

УДК 612.123:612.397

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-21-27>

Содержание ламинина в сыворотке крови крыс в условиях высокожировой диеты при коррекции сулодексидом

Гилева О.Г., Бутолин Е.Г., Терещенко М.В.

Ижевская государственная медицинская академия (ИГМА)
Россия, 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

РЕЗЮМЕ

Повышенное поступление животного жира с пищей способствует накоплению липидов как в крови, так и в отдельных клеточных структурах. Излишек жиров инициирует реакции окислительного стресса, следствием которых может явиться нарушение структурной и функциональной целостности клеток, в частности гепатоцитов и эндотелиоцитов. В результате цитолитических процессов возможно высвобождение специфических ферментов печени и активация синтеза компонентов межклеточного матрикса, одним из маркеров которого является неколлагеновый гликопротеин ламинин.

Препарат «Сулодексид», обладая выраженным ангиопротекторным, гиполипидемическим, фибринолитическим действием, участвует в восстановлении ряда обменных нарушений.

Цель. Изучение содержания показателей липидного обмена, основных ферментов цитолиза гепатоцитов и ламинина в крови крыс при высокожировой диете на фоне коррекции сулодексидом.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны беспородные крысы, которых разделили на три группы – две опытных и одну контрольную. Крысам первой и второй опытных групп была назначена диета с повышенным содержанием животного жира (44% от суточной калорийности) в течение 35 сут. Крысам второй опытной группы ежедневно в течение 35 сут подкожно вводился сулодексид в дозировке 8,5 ЛЕ/кг в перерасчете на массу тела животного. Крысы всех групп с 36-х сут опыта находились на стандартном рационе вивария. Декапитацию животных и забор крови проводили на 21, 35 и 60-е сут опыта. В сыворотке крови определяли содержание основных показателей липидного обмена, специфических ферментов печени и ламинина.

Результаты. Наблюдался рост массы тела животных, увеличение содержания изучаемых показателей липидного обмена в сыворотке крови. Вероятно, затрагивалась структурная целостность гепатоцитов с вымыванием печеньспецифических ферментов в кровяное русло и повышением их содержания в крови крыс. Активировался синтез компонентов внеклеточного матрикса с возрастанием содержания в крови исследуемого неколлагенового белка – ламинина, выполняющего значительную структурную и регуляторную функцию в его организации.

Заключение. Применение сулодексида благоприятно повлияло на исследуемые метаболические нарушения, вызванные приемом пищи с повышенным содержанием жира, в том числе привело к нормализации синтеза одного из основных неколлагеновых белков межклеточного матрикса – ламинина.

Ключевые слова: высокожировая диета, липидный обмен, ферменты печени, ламинин

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 652 от 23.04.2019).

✉ Гилева Ольга Георгиевна, olgagileva1981@yandex.ru

Для цитирования: Гилева О.Г., Бутолин Е.Г., Терещенко М.В. Содержание ламинина в сыворотке крови крыс в условиях высокожировой диеты при коррекции сулодексимом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(1):21–27. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-21-27>.

Serum level of laminin in rats fed with a high-fat diet with sulodexide administration

Gileva O.G., Butolin E.G., Tereshchenko M.V.

Izhevsk State Medical Academy (ISMA)

281, Kommunarov Str., Izhevsk, 426034, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Increased consumption of animal fat with food contributes to the accumulation of lipids both in the blood and in individual cell structures. Excess fat initiates oxidative stress reactions, which may result in a violation of the structural and functional integrity of cells, in particular, hepatocytes and endotheliocytes. Cytolysis may release specific liver enzymes and activate synthesis of extracellular matrix components, one of the markers of which is a non-collagen glycoprotein laminin.

The drug sulodexide, having a pronounced angioprotective, hypolipidemic, and fibrinolytic effects, contributes to restoration of a number of metabolic disorders.

Aim. To study the content of lipid metabolism parameters, major enzymes of hepatic cytolysis, and laminin in the blood of rats fed with a high-fat diet against the background of sulodexide administration.

