



© И. Н. Тюренков, Л. Б. Иванова,
В. И. Карамышева, С. А. Лебедева

Коррекция нарушений гемостаза у самок с экспериментальным гестозом с помощью производных ГАМК

ВолгГМУ, г. Волгоград

УДК: 618.3-008.6:616.151.4/55-092.9

■ Показано, что в условиях экспериментального гестоза, вызванного заменой питьевой воды на 1,8 % NaCl у крыс с первого дня гестации до родов, наблюдаются нарушения коагуляционных свойств и увеличение тромбогенного потенциала крови, о чем свидетельствует укорочение АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, повышение уровня фибриногена, гиперагрегация тромбоцитов. Производные ГАМК — соединения РГПУ-147, РГПУ-189 и препарат сравнения сулодексид проявляют антикоагулянтную и антиагрегантную активность в условиях экспериментального гестоза, удлиняя АЧТВ, тромбиновое и протромбиновое время, снижая уровень фибриногена, уменьшая агрегацию тромбоцитов.

■ **Ключевые слова:** гестоз; производные ГАМК; гиперагрегация тромбоцитов; гемостаз.

Гестоз — это довольно частое осложнение беременности (12–40% случаев), возникающее и развивающееся при остром повреждении эндотелия сосудов и мембран эритроцитов и тромбоцитов, вследствие чего нарушаются реологические и коагуляционные свойства крови, увеличивается ее тромбогенная активность [1, 8, 12, 14, 15].

Применяющиеся в настоящий момент в клинике антикоагулянты и антиагреганты обладают рядом неблагоприятных побочных действий и, в некоторых случаях, недостаточной эффективностью [1]. Поэтому поиск веществ с антикоагулянтной и антиагрегантной активностью для лечения нарушений в системе гемостаза при осложненной беременности остается актуальным.

Известно, что производные гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) снижают агрегацию эритроцитов и тромбоцитов, ограничивают гиперкоагуляцию плазмы, улучшают реологию и микроциркуляцию крови [5, 8, 6, 13].

В этой связи целью данного исследования явилось изучение влияния производных ГАМК на показатели гемостаза при экспериментальном гестозе.

Материалы и методы

Существует несколько моделей воспроизведения экспериментального гестоза (ЭГ) у животных: путем коарктации аорты, введением ДОСА (дезоксикортикостерона) и 0,9% солевого раствора, использованием ингибитора NO-синтазы нитро-L-аргинина, заменой питьевой воды на 1,8% NaCl и др. [9, 18, 19, 17, 16, 20]. По данным литературы, при использовании этих моделей наблюдаются эффекты, сходные с развитием гестоза: гипертензия, протеинурия, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, снижение маточно-плацентарного кровотока, эндотелиальная дисфункция, гиперкоагуляция, нарушения баланса гормонов фето-плацентарного комплекса, задержка внутриутробного развития плодов и др. Нами была выбрана легко воспроизводимая модель экспериментального гестоза — замена питьевой воды на 1,8% р-р NaCl у беременных самок с 1-го дня гестации и до родов [9, 18, 19].

Эксперименты проведены на беременных беспородных крысах-самках массой 220–250 г. Первый день гестации определялся по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке.

Развитие осложнения беременности определялось триадой симптомов, характерных для гестоза: повышение артериального давления (АД), протеинурия, выраженность отеочного синдрома.

Измерение артериального давления проводилось у бодрствующих беременных крыс в первый и последний дни гестации с использованием компьютерной системы Power Lab/4SP с ML135 Dual Bio и MLA0112 ECG Lead Switch Box. Для измерения АД самка помещалась в домик, на хвост одевался манжет и датчик, после чего производилось измерение.

Определение концентрации белка в суточной моче осуществлялось фотометрически (спектрофотометр ПЭ –5400 В («Экрос» Россия)) по реакции с пирогаллоловым красным (набор реагентов «Ольвекс диагностикум», Россия) до и на 20-й день беременности. Для сбора мочи беременные самки помещались в метаболические камеры («Евролаб», Россия). Результаты концентрации белка рассчитывались согласно формуле: $C = C_{\text{станд}} \cdot D_{\text{образец}} / D_{\text{станд}}$, где $C_{\text{станд}}$ — концентрация белка в калибровочном растворе, $D_{\text{станд}}$ и $D_{\text{образец}}$ — оптическая плотность стандартной и опытной проб на длине волны 600 нм, полученный результат умножался на суточный диурез животного.

