – с аллоксановым диабетом на фоне введения даларгина. Достоверность различий с контролем (\*) и между группами животных «Аллоксановый диабет» и «Аллоксановый диабет на фоне введения даларгина» (#): \*, # –  $p<0,05$ ; \*\*, ## –  $p<0,01$ ; \*\*\*, ### –  $p<0,001$ . HbA1c – гликозилированный гемоглобин.

Об обмене коллагена при аллоксановом диабете авторы судили по нескольким показателям: свободный гидроксипролин, нейтральносолеорастворимая фракция коллагена,

суммарный коллаген. Свободный гидроксипролин не включается в процессы синтеза коллагена, поэтому его количество в гомогенатах печени мы рассматривали как показатель скорости катаболизма коллагеновых белков. На разных этапах развития соединительной ткани в ней образуются различные по растворимости формы коллагена. В работе авторы определяли количество нейтральносолеорастворимой фракции коллагена в качестве показателя скорости синтеза данного белка, так как именно эта фракция содержит вновь образованные молекулы, непрочно связанные с надмолекулярными элементами. Суммарный коллаген отражает общую направленность метаболических процессов и является количественной характеристикой интенсивности накопления данного белка в печени.

При введении аллоксана в гомогенатах печени к 10-му дню опыта наблюдалось увеличение нейтральносолеорастворимой фракции коллагена на 250% ( $p < 0,01$ ), а содержание суммарного коллагена – на 32,4% ( $p < 0,001$ ). К концу эксперимента количество суммарного коллагена превышало данные интактных животных уже на 50% ( $p < 0,001$ ), тогда как количество нейтральносолеорастворимой фракции коллагена достоверно не отличалось от контроля. При этом в течение всего периода эксперимента авторы не наблюдали достоверных изменений уровня свободного гидроксипролина в гомогенатах печени (табл. 2).

Таблица 2

Показатели обмена коллагена в печени крыс с аллоксановым диабетом, протекающим на фоне системного введения даларгина

(Медиана [25%; 75%])

| Показатели   | Контроль<br>(n=20)        | Дни эксперимента  |  |
|--|---------------------------|---|--|
|  |                           | 10 (n=10/10)  | 30 (n=10/10)   |
| Суммарный коллаген,<br>ммоль/кг                              | 24,4<br>[21,35;<br>25,01] | <u>32,04 [27,46; 33,56]**</u><br>33,56 [31,73;<br>33,56]*** | <u>36,61 [33,56;<br/>36,61]***</u><br>21,35 [21,35; 24,4]<br>### |
| Свободный<br>гидроксипролин, ммоль/кг                        | 0,61<br>[0,41; 0,81]      | <u>0,61 [0,61; 0,81]</u><br>1,22 [1,22; 1,22] ***<br>##     | <u>0,81 [0,61; 0,81]</u><br>1,02 [1,017; 1,62]***<br>##          |
| Нейтральносолеорастворимая<br>фракция коллагена,<br>ммоль/кг | 0,12<br>[0,12; 0,36]      | <u>0,42 [0,36; 0,48]**</u><br>0,12 [0,12; 0,12] ##          | <u>0,12 [0,12; 0,24]</u><br>0,48 [0,36; 0,61]***<br>###          |

Примечание. В числителе – показатели метаболизма коллагена в печени крыс с аллоксановым диабетом, в знаменателе – с аллоксановым диабетом на фоне введения даларгина Достоверность различий с контролем (\*) и

между группами животных «Аллоксановый диабет» и «Аллоксановый диабет на фоне введения даларгина» (#): \*, # –  $p < 0,05$ ; \*\*, ## –  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ### –  $p < 0,001$ .