Materials and methods. For the study, outbred rats were selected, which were divided into three groups – two experimental groups and one control group. The rats of the first and second experimental groups were fed with a diet with a high content of animal fat (44% of the daily calorie content) for 35 days. In addition, the rats of the second experimental group were daily subcutaneously injected with sulodexide at a dose of 8.5 LRU / kg in terms of the animal's body weight for 35 days. Starting from day 36 of the experiment, the rats of the control group, as well as the rats of the two experimental groups were fed with a standard diet of the vivarium. The animals were decapitated and blood was taken on day 21, 35, and 60 of the experiment. In the blood serum, the levels of the main lipid metabolism parameters, specific liver enzymes, and laminin were determined.

Results. An increase in the body weight of animals and the level of the studied lipid metabolism parameters in the blood serum was revealed. It is likely that the structural integrity of hepatocytes was affected with the release of liver enzymes into the bloodstream and an increase in their content in the blood of rats. In addition, synthesis of extracellular matrix components was activated with an increase in the serum level of laminin, which performs important structural and regulatory functions.

Conclusion. The use of sulodexide had a favorable effect on the studied metabolic disorders caused by a high-fat diet. It resulted in the normalization of the synthesis of laminin, one of the major non-collagen proteins of the extracellular matrix.

Keywords: high-fat diet, lipid metabolism, liver enzymes, laminin

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Izhevsk State Medical Academy (Protocol No. 652 of 23.04.2019).

For citation: Gileva O.G., Butolin E.G., Tereshchenko M.V. Serum level of laminin in rats fed with a high-fat diet with sulodexide administration. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(1):21–27. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-21-27>.

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение и метаболический синдром – пандемии XXI в. Актуальность проблемы набора массы тела связана с повышенным риском развития и прогрессирования атерогенной дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний и неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП) [1]. Для НЖБП характерна «вялотекущая» воспалительная реакция в гепатоцитах, что в конечном итоге может привести к активации роста соединительной ткани и формированию фиброза печени [1].

В ряде ранее проведенных исследований показано наличие корреляции между накоплением жира в гепатоцитах и степенью фиброза печени [2]. Повышенное потребление жиров способствует увеличению поступления свободных жирных кислот (СЖК) в клетки печени, снижению скорости бета-окисления СЖК, а также повышению синтеза или секреции липопротеинов очень низкой (ЛПОНП) в печени, а затем и низкой плотности, образующихся из ЛПОНП в результате гидролиза триглицеридов под действием липопротеинлипазы, расположенной на мембране эндотелия капилляров.

Немалый вклад в процессы фиброгенеза вносит окислительный стресс как результат перекисного окисления липидов с образованием высокореактивных токсичных соединений и активации воспалительных реакций с высвобождением провоспалительных цитокинов. Формирующийся оксидативный стресс, избышек триглицеридов в гепатоцитах могут явиться причиной их цитолиза с высвобождением печенъспецифических ферментов и, как следствие, активным синтезом экстрацеллюлярного матрикса, а высокое содержание в крови триглицеридов в составе липопротеинов низкой плотности – оказывать повреждающее действие на эндотелиальные клетки. Одним из маркеров данных процессов может являться неколлагеновый белок соединительной ткани – ламинин.

Ламинины – семейство крупных гликозилированных протеинов, связывающихся друг с другом и формирующих порядка 15 гетеротримерных макромолекул. Молекулярная масса ламинина колеблется от 400 до 900 кДа. В настоящее время у млекопитающих идентифицировано 16 изоформ ламинина [3]. Ламинины являются одними из компонентов базальных мембран различных тканей, посредниками их взаимодействия с клетками. Они способствуют образованию целостной структуры между рецепторами клеток и базальной мембраны за счет их полимеризации, выступают ключевыми молекулами в образовании уникальных тканевых структур. Вместе с другими компонентами экстрацеллюлярного матрикса небелковой природы участвуют в адгезии

клеток, реконструкции тканей, а также в созревании коллагеновых волокон.

