

**ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ —
ГЛУФИМЕТА НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА СТРЕССИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ*****Н. В. Садикова, И. С. Мокроусов, И. И. Прокофьев, Д. Д. Бородин****Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ*

В результате проведенных экспериментов выявлено, что новое производное глутаминовой кислоты — глюфимет — в дозе 28,7 мг/кг и препарат сравнения фенибут в дозе 25 мг/кг в условиях длительного стрессорного воздействия ограничивают нарушения гемостаза, на что указывает снижение тромбинового времени, уровня фибриногена, степени и скорости агрегации тромбоцитов у животных, получавших исследуемые вещества. Глюфимет превосходит фенибут или сопоставим с ним по эффективности действия.

Ключевые слова: стрессорное воздействие, антиагрегантное и антикоагулянтное действие, фенибут, производные глутаминовой кислоты.

**INFLUENCE OF GLUFIMET, A NEW DERIVATIVE OF GLUTAMIC ACID,
ON THE HEMOSTATIC SYSTEM OF STRESSED ANIMALS*****N. V. Sadikova, I. S. Mokrousov, I. I. Prokofiev, D. D. Borodin***

Experiments showed that glufimet, a new derivative of glutamic acid, at a dose 28,7 mg/kg and the standard drug Phenibut at a dose of 25 mg/kg limit disturbances of hemostasis under conditions of prolonged stress exposure, which is indicated by a decrease in thrombin time, fibrinogen level, degree and aggregation rate of thrombocytes in animals receiving the studied substances. As to the effectiveness of action, Glufimet exceeds Phenibutum or is comparable to it.

Key words: stress exposure, antiplatelet and anticoagulant effect, phenibut, glutamic acid derivatives.

Ведущим патогенетическим механизмом стрессорных повреждений различных органов является нарушение системы гемостаза, причиной которого могут быть катехоламины, выделяющиеся в кровоток при воздействии стрессорных факторов и активирующие процесс свертывания крови по внешнему и внутреннему путям [12]. Увеличению коагуляционного потенциала крови способствует также тромбопластин, большое количество которого выделяется при формировании стресс-реакции. Стрессорное воздействие вызывает увеличение скорости образования фибрина, повышение активности плазменных факторов свертывания крови, концентрации фибриногена, тромбина. В настоящее время известно о существенной роли гемостазиологических сдвигов в атерогенезе, патогенезе гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и мозга [2]. В этой связи, актуальным является поиск веществ для коррекции нарушений в системе гемостаза при стрессорном воздействии. В ранее выполненных работах на кафедрах фармакологии и фармакологии и биофармации ФУВ ВолГМУ было показано выраженное антистрессорное действие производного гамма-аминомасляной кислоты — фенибута [5, 7, 11], а также его антикоагулянтное и антиагрегантное действие [6]. В настоящее время изучаются фармакологические свойства нового производного глутаминовой кислоты — глюфимета — в химической структуре которого имеется фрагмент фенибута, гамма-аминомасляной кислоты и глицина, что дало основание предположить наличие у него антикоагулянтного и антиагрегантного эффектов при стрессорном воздействии.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния нового производного глутаминовой кислоты — глюфимета на систему гемостаза животных, подвергшихся длительному стрессорному воздействию.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 40 беспородных крысах-самцах массой 250—280 г. Были сформированы 4 группы по 10 животных в каждой: 1-я группа позитивного контроля; 2-я группа негативного контроля — стрессированные животные, которым вводили физраствор (0,1 мл/на 100 г массы); 3-я и 4-я опытные группы, включающие стрессированных животных, получавших глюфимет — в дозе 28,7 мг/кг и фенибут в дозе 25 мг/кг ($n = 10$).

Стрессорное воздействие осуществлялось в специальной установке (6 изолированных отсеков одинакового объема), позволяющей производить комбинирование нескольких стрессорных раздражителей (пульсирующий свет, громкий звук и вибрация) [10]. Животные подвергались хроническому неизбежному стрессированию в течение 7 дней (ежедневно по 30 минут) со сменой разномодальных раздражителей каждые 5 мин по стохастической схеме, таким образом, чтобы каждое последующее стрессирующее воздействие было непредсказуемым для животных. Глюфимет и препарат сравнения фенибут вводились перорально 1 раз в день за 30 мин до стрессирования в течение недели.