Авторы предположили несколько механизмов развития подобной ситуации. Синтез компонентов межклеточного матрикса происходит в основном в звездчатых клетках печени и портальных фибробластах. При сахарном диабете, который является сильным окислительным стрессом для организма животного, происходит активация перекисного окисления мембранных молекул, нарушается целостность мембран, повышается их проницаемость, изменяются структура и функции различных ферментов, клеточных рецепторов и ионных каналов, вызывая разрушение клеток любого органа, в том числе и печени. В этих условиях звездчатые клетки печени приобретают свойства миофибробластов, в которых увеличивается синтез коллагена, снижаются активность и скорость секреции металлопротеиназ. Активация трансформации этих клеток также может быть вызвана различными фиброгенными противовоспалительными цитокинами (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6), фактором роста фибробластов, трансформирующим фактором роста, оксидом азота, которые образуются в клетках Купфера на фоне окислительного стресса. Помимо этого, накопление коллагена и последующее за этим фиброзирование печени можно связать с усилением процесса неферментативного гликирования коллагена, вызванного хронической гипергликемией, что приводит к повышению его устойчивости к действию металлопротеиназ.

При введении даларгина животным с аллоксановым диабетом авторы наблюдали достоверное снижение уровня глюкозы в крови в сравнении с группой животных «Аллоксановый диабет» к 10-му дню на 56,5% ( $p < 0,01$ ), к 30-му дню на 67,5% ( $p < 0,001$ ), а также уменьшение количества гликозилированного гемоглобина на 55,5% ( $p < 0,001$ ) и 53% ( $p < 0,001$ ) соответственно. Известно, что даларгин, являясь представителем класса опиоидных пептидов, может регулировать количество в клетках цАМФ и уровень кортизола, катехоламинов, стимулирующих процессы перекисного окисления липидов [13]. Вероятно, в результате ограничения свободно-радикальных процессов даларгин оказывает мембраностабилизирующее действие, что может частично предотвращать повреждение поджелудочной железы, вызванное аллоксаном.

В гомогенатах печени крыс к концу опыта на фоне роста уровня свободного гидроксипролина и нейтрально-растворимой фракции коллагена на 25,9% ( $p < 0,01$ ) и 300% ( $p < 0,001$ ) соответственно отмечалось снижение содержания суммарного коллагена на 41,7% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с группой крыс с аллоксановым диабетом без введения даларгина. Полученные данные свидетельствуют об активации метаболического оборота коллагена, но при этом наблюдается менее активное накопление данного белка в печени. Полученные

результаты можно объяснить с нескольких позиций. Доказано, что даларгин реализует свой эффект через опиоидные рецепторы (относятся к семейству G-белок-сопряженных рецепторов, регулирующих активность ферментов синтеза внутриклеточных мессенджеров), которые расположены на наружной поверхности цитоплазматической мембраны многих клеток. Используя этот механизм, даларгин оказывает влияние на прооксидантные и антиоксидантные внутриклеточные факторы [14]. Имеются данные, что даларгин способен регулировать активность NO-синтазы в клетках Купфера и продукцию оксида азота, обладающего прооксидантными свойствами, в результате чего снижается скорость трансформации звездчатых клеток, активно синтезирующих коллаген. Кроме того, ряд исследователей обнаружили способность даларгина снижать количество некоторых цитокинов, таких как интерлейкин-1 и интерлейкин-6 [15]. Одним из эффектов интерлейкина-6 является его способность стимулировать синтез гепатоцитами С-реактивного протеина и триглицеридов. Учитывая, что при сахарном диабете накопление триглицеридов гепатоцитами и снижение скорости выведения из них липопротеинов являются провоцирующими факторами развития стеатогепатоза и дальнейшего фиброза, можно предположить, что даларгин положительно влияет и на это патогенетическое звено, препятствуя избыточному накоплению коллагена.

**Заключение.** Полученные авторами в ходе исследования результаты свидетельствуют об интенсификации процессов накопления коллагена в печени при аллоксановом диабете, что способствует фиброзированию данного органа. Это может быть связано с усилением процесса гликозилирования коллагена и повышением его устойчивости к действию протеаз, а также трансформацией звездчатых клеток печени в миофибробласты под действием провоспалительных факторов. При введении даларгина на фоне аллоксанового диабета отмечалось менее активное накопление коллагена, обусловленное, вероятно, нормализацией баланса прооксидантных и антиоксидантных систем, что предупреждает развитие цитолитического синдрома и может способствовать восстановлению функциональной активности печени.