Препарат «Сулодексид» (Вессел Дуэ Ф®) – антикоагулянтное средство, оказывает антиагрегантное, антитромботическое, ангиопротекторное, гиполипидемическое и фибринолитическое действие. Активное вещество – экстракт из слизистой оболочки тонкого кишечника животных, представляет собой естественную смесь гепариноподобной фракции (80%) и дерматан-сульфата (20%) [4]. Механизм ангиопротекторного действия связан с восстановлением структурной и функциональной целостности клеток эндотелия сосудов. Нормализует реологические свойства крови путем снижения уровня триглицеридов и уменьшения вязкости крови [4].

Цель исследования – изучить содержание показателей липидного обмена, основных ферментов цитолиза гепатоцитов и ламинина в сыворотке крови крыс в условиях высокожировой диеты при коррекции сулодексидом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на белых беспородных самцах крыс с исходной массой тела 200–250 г. Работу с грызунами выполняли в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 193н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Исследование одобрено локальным этическим комитетом Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 652 от 23.04.2019).

Животные находились в клетках при 23 ± 2 °С и режиме освещения 12/12 ч, имели свободный доступ к пище и воде. Всех животных разделили на три группы – контрольную (15 крыс) и две опытные (по 15 особей). Крысы контрольной группы находились на стандартном рационе вивария. Животным двух опытных групп в течение 35 сут была назначена диета с повышенным содержанием жира: 44% свиного сала и 9% растительного масла от суточного рациона [5]. Помимо этого, крысам второй опытной группы ежедневно в течение 35 сут подкожно вводился препарат «Вессел Дуэ Ф®» в дозировке 8,5 ЛЕ/кг в перерасчете на массу тела животного [6]. С 36-х по 60-е сут все крысы находились на обычном рационе вивария. На 60-е сут оценивали изменения исследуемых показателей в отдаленный период [7].

Массу тела животных определяли до начала эксперимента и на каждом исследуемом временном отрезке. Животных выводили из опыта на 21, 35 и 60-е сут натошак путем декапитации под кратковременным эфирным наркозом. Материалом для исследований явилась кровь, взятая из шейной вены. Из

образцов крови получали сыворотку путем центрифугирования (3 000 об/мин 15 мин) для определения биохимических показателей и ламинина. На автоматическом биохимическом анализаторе AU-480 (Beckman Coulter, США) с помощью соответствующих тест-систем определяли концентрацию основных показателей липидного обмена – холестерина (ХС), липопротеинов высокой (ЛПВП) и низкой (ЛПНП) плотности, триглицеридов (ТГ), а также активность основных ферментов печени – аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Концентрацию ламинина определяли иммуноферментным методом с использованием тест-системы Laminin ELISA Kit (США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS Statistics. Описательная статистика представлена в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1; Q_3]$. Полученные данные не подчинялись закону нормального распределения, поэтому статистическую значимость различий рассчитывали по непараметрическому критерию Манна – Уитни, уровень доверительной вероятности $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Масса тела животных первой опытной группы на фоне высокожировой диеты увеличилась к 35-м сут эксперимента и продолжала возрастать к его окончанию. Масса тела животных второй опытной группы, получавших высокожировую диету с одновременной инъекцией сулодексида, статистически не отличалась от контрольных значений (табл. 1).

Таблица 1

Изменение массы тела опытных крыс относительно контроля, $n = 5$			
Условие опыта	Срок эксперимента, сут		
	21-е	35-е	60-е
Диета	15,2; $p = 0,089$	25,9; $p = 0,041$	17,6; $p = 0,039$
Коррекция	0,1; $p = 0,405$	7,4; $p = 0,076$	15,2; $p = 0,118$

После потребления корма с повышенным содержанием жира в сыворотке крови крыс первой опытной группы наблюдались изменения в липидном спектре, а именно повышение концентрации ХС на 165,3%, ЛПНП – 458,8%, ТГ – 522,5% и ЛПВП на 58,6% относительно контроля к 60-м сут опыта (табл. 2).