Для определения наличия отечного синдрома у декапитированных животных забирались кусочки жировой, мышечной тканей и мозга, инкубировались в термостате при $t = 37^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, по разнице массы препаратов до и после инкубации судили о степени выраженности отеков.

Изучено влияние производных ГАМК — соединений под лабораторными шифрами РГПУ-189 в дозе 15 мг/кг ($n = 6$), РГПУ-147–50 мг/кг ($n = 6$) и препарата сравнения сулодексида — 30 МЕ/кг ($n = 6$) на показатели гемостаза в условиях экспериментального гестоза (ЭГ). Исследуемые вещества вводились перорально, один раз в сутки ежедневно с 1 до 20 дня гестации. Группой позитивного контроля служили беременные самки, принимавшие обычную воду ($n = 6$), в группу негативного контроля входили беременные самки с экспериментальным гестозом ($n = 7$), получавшие физ. р-р в аналогичном с опытными группами режиме.

Забор крови для исследования гемостаза проводился из брюшного отдела аорты беременных крыс с экспериментальным гестозом на 20-й день гестации. Кровь стабилизировали 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Определение показателей осуществлялось на программируемом оптико-механическом коагулометре — Минилаб 701 с использованием наборов для определения протромбинового времени, тромбин-теста, фибриноген-теста, активированного частичного тромбопластинового времени (производство НПО РЕНАМ, Россия) [2]. 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) [10]. 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, q-критерия Ньюмена-Кейлса

при помощи пакета статистических программ Microsoft Excel 2006. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

У самок, получавших во время беременности обычную воду, артериальное давление к 20-му дню гестации не изменялось, концентрация белка в моче увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с исходными показателями. Масса препаратов мозга, мышц и сальника снижалась после инкубации при 37°C в течение 24 часов на 69,7; 73,8 и 17% соответственно (табл. 1).

В группе самок, принимавших во время беременности вместо питьевой воды 1,8% р-р NaCl, на 20-й день гестации наблюдалось повышение АД на 18,2%, увеличение концентрации белка в моче в 6,2 раза по сравнению с исходными данными, уменьшение массы препаратов мозга, мышц и сальника на 74,6; 76,3; 25,3% соответственно (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о выраженном повышении АД, белка в моче и отека тканей, что указывает на развитие экспериментального гестоза у животных этой группы, что согласуется с литературными данными [9, 18].

Самки, получавшие во время беременности вместо питьевой воды 1,8% р-р NaCl и производные ГАМК — соединения РГПУ-147 и РГПУ-189, а также препарат сравнения сулодексида перорально, один раз в день ежедневно уменьшали выраженность экспериментального гестоза, о чем свидетельствует отсутствие изменений АД, снижение концентрации белка в моче и отеков у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой с ЭГ (табл. 1).

Исследование гемостаза показало, что в контрольной группе животных с осложненной беременностью наблюдается укорочение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на 14,6% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем группы беременных самок без ЭГ (табл. 2), что свидетельствует об активации процессов свертывания крови.

АЧТВ у животных с ЭГ, получавших во время гестации соединения РГПУ-189, РГПУ-147 и сулодексида, увеличилось на 24,1; 20,3; 59,5% ($p \leq 0,05$) соответственно, по сравнению с группой позитивного контроля, что позволяет предположить наличие у них антикоагулянтных свойств (табл. 2).

Протромбиновое время (ПВ) у самок с осложненной беременностью уменьшилось по сравнению с аналогичным показателем животных группы позитивного контроля на 15,3% ($p \leq 0,05$), что отражает активацию внешнего пути образования тромбина на фоне моделируемой патологии. Введение животным с ЭГ соединения РГПУ-189 повышало ПВ на 32,2%,

Таблица 1

Влияние производных ГАМК на проявления экспериментального гестоза: артериальное давление, концентрацию белка в моче и выраженность отечного синдрома у беременных крыс