### Список литературы

1. Анисонян А.В., Сандлер Ю.Г., Хайменова Т.Ю., Салиев В.А., Сбикина Е.С., Винницкая. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет 2-го типа: вопросы диагностики фиброзы печени // Терапевтический архив. 2020. № 8. С. 73-78.

2. Бакулин И.Г., Сандлер Ю.Г., Винницкая Е.В., Кейян В.А., Родионова С.В., Ротин Д.Л. Сахарный диабет и неалкогольная жировая болезнь печени: грани сопряженности // Терапевтический архив. 2017. № 2. С. 59-65.
3. Циммерман Я.С. Фиброз печени: патогенез, методы диагностики, перспективы лечения // Клиническая фармакология и терапия. 2017. Т. 26. № 1. С. 54-58.
4. Фиясь А.Т., Василевская Н.Ф., Пищик Е.Ф. Фиброз печени: механизмы и методы терапии // Гепатология и гастроэнтерология. 2019. № 2. С. 127-134.
5. Забродин О.Н. К норадренергическому компоненту механизмов стресс-лимитирующего и заживляющего эффектов даларгина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2016. Т. 14. № 4. С. 61-66.
6. Гречкин В.И. Кравченко А.Я., Будневский А.В., Токмачев Р.Е. Опыт использования дискриминантного анализа для определения индивидуальной чувствительности к лечению // Прикладные информационные аспекты медицины. 2015. Т. 18. № 2. С. 34-36.
7. Самоутруева М.А., Кринцова Т.А., Сергалиева М.У., Цибизова А.А. Оценка влияния даларгина на уровень гликемии в условиях экспериментального сахарного диабета // Клиническая и экспериментальная фармакология: достижения в науке, практике, образовании: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 86-летию Курского государственного медицинского университета, 80-летию со дня рождения проф. Н.Г. Филиппенко, 80-летию со дня рождения проф. В.В.Пичугина (Курск, 29 сентября 2021 г.). Курск: КГМУ, 2021. С. 80-83.
8. Пальчикова Н.А., Кузнецова Н.В., Кузьминова О.И., Селятицкая В.Г. Гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозоциновой моделей экспериментального диабета // Бюллетень СО РАМН. 2013. Т. 33. № 6. С. 18-24.
9. Трофимова С.Р., Переведенцева С.Е., Савинова Н.В., Данилова О.В. Влияние даларгина на содержание свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в почках крыс при сахарном диабете // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. 2015. № 4. С. 54-56.
10. Шараев П.Н., Богданов Н.Г., Ямолдинов Р.Н. Об обмене коллагена в коже при различной обеспеченности организма витамином К // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1976. Т. 81. № 6. С. 665-666.
11. Камилов Ф.Х., Сельская Б.Н., Данилова О.В., Капулер О.М. Метаболизм коллагена в коже экспериментальных животных при интердермальной инъекции немодифицированного бычьего коллагена типа I // Вестник удмуртского университета. Серия биология. Науки о земле. 2017. Т. 27. № 3. С. 356-361.

12. Переведенцева С.Е., Савинова Н.В., Трофимова С.Р. Влияние даларгина на показатели обмена коллагена в тканях крыс, подвергавшихся многократным стрессорным воздействиям // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. 2022. № 2. С. 54-58.
13. Донцов А.В. Влияние даларгина на углеводный обмен больных ишемической болезнью сердца с метаболическим синдромом // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". 2016. № 1. С. 21-25.
14. Пинаева О.Г., Лебедько О.А., Пинаев С.К., Сазонова Е.Н. Влияние неонатального введения даларгина на морфометрические показатели гепатоцитов и свободнорадикальное окисление в организме белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию // Дальневосточный медицинский журнал. 2017. № 3. С. 67-70.
15. Донцов А.В. Эффективность даларгина в коррекции цитокинового профиля у больных ИБС и метаболическим синдромом // Человек и его здоровье. 2013. № 1. С. 48-51.