Таблица 2

Биохимические показатели в сыворотке крови крыс в условиях высокожировой диеты, ммоль/л, $Me [Q_1; Q_3]$

Показатель	Срок эксперимента, сут					
	21-е		35-е		60-е	
	Контроль, $n = 5$	Опыт, $n = 5$	Контроль, $n = 5$	Опыт, $n = 5$	Контроль, $n = 5$	Опыт, $n = 5$
ХС	0,78 [0,75;0,92]	1,69 [1,69;1,81] $p = 0,009$	0,85 [0,81;0,91]	1,98 [1,89;2,01] $p = 0,007$	0,89 [0,84;0,96]	2,07 [1,85;2,11] $p = 0,009$
ЛПВП	0,46 [0,41;0,47]	0,74 [0,73;0,79] $p = 0,012$	0,52 [0,50;0,59]	0,69 [0,67;0,7] $p = 0,025$	0,55 [0,51;0,59]	0,73 [0,71;0,79] $p = 0,008$
ЛПНП	0,17 [0,17;0,23]	0,46 [0,45;0,49] $p = 0,009$	0,19 [0,17;0,22]	0,56 [0,47;0,57] $p = 0,009$	0,21 [0,14;0,33]	0,95 [0,56;1,2] $p = 0,009$
ТГ	0,40 [0,4;0,47]	1,77 [1,48;2,89] $p = 0,009$	0,46 [0,41;0,57]	1,90 [1,87;1,91] $p = 0,011$	0,52 [0,49;0,56]	2,49 [1,58;2,7] $p = 0,016$

Данные изменения вполне ожидаемы с позиций процессов ассимиляции экзогенных липидов за счет их повышенного всасывания и усиленного синтеза ЛПОНП в печени, а затем и ЛПНП в сосудистом эндотелии. Избыток ТГ откладывается в виде жировых вакуолей в гепатоцитах, что приводит к формированию жировой инфильтрации печени – стеатоза [8], происходит активация процессов перекисного окисления липидов, синтез провоспалительных цитокинов и развитие окислительного стресса. Результатом данных процессов может быть цитолиз гепатоцитов, приводящий к высвобождению внутриклеточных

ферментов, таких как АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ, и накоплению их в крови. В нашем эксперименте наблюдалось статистическое значимое повышение активности АЛТ на 104,4; 184,1; 219,3% ($p < 0,05$) на 21, 35 и 60-е сут эксперимента, тенденция роста АСТ, ЩФ, ЛДГ со статистически значимым увеличением к 60-м сут опыта на 27,8; 204,7; 42,6% соответственно.

В случае персистенции повреждающего фактора наблюдается замедление процессов регенерации, замещение гепатоцитов избыточным количеством белков экстрацеллюлярного матрикса [2]. Помимо этого, излишек ТГ, ХС в результате реакции сво-

боднорадикального окисления, вероятно, оказывает деструктивное воздействие на эндотелий сосудов. Одним из маркеров протекающих патологических изменений может быть гликопротеин базальной мембраны – ламинин.

Ламинин – структурный неколлагеновый гликопротеид базальной мембраны, состоящий из трех глобулярных ветвей и одной стержневой ветви [9]. Каждая цепь ламинина состоит из нескольких доменов, на которых имеются активные центры взаимодействия с различными биологически активными веществами, такими как коллаген IV типа, фибронектин, нидоген. Нидоген занимает значимое место в структуре клеточного матрикса, ковалентно связывая коллаген и образуя с ламинином нерастворимый, нековалентно связанный комплекс. Данный комплекс фиксируется с клетками, что определяет главную функцию ламинина как адгезивного бел-

ка различных эпителиальных и мезенхимальных клеток, обеспечивающих устойчивость тканей к растяжению, и влияет на рост, морфологию, дифференцировку и их подвижность [10]. Поэтому при воздействии на клетки повреждающего фактора вероятно высвобождение компонентов внеклеточного матрикса в кровяное русло.