Исследуемые группы	Регистрируемый показатель				
	АД систолическое, мм рт. ст. (в скобках % прироста относительно исходных данных)		Концентрация белка в моче, г/л		Отеки (снижение массы препарата в % относительно исходных данных)
	До беременности	20-й день гестации	До беременности	20-й день гестации	
Беременные самки без ЭГ	113,8±11,4	114,7±10,7	0,005±0,002	0,007±0,003	мозг -69,7±5,4 мышцы -73,8±4,1 сальник -16,9±6,0
Самки с ЭГ+физ р-р	110,7±12,4	130,3±12,5* (18,2 %)	0,004±0,002	0,025±0,02*	мозг -74,6±5,4 мышцы -76,3±4,1 сальник -25,3±8,1*
Самки с ЭГ+РГПУ-147	110,6±6,1	114,5±5,7** (3,4 %)	0,006±0,002	0,020±0,01	мозг -73,8±8,8 мышцы -73,3±4,5 сальник -22,9±13,1
Самки с ЭГ+РГПУ-189	112,4±11,2	114,6±10,4** (2 %)	0,005±0,003	0,015±0,01**	мозг -67±12,6 мышцы -73±4,2 сальник -18,1±4,2**
Самки с ЭГ+сулодексид	111,1±11,7	112,3±10,9** (1,1 %)	0,004±0,002	0,019±0,02	мозг -68,3±2,9 мышцы -74,7±2,9 сальник -25,0±6,1

* — данные статистически достоверны по t-критерию Стьюдента, q-критерию Ньюмена-Кейлса при $p \leq 0,05$ по сравнению с беременными самками без ЭГ; ** — данные статистически достоверны по t-критерию Стьюдента, q-критерию Ньюмена-Кейлса при $p \leq 0,05$ по сравнению с беременными самками без ЭГ

РГПУ-147 — на 49,3 % ($p \leq 0,05$), сулодексида — 40,2 на % ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

О преобладании процессов гиперкоагуляции при ЭГ свидетельствует также укорочение тромбинового времени, которое наблюдалось у животных группы негативного контроля (13,5±4,02 сек) по сравнению с самками с неосложненной беременностью (21,8±4,4) ($p < 0,05$). Введение соединений РГПУ-147, РГПУ-189 и препарата сравнения сулодексида беременным самкам с ЭГ, приводило к удлинению ТВ на 30,1; 17,1; 52,4% соответственно, по сравнению с группой негативного контроля (табл. 2).

По результатам проведенного исследования в группе животных с осложненной беременностью наблюдается увеличение концентрации фибриногена на 20,2% ($p \leq 0,05$) по сравнению с животны-

ми без ЭГ, что свидетельствует о повышении свертываемости крови и риске образования тромбов в группе негативного контроля (табл. 2).

У животных, получавших соединения РГПУ-189, РГПУ-147 и препарат сравнения сулодексид концентрация фибриногена в плазме крови была снижена на 18,5; 16,7; 19,1% ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с группой животных с ЭГ (табл. 2).

Изучение агрегационной активности тромбоцитов показало, что индуцированная АДФ скорость их агрегации у беременных самок с экспериментальным гестозом была выше на 41,4% ($p \leq 0,05$) по сравнению с таковыми без ЭГ. Все исследуемые вещества снижали скорость агрегации тромбоцитов: РГПУ-147 — на 14, 5%, РГПУ-189 — на 41,7% ($p \leq 0,05$), сулодексид — на 42,8% ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Изменения показателей гемостаза самок с ЭГ под влиянием производных ГАМК

Показатели	Самки без ЭГ	Самки с ЭГ+физ. р-р	ЭГ+ РГПУ147	ЭГ+ РГПУ189	ЭГ+ сулодексид
АЧТВ, с	15,4±1,7	13,2±1,0*	15,8±4,0	16,4±4,8	21,0±4,0#
ПВ, с	13,9±1,18	11,7±1,3*	17,6±5,7#	15,6±5,1	16,5±4,1#
ТВ, с	21,8±4,5	12,9±3,1*	16,8±5,2#	15,1±2,1	19,7±2,4#
Фибриноген, г/л	2,7±0,3	3,22±0,3*	2,7±0,5#	2,6±0,3#	2,6±0,35#
Скорость агрегации тромбоцитов, ус. ед.	22,5±3,9	31,8±3,5*	27,2±4,1	18,5±4,3#	18,2±3,6#

* данные достоверны относительно беременных самок без ЭГ по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$
данные достоверны относительно контрольной группы животных по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

Таким образом, замена питьевой воды на 1,8% р-р NaCl с первого дня гестации до родов вызывает развитие ЭГ, на что указывает наличие триады симптомов: гипертензия, протеинурия, отеки. Кроме того, в другой серии экспериментов нами были зафиксированы случаи неразвивающейся беременности, мертворожденного потомства, гибели самок с ЭГ в период гестации и после родов [11].

Выявлено, что ЭГ 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 и скорости агрегации тромбоцитов.

