

УДК 577.171.55

DOI:10.54503/0514-7484-2023-63.3-64

Влияние антидиабетического аминокислотного комплекса на некоторые параметры плазменного гемостаза

**З.Х. Паронян, Л.Н. Аракелян, Л.С. Григорян, Р.С. Хачатрян,
А.З. Галстян, А.А. Степанян**

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: аминокислотный комплекс (АК комплекс), гемостаз, прямые и непрямые антикоагулянты, ЭОС, ГАМК, β -аланин, глутамин

Ранее нами было исследовано влияние АК комплекса, представляющего собой смесь ГАМК (γ -аминомасляная кислота), β -аланина, ЭОС (этаноламин – О – сульфат) и глутамина в соотношении 1:1:2:2, на уровень глюкозы в крови у животных с экспериментальным аллоксановым диабетом. Полученные данные позволили убедиться, что он регулирует уровень глюкозы в крови [4]. Основным компонентом АК комплекса является ГАМК, которая оказывает положительное влияние на β -клетки поджелудочной железы, стимулируя клеточную пролиферацию и антиапоптоз, снижает уровень глюкозы в крови, увеличивая скорость ее выделения у животных при индуцированном диабете [8,9]. Остальные компоненты АК комплекса, учитывая их особенности при обмене веществ в организме, поддерживают синтез и активность ГАМК [4]. Применение данного комплекса показало, что, кроме подавления гипергликемического действия аллоксана, происходят значительные изменения некоторых факторов плазмы крови, повышение уровня антикоагулянтов и их активация, уменьшение уровня фибриногена, стимуляция активаторов фибринолиза, улучшение реологии и микроциркуляции крови [1,4].

В данной работе представлены результаты исследования влияния указанного антидиабетического аминокислотного комплекса на некоторые параметры плазменного гемостаза у интактных животных.

Материал и методы

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180 – 200г, содержащихся на обычном рационе вивария. Эксперименты проведены в соответствии с этическими принципами, рекомендо-

ванными Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986г.). Животные были разделены на две группы: особи первой группы получали внутривенные инъекции 0,85% раствора NaCl и служили контролем, животные второй группы получали АК комплекс, введенный в яремную вену в дозах 5, 10 и 15мг/100г массы тела. Кровь для исследования брали из той же вены с антикоагулянтом (3,8% цитрат натрия) в соотношении 9:1 через 30, 60 и 90 мин после введения АК комплекса. Определяли следующие показатели свертываемости крови: общая свертываемость крови и рекальцификация плазмы [2,7], активность факторов протромбинового комплекса (протромбиновое время, международное нормализованное отношение – МНО), уровень фибриногена [3].

В опытах использовали стандартные аминокислоты Sigma Chemical Company (USA), тромбопластин с МИЧ (международный индекс чувствительности) = 1,5 фирмы Delta THR-stb (Армения).

Сравнение контрольных и опытных независимых выборок производили по непараметрическому критерию Манн-Уитни U. Данные представлены как $mean \pm SEM$. Различия между выборками считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В организме кровь постоянно находится в жидком состоянии, что способствует оптимальному снабжению всех органов и тканей кислородом и питательными веществами. Жидкое состояние крови обеспечивается динамическим взаимодействием прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических реакций. Результатом этих взаимодействий является свертываемость цельной крови, позволяющая оценить состояние крови в целом. Исследования изменения этого показателя под действием АК комплекса были проведены на интактных белых крысах в условиях *in vivo*. Как видно из рис.1, при дозе 5мкг/100г общее время свертывания крови за 30 мин почти не изменяется, а при дозах 10мкг/100г и 15мкг/100г удлиняется на 15% и 48 % соответственно. За 60 минут свертываемость крови значительно удлиняется, и если при дозе 10мкг/100г она достигает 80%, то при 15мкг/100г достигает 120%, то есть происходит выраженное снижение свертываемости крови.

Метод определения времени рекальцификации плазмы дает информацию об активности всей свертывающей системы крови и коррелирует со временем общего свертывания, что особенно заметно через 60 минут после внутривенного введения всех трех доз АК комплекса (рис. 2).