Забор крови для исследования у всех групп животных проводился из брюшного отдела аорты. Кровь стабилизировали 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Определение показателей гемостаза осуществлялось на программируемом оптико-механическом коагулометре — Минилаб 701 с использованием наборов для определения протромбинового времени, тромбин-теста, фибриноген-теста, активированного частичного тромбопластинного времени (производство НПО РЕНАМ, Россия) [1]. Антиагрегантная активность исследовалась на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научно-производственной фирмы «Биола» (г. Москва, Россия) по методу Born G. в модификации Габбасова З. А. и соавт. (1989). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ («Renal», Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ.

Статистическую обработку результатов проводили в электронной таблице Excel 5.0 с использованием *t*-критерия Стьюдента при помощи пакета статистических программ Microsoft Excel 2006. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что у стрессированных животных контрольной группы активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) укорачивалось на 8,6 % по сравнению с показателем интактной группы животных, что свидетельствует об активации процессов коагуляции. Глуфимет практически не влиял, а фенибут даже несколько уменьшал АЧТВ по сравнению с группой негативного контроля (табл.).

Протромбиновое время (ПВ) у стрессированных самцов контрольной группы уменьшилось по сравнению с аналогичным показателем интактных животных на 15,6 %, что отражает активацию внешнего пути образования тромбина на фоне стрессорного воздействия. Введение животным исследуемого соединения глуфимета не влияло на ПВ, а препарат сравнения фенибут даже способствовал снижению показателя по сравнению с контрольной группой животных (табл.).

Об активации процессов коагуляции при стрессорном воздействии свидетельствует также укорочение

тромбинового времени, которое наблюдалось у животных группы негативного контроля ($14,4 \pm 6,5$) с по сравнению с интактными животными ($20,3 \pm 3,9$) ($p < 0,05$). Введение соединений глуфимета и фенибута стрессированным животным приводило к удлинению ТВ на 46,5 и 27,8 % соответственно, по сравнению с группой негативного контроля (табл.).

Отмечено увеличение концентрации фибриногена у животных, подвергшихся хроническому стрессорному воздействию на 27,5 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой, что свидетельствует о повышении у них свертываемости крови и риске образования тромбов (табл.). У стрессированных животных, получавших глуфимет и фенибут, концентрация фибриногена в плазме крови была ниже на 21,6 и 13,5 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с контрольной группой стрессированных животных (табл.).

Показано, что АДФ-индуцированные степень и скорость агрегации тромбоцитов у животных группы негативного контроля были на 64,2 % ($p \leq 0,05$) и 77 % ($p \leq 0,05$) соответственно выше по сравнению с таковой интактных животных. Глуфимет и фенибут снижали степень и скорость агрегации тромбоцитов на 19,4 % ($p \leq 0,05$); 28,4 % ($p \leq 0,05$); 25,7 % ($p \leq 0,05$) и 30,2 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с группой негативного контроля (табл.).

Таким образом, длительное стрессорное воздействие вызывает выраженные сдвиги в сторону гиперкоагуляции и гиперагрегации в плазменно-коагуляционном и сосудисто-тромбоцитарном звеньях гемостаза, о чем свидетельствует укорочение АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, повышение концентрации фибриногена, степени и скорости агрегации тромбоцитов у животных группы негативного контроля. Очевидно, изменения в системе гемостаза возникают и развиваются в результате увеличения концентрации адреналина при стрессорном воздействии. Адреналин, в свою очередь, связывается со специфическими мембранными рецепторами тромбоцитов и через G-белки стимулирует синтез тромбоксана A_2 [9]. Возможно также, что эффект адреналина, связанный с активацией агрегации тромбоцитов обусловлен модуляцией мембран при его взаимодействии с α -адренорецепторами и изменением ее проницаемости к ионам Ca^{2+} [13, 14].

Влияние глуфимета и фенибута на показатели гемостаза стрессированных животных

Показатели	Группы животных			
	интактная	стресс + физ р-р	стресс + глуфимет	стресс + фенибут
АЧТВ, с	$36,9 \pm 13,6$	$34,3 \pm 9,7$	$35,7 \pm 9,3$	$28,2 \pm 10,2$
ПВ, с	$31,4 \pm 11,3$	$36,3 \pm 16,9$	$33,2 \pm 11,6$	$25,4 \pm 11,0$
ТВ, с	$20,3 \pm 3,9$	$14,4 \pm 6,5^*$	$21,1 \pm 4,2^\#$	$18,4 \pm 7,0$
Фибриноген, г/л	$2,9 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,3^*$	$2,9 \pm 0,8^\#$	$3,2 \pm 0,6^\#$
Степень агрегации, %	$17,3 \pm 6,0$	$28,4 \pm 6,4^*$	$22,9 \pm 3,6^\#$	$21,1 \pm 7,9^\#$
Скорость агрегации, %/мин	$22,2 \pm 10,5$	$39,3 \pm 10,3^*$	$28,1 \pm 8,7^\#$	$27,4 \pm 8,4^\#$

*Достоверно по *t*-критерию Стьюдента относительно интактной группы животных при $p \leq 0,05$;

^\#достоверно по *t*-критерию Стьюдента относительно группы стрессированных животных при $p \leq 0,05$.