В ходе проведенной работы наблюдалось повышение содержания ламинина уже на 21-е сут опыта и к концу эксперимента (рис. 1).

Исследование биохимических маркеров состояния печени на фоне введения сулодексида в условиях высокожировой диеты показало, что активность основных ферментов цитолиза гепатоцитов снизилась по обозначенным точкам эксперимента, с наибольшим значением на 60-е сут по сравнению с аналогичными показателями у первой группы животных (рис. 2).

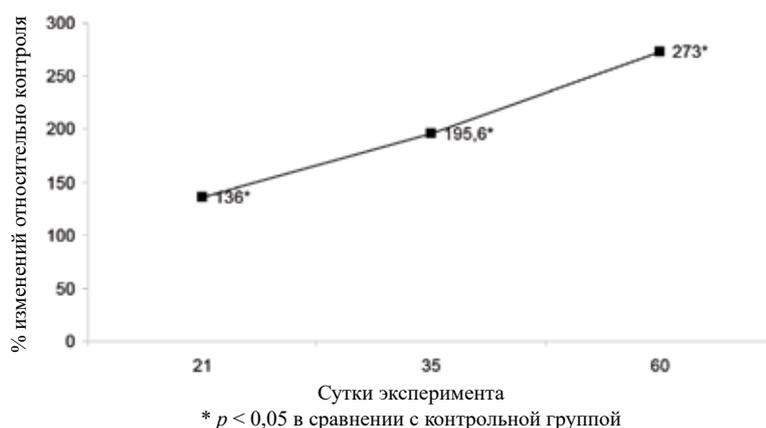


Рис. 1. Изменение концентрации ламинина на фоне высокожировой диеты относительно контроля, %



Рис. 2. Изменение активности ферментов цитолиза гепатоцитов в условиях высокожировой диеты и при коррекции сулодексидом по суткам эксперимента, %

Гепатопротективное действие препарата может быть связано в том числе с его гиполлипидемическим действием, повышением активности липопротеин-липазы, а значит, и с усиленным распадом ТГ в со-

ставе липопротеинов и, как следствие, понижением концентрации продуктов их перекисного окисления и восстановлением гепатоцитов. По результатам эксперимента после коррекции сулодексидом наблюда-

ется тенденция к снижению концентрации исследуемых показателей липидного спектра: ХС на 26%, ЛПВП – 1,4%, ЛПНП – 52%, ТГ – 26% на 21-е сут опыта. Еще большее уменьшение прослеживается на 35-е сут: ХС на 37%, ЛПВП – 30%, ЛПНП – 18%, ТГ – 64% ($p < 0,05$) с выраженным снижением к 60-м сут эксперимента (рис. 3).

Можно отметить также уменьшение разницы данных показателей на фоне коррекции сулодексидом по отношению к контрольным величинам к окончанию эксперимента (рис. 4).

Принимая во внимание ангиопротекторное действие сулодексида, связанное с восстановлением структурной и функциональной целостности клеток эндотелия сосудов, нормализации плотности отрицательного электрического заряда, уменьшением толщины базальной мембраны и продукции матрикса, можно объяснить наблюдаемое в ходе эксперимента снижение концентрации ламинина на фоне диеты после введения препарата на 26,3; 22,6 и 37,4% на 21, 35, 60-е сут соответственно (рис. 5).