Производные ГАМК — соединения РГПУ-147, РГПУ-189 и препарат сравнения сулодексид ограничивают проявления ЭГ на что указывает отсутствие изменений АД за период гестации, в меньшей степени выраженные протеинурия и отеки по сравнению с контрольной группой самок с ЭГ, снижение числа случаев мертворождения, неразвивающейся беременности, гибели самок во время беременности и в послеродовом периоде [3, 11]. Исследуемые соединения снижают повышенный коагуляционный и тромбогенный потенциал крови животных с ЭГ, что проявляется в увеличении АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, снижении концентрации фибриногена и уменьшении скорости агрегации тромбоцитов в группах животных, получавших вещества.

В настоящее время одним из ключевых факторов, лежащих в основе патогенеза гестоза, является дисфункция эндотелия сосудов. В норме эндотелий обладает высокой антиагрегантной, антикоагуляционной и фибринолитической активностью, обусловленной синтезом дезагрегантов и антикоагулянтов (простациклина, оксида азота, антитромбина III и активаторов плазминогена). Очевидно, при ЭГ в результате нарушения функции эндотелия равновесие между его анти- и прокоагулянтными влияниями сдвигается в сторону последних, что приводит к возникновению и развитию изменений в системе гемостаза [1].

Нормализующее действие производных ГАМК на проявления гестоза связано, вероятно, с их эндотелиопротективной активностью, что показано в ряде работ и проявляется в улучшении эндотелий-зависимой вазодилатации, повышении стабильности и мощности функционирования системы синтеза NO, снижении сопротивления и увеличении эластичности сосудов при различных экспериментальных патологиях [4, 13]. В этих же исследованиях выявлено повышение под действием РГПУ-147 и РГПУ-189 АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, снижение концентрации фибриноге-

на, что свидетельствует об их антикоагулянтной активности. Ранее получены доказательства наличия у производных ГАМК прямого и опосредованного антиагрегантного действия, связанного, вероятно, с изменением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах посредством ингибирования кальмодулина [7] и с индукцией синтеза в эндотелиоцитах дезагрегантов [4, 5, 13].

Выводы

При экспериментальном гестозе наблюдается повышение коагуляционного и тромбогенного потенциала крови, что проявляется в укорочении АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, увеличении концентрации фибриногена и скорости агрегации тромбоцитов,

Производные ГАМК — соединения РГПУ-147 и РГПУ-189 в значительной степени предупреждают нарушения гемостаза у животных, получавших производные ГАМК и препарат сравнения сулодексид, о чем свидетельствует увеличение АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени, снижение уровня фибриногена и уменьшение скорости агрегации тромбоцитов. По эффективности исследуемые соединения сопоставимы с препаратом сравнения сулодексидом.

Литература

1. Баев О.Р., Чурганова А.А. Профилактика и лечение нарушений в системе гемостаза при гестозе // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2008. — № 5. — С. 59–67
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед, 2008. — 292 с.
3. Влияние соединений РГПУ-147 на микроциркуляцию в условиях хронической алкогольной интоксикации / Перфилова В.Н. [и др.] // Региональное кровообращение и микроциркуляция. — 2006. — № 2, (18). — С. 78–81
4. Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: автореф. дис... д-ра. мед. наук. — Волгоград, 2011. — 46 с
5. Едигарова Л.В., Аюбян В.П. Антиагрегантная активность сосудистой стенки и возможность ее коррекции ГАМК-ергическими средствами в условиях гипокинезии // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2000. — № 5. — С. 41–43
6. Изменения функционирования системы микроциркуляции под влиянием нового производного ГАМК — соединения РГПУ-147 при хроническом стрессорном воздействии / Перфилова В.Н. [и др.] // Региональное кровообращение и микроциркуляция. — 2007. — № 4. — С. 64–67
7. Ледяев М.Я. Влияние новых соединений — производных гамма-аминомасляной кислоты на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови: автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 1986. — 23 с.
8. Мурашко А.В., Кумыкова З.Х. Роль антиагрегантов в акушерской практике // Consilium Medicum. — 2006. — Т. 8, № 6. — С. 12–16.