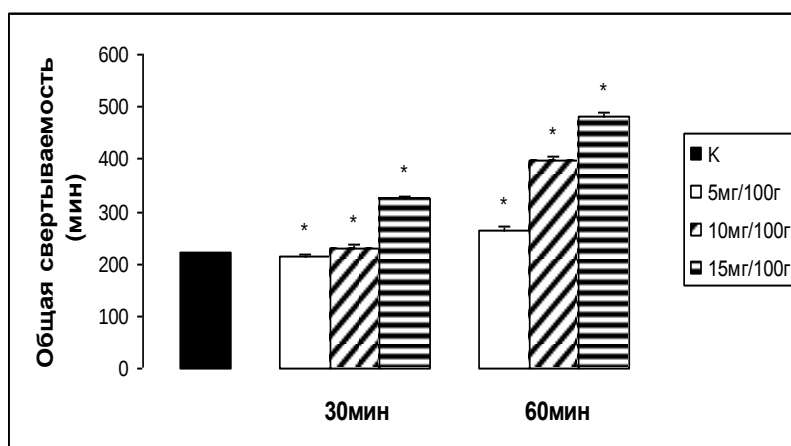


Рис.1. Изменение общей свертываемости крови intactных крыс под действием АК комплекса,
*достоверные различия между контролем и опытом ($p \leq 0,05$), ($n=6$)

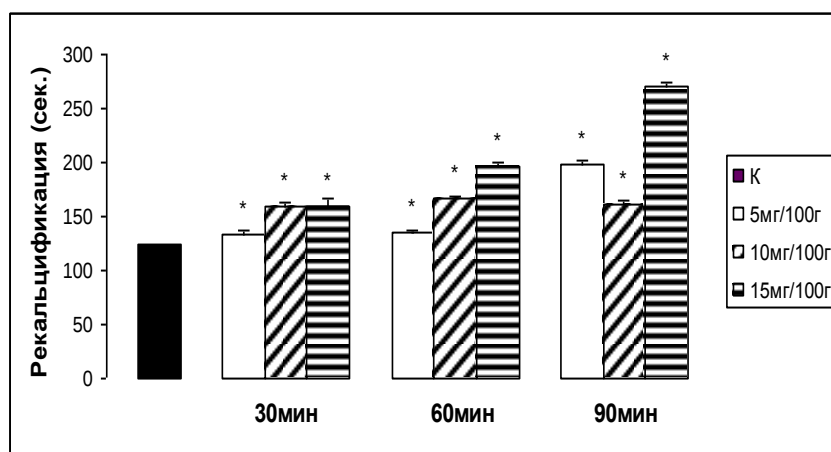


Рис.2. Изменение времени рекальцификации плазмы крови intactных крыс под действием трех доз АК комплекса,
*достоверные различия между контролем и опытом ($p \leq 0,05$), ($n=6$)

Одним из важнейших лабораторных показателей, характеризующих состояние свертывающей системы крови, является протромбиновое время (ПВ), при помощи которого оценивается активность внешнего пути свертывания крови и дефицит факторов протромбинового комплекса (факторы II, X, VII, V). Именно на стадии образования протромбинового комплекса и, следовательно, активного тромбина наблюдается наибольшая активность АК комплекса: протромбиновое время по сравнению с контролем дозозависимо удлиняется от 2 до 4 раз (рис.3).

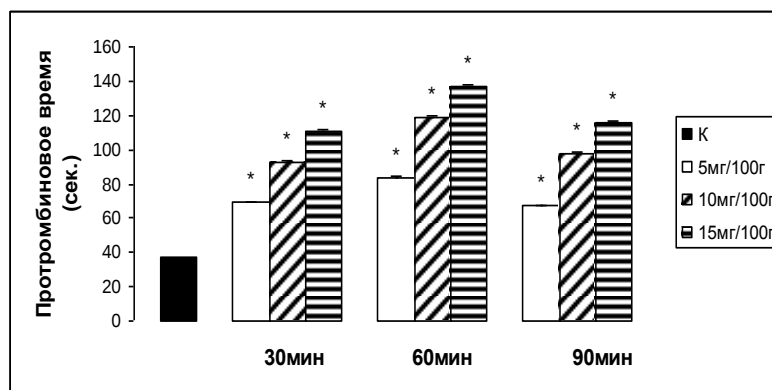


Рис.3. Изменение протромбинового времени плазмы крови интактных крыс под действием АК комплекса,
*достоверные различия между контролем и опытом ($p \leq 0,05$), ($n=6$)