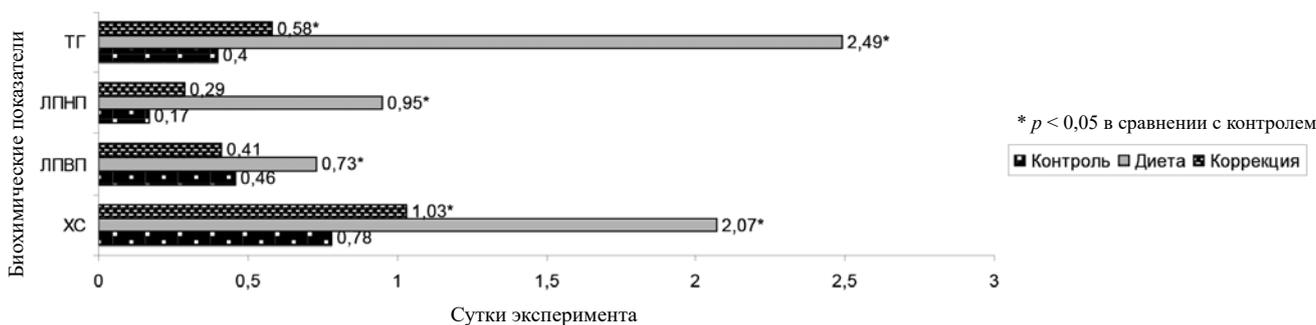


Рис. 3. Показатели липидного обмена в условиях высокожировой диеты и на фоне коррекции сулодексидом к концу эксперимента

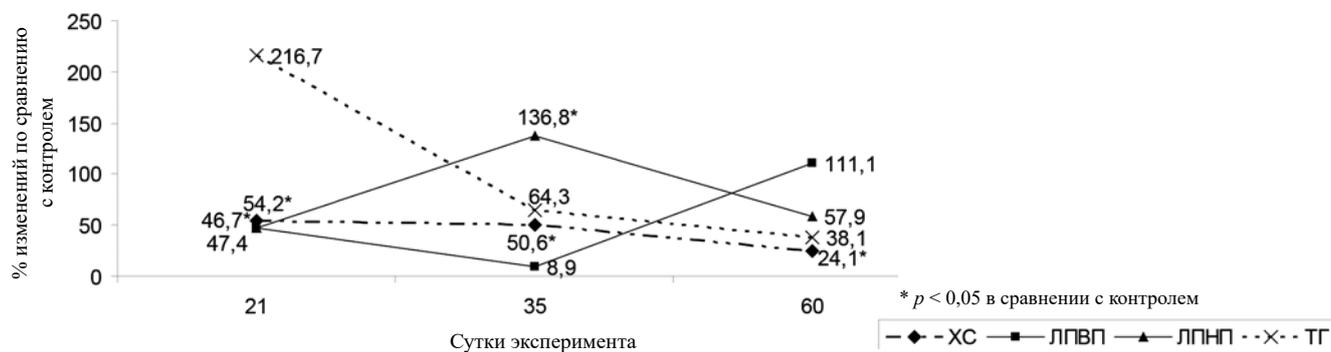


Рис. 4. Динамика липидного спектра на фоне коррекции сулодексидом относительно контроля

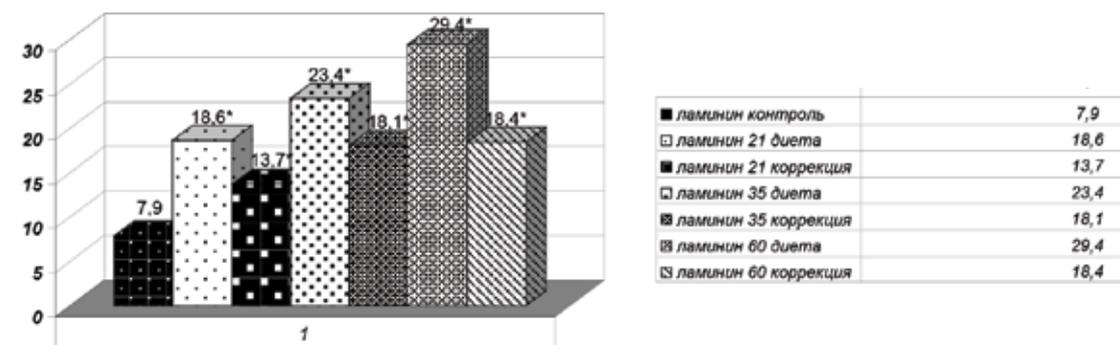


Рис. 5. Концентрация ламинина в условиях диеты и на фоне коррекции сулодексидом: ось абсцисс – срок эксперимента, сут; ось ординат – концентрация ламинина в сыворотке крови, нг/мл. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем; из-за отсутствия статистической значимости различий контрольных величин для контроля рассчитывали среднее значение для всех сроков эксперимента