Кроме того, адреналин способствует освобождению из стенок сосуда факторов образования протромбиназы, способен активировать фактор XII в плазме, усиливает расщепление жиров и жирных кислот, которые поступают в кровь и имеют протромбиназную активность [3]. Нельзя исключить возможное негативное влияние стресса на вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия, что также может лежать в основе повышения агрегации и свертываемости крови животных, подвергшихся стрессорному воздействию.

Исследуемые соединения — глуфимет и фенибут — ограничивают процессы гиперкоагуляции (особенно выражено на конечном этапе свертывания крови) и гиперагрегации тромбоцитов, о чем свидетельствует снижение ТВ и концентрации фибриногена, а также степени и скорости агрегации тромбоцитов у стрессированных животных, получавших вещества, по сравнению с группой негативного контроля. Вероятно, это связано с симпатингибирующим и противострессорным действием фенибута, показанном в ряде работ [7, 8, 11]. Вероятно, эти эффекты способствуют ограничению повреждающего действия стресса на эндотелий, способствуют нормализации его вазодилатирующей и антитромботической функции. Что касается глуфимета, он содержит в своей структуре фрагмент, сходный с фенибутом, чем, возможно, объясняется его антикоагулянтное и антиагрегантное действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При длительном стрессорном воздействии наблюдаются процессы гиперкоагуляции и гиперагрегации крови, что проявляется в укорочении АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, увеличении концентрации фибриногена, степени и скорости агрегации тромбоцитов.

Производное глутаминовой кислоты — глуфимет и препарат сравнения фенибут ограничивают нарушения гемостаза, на что указывает снижение тромбинового времени, уровня фибриногена, степени и скорости агрегации тромбоцитов у животных, получавших исследуемые вещества. Глуфимет превосходит фенибут или сопоставим с ним по эффективности действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габбасов З. А., Попов Е. Г., Гаврилов И. Ю. и др. // Лабораторное дело. — 1989. — № 10. — С. 15—18.
2. Гальченко О. Е., Бабаева А. Р. // Вестник ВолГМУ. — 2007. — № 4 (24). — С. 53—56.
3. Долгов В. В., Свиринов П. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. — М.-Тверь: Триада, 2005. — 227 с.
4. Кардиоваскулярные и кардиопротекторные свойства ГАМК и ее аналогов: монография / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова. — Волгоград: Изд-во ВолГМУ. — 2008. — 204 с.
5. Ковалев Г. В., Гурбанов К. Г., Тюренков И. Н. // Фармакология и токсикология. — 1983. — Т. 46, № 3. — С. 41—44.
6. Ледяев М. Я. Влияние новых соединений — производных гамма-аминомасляной кислоты на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1986. — 24 с.
7. Перфилова В. Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Волгоград, 2009. — 48 с.
8. Перфилова В. Н., Тюренков И. Н. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 21—26.
9. Самаль А. Б., Черенкевич С. И., Хмара Н. Ф. // Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. — М.: Университетское, 1990. — 104 с.
10. Тюренков И. Н., Багметова В. В., Чернышева Ю. В. и др. // РФЖ им. И. М. Сеченова. — 2013. — Т. 99, № 9. — С. 1045—1056.
11. Тюренков И. Н., Перфилова В. Н. Кардиоваскулярные и кардиопротекторные свойства ГАМК и ее аналогов: монография. — Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2008. — 204 с.
12. Шахматов И. И., Киселев В. И. // Казанский медицинский журнал. — 2010. — Т. 91, № 4. — С. 464—467.
13. Rao G. H., White J. C. // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255, № 8. — P. 355—366.
14. Smith S. K., Limbird L. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78, № 7. — P. 4026—4030.

Контактная информация

Мокроусов Иван Сергеевич — аспирант кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: tay-pin@mail.ru