Показатели общей свертываемости крови, рекальцификации и ПВ характеризуют исследуемый АК комплекс как хорошо выраженный антикоагулянт, который можно отнести к антикоагулянтам непрямого действия.

При определении ПВ рассчитывается показатель МНО, который является дополнительным способом представления результатов протромбинового теста и обеспечивает точный контроль терапии непрямыми антикоагулянтами. Если прямые или естественные антикоагулянты (анти-тромбин III, гепарин, герудин, протеины С и S и др.) оказывают угнетающее влияние непосредственно на факторы свертывания, то антикоагулянты непрямого действия (монокумарины – варфарин, синкумар; дикумарины – дикумарин, тромексан и др.) вступают в реакцию с белковым носителем витамина К в печени и нарушают синтез витамин К-зависимых факторов (II, V, X, VII, протеины С и S) свертывания крови. Необходимо учитывать, что прием антикоагулянтов непрямого действия может вызвать осложнение, обусловленное дефицитом протеина С, который является витамин К-зависимым гликопротеином плазмы, синтезируемого в печени. Его дефицит приводит к венозному тромбозу, так как активный протеин С разрушает и инактивирует факторы свертывания крови V_a и $VIII_a$. Дефицит протеина С может вызвать осложнение – «варфариновый некроз кожи» (варфарин – самый распространенный не прямой антикоагулянт со стабильными показателями антикоагуляции) [5,6].

По данным, приведенным в табл.1, можно отметить, что при всех 3 дозах АК комплекса, введенных крысам (5, 10 и 15мг/100г), были получены достаточно высокие значения МНО, особенно при дозе 15мг/100г (6,26), что больше критического значения, принятого в медицине. Примечательно, что показатель МНО во всех использованных дозах достигает

своего максимума в течение 60 минут. При использовании антикоагулянтов показатель МНО повышается, что закономерно: кровь содержит меньше факторов свертывания.

Таблица 1

Изменение значения МНО в крови интактных крыс под действием АК комплекса (n= 6)

Параметр	Аминокислотный комплекс								
	5мг/100г			10мг/100г			15мг/100г		
	30мин	60мин	90мин	30мин	60мин	90мин	30мин	60мин	90мин
МНО	2,61	3,48	2,41	3,95	5,72	4,19	5,19	6,26	5,45

$p \leq 0,05$

Для обеспечения максимальной защиты очень важно поддерживать значение МНО в пределах терапевтического диапазона. Критическое значение МНО > 6,0 – это риск развития кровотечений, особенно у больных с желудочно-кишечными и почечными заболеваниями, артериальной гипертензией и др.

Одним из ключевых показателей свертывающей системы является фибриноген. Как видно из табл.2, под влиянием АК комплекса в дозе 5мг/100г уровень фибриногена в крови снижается на 10%, а при дозе 10мг/100г – на 19%. Поскольку наши исследования проводились на здоровых животных, мы не обсуждаем факторы, которые могут вызывать снижение уровня фибриногена в крови вследствие различных заболеваний. Некоторое уменьшение уровня фибриногена (10-19%), как указывалось выше, может быть связано с торможением образования протромбинового комплекса и протромбина (впоследствии и тромбина) в печени под влиянием АК комплекса.