9. Нарушение в системе легкое-плацента в условиях экспериментального гестоза у крыс / Мясникова В.В. [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — Т. 140, № 7. — С. 24–27
10. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / Габбасов З.А. [и др.] // Лабораторное дело. — 1989. — № 10. — С. 15–18
11. *Перфилова В.Н., Иванова Л.Б.* Влияние производных ГАМК на родоразрешение крыс с экспериментальным гестозом // Всероссийская научно-практическая конференция «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты». — Саратов, 2011. — С. 227–229
12. Прогностические критерии тяжести течения гестоза / Сидорова И.С. [и др.] // Проблемы беременности. — 2007. — № 17. — С. 49–54.
13. *Робертус А.И., Воронков А.В.* Оценка взаимосвязи между уровнем фибриногена и скоростью тромбообразования у животных с недостаточностью половых гормонов на фоне введения производного ГАМК РГПУ-189 // Актуальные вопросы фармакологии и фармации: сборник трудов межвузовской научной конференции, посвященной памяти профессора Владислава Васильевича Пичугина и 75-летию КГМУ. — Курск, 2009. — С. 308–309.
14. *Сидорова И.С., Галинова И.Л.* Эндотелиальная дисфункция в развитии гестоза // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2006. — № 1. — С. 75–81.
15. *Стрижаков А.Н., Макацария А.Д., Игнатко И.В.* Система гемостаза у беременных с гестозом и плацентарной недостаточностью // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2007. — № 3. — С. 5–12.
16. Beneficial Effects of Metolazone in a Rat Model of Preeclampsia / Pridjian G. [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Therapeutics. — 2006. — Vol. 318, N 3. — P. 1027–1032
17. *Henzel M., Alsip N.* Systemic vascular reactivity in an aortic coarctation model of preeclampsia in the rat // Pathophysiology. — 2001. — Vol. 8, N 2. — P. 133–140
18. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat / Beausejour A. [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2003. — Vol. 285. — P. 375–383
19. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K — ATP-ase inhibition and lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension / Fedorova O.V. [et al.] // J. Hypertens. — 2008. — Vol. 26, N 12. — P. 2414–2425
20. Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones / Buhimschi I. [et al.] // Human Reproduction. — 1995. — Vol. 10, N10. — P. 2723–2730.

Статья представлена Константиновой Н. Н., ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

CHANGE OF INDICATORS OF A HEMOSTASIS AT FEMALES WITH EXPERIMENTAL GESTOSIS UNDER THE INFLUENCE OF GABA DERIVATIVES

Tyurenkov I. N., Ivanova L. B., Karamysheva V. I., Lebedeva S. A.

■ **Summary:** It is shown that in the conditions of experimental gestosis, induced by replacing drinking water of 1.8% sodium chloride at rats from the first day of gestation until birth, observes disturbances of coagulative properties and augmentation of thrombogenic potential of a blood to what shorting APTT, prothrombin and thrombin time, rising of level of a fibrinogen, hyperaggregation of thrombocytes testifies. GABA-derivative compounds WPC-147, WPC-189 and comparator drug sulodexide show anticoagulant and antiplatelet activity in the conditions of experimental gestosis, extending APTT, thrombin and a prothrombin time, reducing fibrinogen level, reducing platelet aggregation.

■ **Key words:** gestosis; GABA-derivative; hyperaggregation of thrombocytes; haemostasis.

■ Адреса авторов для переписки

Тюренков Иван Николаевич — д. м. н., проф, зав. каф. фармакологии и биофармации ФУВ, ВолгГМУ, Волгоград, ул. Пугачевская 3, 400066. **E-mail:** fibfuv@mail.ru.

Иванова Людмила Борисовна — асс. кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, ВолгГМУ, г. Волгоград, ул. Пугачевская 3, 400066. **E-mail:** lusi_662_@list.ru.

Карамышева Виктория Игоревна — соискатель кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, ВолгГМУ, г. Волгоград, ул. Пугачевская 3, 400066. **E-mail:** vikulenska86@mail.ru.

Лебедева Светлана Александровна — к. б. н., м. н. с. НИИ фармакологии, ВолгГМУ, г. Волгоград, ул. Пугачевская, 3, 400066

Tyurenkov Ivan N. — Sec. Doctorate Degree, Full Professor, Head of Pharmacology and Biopharmacy Department Volgograd State Medical University, Volgograd, street Pugachevsky 3. **E-mail:** fibfuv@mail.ru.

Ivanova Ludmila B. — Assistant Professor of Pharmacology and Biopharmacy Department Volgograd State Medical University, Volgograd, street Pugachevsky 3. **E-mail:** lusi_662_@list.ru.

Karamysheva Victorija I. — Junior Scientist Researcher of Pharmacology Research Institute, Volgograd State Medical University, Volgograd, street Pugachevsky 3. **E-mail:** vikulenska86@mail.ru.

Lebedeva Svetlana A. — Ph.D., Junior Scientist Researcher of Pharmacology Research Institute, Volgograd State Medical University, Volgograd, street Pugachevsky 3,