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что введение сулодексида может быть целесообразным при коррекции стеатоза и фиброза печени, а также для восстановления целостности эндотелия сосудов, что характерно для диеты с повышенным содержанием жира.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что высокожировая диета приводит к изменению концентрации показателей липидного обмена в сыворотке крови крыс. Это может инициировать деструктивные процессы в мембранах клеток печени с высвобождением основных биохимических маркеров цитолиза гепатоцитов (АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ) в кровяное русло, а также эндотелиальную дисфункцию с повышением содержания ламинина в крови животных.

Исследуемый препарат «Сулодексид» обладает достаточно выраженным гиполипидемическим и ангиопротективным действием, способен снижать степень цитолиза гепатоцитов за счет активации липолиза, а также в той или иной степени, вероятно, восстанавливать структуру базальной мембраны эндотелия сосудов. Это является одним из оснований применения данного препарата в клинической практике.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Драпкина О.М., Деева Т.А. Галектин-3 – биомаркер фиброза у пациентов с метаболическим синдромом. *Российский кардиологический журнал*. 2015; 125(9): 96–102. DOI: 10.15829/1560-4071-2015-09-96-102.
2. Лазебник Л.Б., Радченко В.Г., Селиверстов П.В., Ситкин С.И., Джадхав С.Н. Современное представление о фиброзе печени и подходах к его лечению у больных неалкогольным стеатогепатитом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017;148(12):98–109.
3. Баюшин М.М., Пасечник Д.Г. Ламинины в структуре гломерулярной базальной мембраны. *Нефрология*. 2016;20(5):9–15.
4. Панюшкина Г., Минаков Э., Судаков О. Эффективность применения сулодексида при сахарном диабете типа 2. *Врач*. 2012;6:34–36.
5. Iizuka K. The role of carbohydrate response element binding protein in intestinal and hepatic fructose metabolism. *Nutrients*. 2017;9(2):181. DOI: 10.3390/nu9020181.
6. Перминова О.В. Содержание углеводсодержащих биополимеров миокарда при введении сулодексида в условиях иммобилизационного стресса. *Проблемы геронтологии и гериатрии-2006*. Материалы третьей региональной научно-практической конференции Северо-Западного федерального округа в рамках второго Международного северного социально-экономического конгресса «Культурная и природная палитра северных территорий России». Сыктывкар, 2006:89–90.
7. Kawasaki T., Igarashi K., Koeda T., Sugimoto K., Nakagawa K., Hayashi S. et al. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of Nutrition*. 2009;139(11):2067–2071. DOI: 10.3945/jn.109.105858.
8. Лазебник Л.Б., Радченко В.Г., Голованова Е.В., Звенигородская Л.А., Конев Ю.В. Неалкогольная жировая болезнь печени: клиника, диагностика, лечение. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017;138(2):22–37.
9. Tryggvason K. The laminin family. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993;5(5):877–882. DOI: 10.1016/0955-0674(93)90038-r.
10. Engvall E. Structure and function of basement membranes. *Intl. J. Dev. Biol.* 1995;39(5):780–787.

Информация об авторах

Гилева Ольга Георгиевна – аспирант, кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики, ИГМА, г. Ижевск, olgagileva1981@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0985-1878>

Бутолин Евгений Германович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики, ИГМА, г. Ижевск, butoline@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3312-4689>

Терещенко Мария Васильевна – ассистент, кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики, ИГМА, г. Ижевск, tereshenkomaria@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6701-1095>

(✉) Гилева Ольга Георгиевна, olgagileva1981@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.01.2021;
одобрена после рецензирования 13.02.2021;
принята к публикации 25.05.2021