Таблица 2

Изменение уровня фибриногена в крови интактных крыс под действием АК комплекса (n= 6)

Параметр плазменного гемостаза	Контроль	Аминокислотный комплекс					
		5мг/100г			10мг/100г		
		30мин	60мин	90мин	30мин	60мин	90мин
Фибриноген г/л	2,8 ± 0,1	1,98 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,95 ± 0,2	2,44 ± 0,2	1,62 ± 0,3	2,04 ± 0,3

$p \leq 0,05$

Понижение содержания фибриногена в крови свидетельствует о повышенном риске кровотечения, который наблюдается при приеме

антикоагулянтов, тромболитиков и антиагрегантов. Некоторые препараты, такие как анаболические средства, фенobarбитал, стрептокиназа, урокиназа и др., также понижают уровень фибриногена. Ниже физиологической нормы (1,0 г/л) содержание фибриногена несет серьезную опасность для здоровья и ведет к большой потере крови, даже при незначительной ране.

Скорость тромбообразования, размеры тромба зависят не только от активности факторов свертывания, но и от содержания естественных антикоагулянтов (АТ III, гепарин, протеины С и S, тромбомодулин), при снижении уровня которых возникает тяжелое тромботическое состояние – тромбоз магистральных вен конечностей и внутренних органов, тромбоз легочной артерии, инфаркты органов. Недостаточность антикоагулянтов, особенно АТ III и гепарина, на долю которых приходится примерно 80% всей антикоагулянтной активности крови, развивается у больных с печеночной недостаточностью, при нефротическом синдроме, ДВС-синдроме (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания), атеросклерозе, сахарном диабете и т.д.

Большой перечень заболеваний, вызванных недостатком антикоагулянтов, способствует поиску и созданию новых препаратов, которые помогут побороть эти болезни.

Полученные нами данные и анализ результатов влияния АК комплекса на систему гемостаза, привели к предположению, что действительно имеем дело с непрямым антикоагулянтом и надеемся, что в будущем исследуемый комплекс найдет свое применение в качестве альтернативного средства для лечения заболеваний, вызванных нарушением гемостаза.

Поступила 05.05.23

Հակադիաբետիկ ամինաթթվային կոմպլեքսի ազդեցությունը պլազմային հեմոստազի որոշ գործոնների վրա

Զ.Խ. Պարոնյան, Լ.Ն. Առաքելյան, Լ.Ս. Գրիգորյան, Հ.Ս. Խաչատրյան, Ա.Զ. Գալստյան, Հ.Ա. Ստեփանյան

Օգտվելով արյան մակարդման համակարգում տեղի ունեցող փոփոխությունները բնորոշող դասական մեթոդներից ինտակտ առնետների մոտ գրանցվել են այն տեղաշարժերը, որ տեղի են ունենում նոր ամինաթթվային կոմպլեքսի, որը բաղկացած է γ – ամինակարագաթթվից (ԳԱԿԹ), գլուտամինից, β – ալանինից և էթանոլամին – Օ – սուլֆատից, ազդեցության տակ (ԷՕՍ): Ըստ ստացված տվյալների, ստուգիչ կենդանիների հետ համեմատած, արյան ընդհանուր մակարդելիության և ռեկալցիֆիկացման ժամանակը, կախված չափաբաժնից, երկարում է 15-ից 48% -ով, պրոթրոմբինային ժամանակը դանդաղում է 2 – 4 անգամ, որը ցույց է տալիս, որ ուսումնասիրվող

ամինաթթվային կոմպլեքսն իր առավելագույն ակտիվությունը ցուցաբերում է հատկապես պրոթրոմբինային կոմպլեքսի և հետևաբար՝ ակտիվ թրոմբինի առաջացման փուլում, ինչը նշանակում է, որ այն ազդում է լյարդում արյան մակարդման վիտամին K – կախյալ ֆակտորների սինթեզի վրա՝ խանգարելով պրոթրոմբինային կոմպլեքսի, որը կազմված է II, X, VII և V ֆակտորներից (բոլորը վիտամին K – կախյալ են), ձևավորմանը, որի հետևանքով պակասում է ֆիբրինոգենի այն քանակը, որը կծախսվեր նորմալում ակտիվ թրոմբինի ազդեցությամբ ֆիբրինոգենից – ֆիբրինի թելիկների առաջացման դեպքում, ուստի հասկանալի է, որ ֆիբրինոգենի մակարդակն արյան մեջ, ստուգիչ կենդանիների հետ համեմատած, չափաբաժնից կախված իջնում է ընդամենը 10 – 19% -ով:

Հեմոստազի համակարգի վրա ամինաթթվային կոմպլեքսի ազդեցության ուսումնասիրության արդյունքում ստացված տվյալները վերլուծելուց հետո կարելի է եզրակացնել, որ իսկապես գործ ունենք անուղղակի հակամակարդիչի հետ և ենթադրում ենք, որ ապագայում այն կգտնի իր կիրառումը հակամակարդիչների պակասի հետևանքով առաջացած մի շարք հիվանդությունների այլընտրանքային բուժման ընթացքում:

The Effect of the Antidiabetic Amino Acid Complex on Some Hemostasis Parameters

**Z. Kh. Paronyan, L. N. Araqelyan, L. S. Grigoryan, H. S. Khachatryan,
A. Z. Galstyan, H. A. Stepanyan**

The changes that occur under the influence of an amino acid complex consisting of γ -aminobutyric acid (GABA), glutamine, β -alanine and ethanolamin – O – sulfate (EOS) have been recorded in intact rats using the classical methods that characterize the blood coagulation system. According to the obtained data, compared with the control animals, blood clotting and recalcification duration, depending on the dose, is extended from 15 to 45% and prothrombin time slows down by 2 – 4 times, indicating that the studied amino acid complex shows maximum activity especially in the phase of formation of the prothrombin complex and, consequently, active thrombin, which affects the synthesis of vitamin K – dependent blood coagulation factors in the liver, preventing the formation of prothrombin complex (factors II, X, VII and V), as a result of which the amount of fibrinogen, normally consumed under the action of active thrombin on the formation of fibrin filaments from fibrinogen, decreases and therefore, the level of fibrinogen in the blood, compared with the control animals, dose-dependently decreases by 10 – 19%.

After analyzing the data obtained as a result of studying the effect of the amino acid complex on the hemostasis system in norm, we can conclude that we are really dealing with an indirect anticoagulant, that in the future will find its application as an alternative treatment in a number of diseases caused by a lack of anticoagulants.

Литература

1. *Едигарова Л.В., Акопян В.Г.* Антиагрегантная активность сосудистой стенки и возможность ее коррекции ГАМК-ергическими средствами в условиях гипокинезии. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2000. 5, с. 41 - 43.
2. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии, М., 2013, т.2, с.204-206.
3. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии, М., 2013, т.2, с.214-216.
4. *Паронян З. Х., Хачатрян Р. С., Степанян А. А., Григорян Л.С., Аракелян Л.Н.* Изменения уровня глюкозы и некоторых показателей свертывания крови у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом под действием нового аминокислотного комплекса, Мед. наука Армении НАН РА, 2021, т.LXI, 3, с.64-72.
5. *Bouwens EA., Stavenuiter F., Mosnier LO.,* Mechanisms of anticoagulant and citoprotective actions of the protein C pathway/ *J Thromb Haemost.* 2913 Jun, 11 Suppl 1, 242 – 53.
6. *Christiaans SC., Wagener BM., Esmon CT., Pittet JF..* Protein C and acute inflammation: a clinical and biological perspective/*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2013, Oct.1, 305(7).
7. *Lee R., White P.,* Clinical study of the coagulation time of blood. *Amer. J. Med.*, 1973, VC XLY, 4, p. 495 - 503.
8. *Purwana I., Zheng J., Deurboo X.Li., Son Do, Zhang Z., Liang C., Shen E. et al.* GABA promotes human β -cell proliferation and modulates glucose homeostasis, *Diabetes*, 2014, 63(12), pp. 4197 - 4205.
9. *Soltani Nopton, Qio Hongmin, Aleksis Mila, Glinka Yelna, Zhao Fang, Liu Rui et al.* GABA exerts protective and regeneration effects on islet beta cels and reverses diabetes. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 2011, 108(28), pp. 11692 - 11697.