

©Коллектив авторов

СТРЕССПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ БЛОКАДЕ НЕЙРОНАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ

И.Н. Тюренков, Т.А. Попова, В.Н. Перфилова, И.И. Прокофьев, А.В. Борисов, М.В. Кустова, Г.И. Зайнуллаев, О.В. Островский*

Волгоградский государственный медицинский университет,
400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; эл. почта: vnperfilova@gmail.com

Изучено влияние нового производного глутаминовой кислоты – глюфимета на развитие окислительного стресса, активность антиоксидантных ферментов, дыхание митохондрий, вазодилатирующую и антитромботическую функции эндотелия самок-крыс в условиях 24-х часового иммобилизационно-болевого стрессорного воздействия и при введении блокатора нейрональной NO-синтазы (nNOS) – 7-нитроиндазола. Показано, что введение глюфимета (29 мг/кг, внутривенно) за 10 мин до стрессирования приводило к снижению концентрации метаболитов NO у стрессированных самок, наиболее выраженному в сыворотке крови (на 27,2%) и гомогенате сердца (на 33,5%). На фоне введения 7-нитроиндазола глюфимет также способствовал снижению исследуемого параметра в гомогенате сердца (на 14,3%) и мозга (на 30,3%) по сравнению с показателем стрессированных животных, которые получали только ингибитор nNOS. Статистически значимое снижение (на 15-25%) концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов, кетодиенов и малонового диальдегида) отмечено в митохондриях сердца и головного мозга стрессированных животных, получавших исследуемое вещество. В этих условиях выявлена тенденция к увеличению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО). При введении блокатора nNOS глюфимет способствовал снижению концентрации продуктов ПОЛ, не влияя на активность антиоксидантных ферментов по сравнению с показателями стрессированных животных, получавших только 7-нитроиндазол. Введение глюфимета способствовало увеличению сопряжения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, что выражалось в повышении коэффициента дыхательного контроля в митохондриях сердца при использовании в качестве субстратов дыхания малата/глутамата и сукцината; в митохондриях головного мозга достоверное отличие от аналогичного показателя стрессированных самок наблюдалось только при использовании сукцината. У крыс, получавших глюфимет на фоне введения 7-нитроиндазола, изучаемый показатель достоверно повышался в митохондриях исследованных органов только при использовании сукцината. Глюфимет также способствовал нормализации артериального давления и снижению агрегации тромбоцитов на 24 и 14% соответственно по сравнению с таковой стрессированных животных и в условиях блокады nNOS.

Ключевые слова: иммобилизационно-болевого стресс, активные формы кислорода, дыхание митохондрий, гемостаз

DOI 10.18097/PBMC20176301047

ВВЕДЕНИЕ

При стрессорном состоянии происходит повышенный выброс гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковых гормонов стресса, основными из которых являются катехоламины. При этом усиленная адренергическая стимуляция приводит к интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1, 2]. Помимо этого, большая часть активных форм кислорода (АФК) в клетке образуется в процессе митохондриального дыхания. В комплексах I и III дыхательной цепи высока вероятность утечки электронов на молекулярный кислород, в результате чего образуются супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2) а также гидроксильные радикалы (HO^{\cdot}) [3, 4]. Кроме того, при стрессе усиливается экспрессия индуцибельной изоформы NO-синтазы, продуцирующей оксид азота (NO), который может превращаться в пероксинитрит – сильный окислитель, способный индуцировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) с образованием других цитотоксических соединений [5, 6]. Все эти АФК могут повреждать молекулярные комплексы митохондрий

с развитием их дисфункции, усугубляя оксидативный стресс, что сопровождается разобщением процессов дыхания и окислительного фосфорилирования.

Одной из систем, ограничивающих стрессорные воздействия на органы-мишени, является NO-ергическая система. Оксид азота в организме синтезируется семейством NO-синтаз (NOS), к которому относятся две конститутивных – нейрональная и эндотелиальная (nNOS, eNOS) и индуцибельная (iNOS). Нейрональная изоформа NOS экспрессируется преимущественно в нейронах, кардиомиоцитах, гепатоцитах, скелетной мускулатуре и т.д. [7]. В нейронах nNOS находится в основном на постсинаптических терминалах, где она активируется при увеличении внутриклеточной концентрации кальция, регулируя образование базального уровня оксида азота. Предполагается, что субклеточная локализация nNOS определяет её участие в различных синаптических процессах и в регуляции многих физиологических функций. В частности, есть данные, что оксид азота, синтезируемый nNOS, способен модулировать активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы – одной из основных стресс-реализующих систем [8].

* - адресат для переписки

В связи с этим актуальным является поиск веществ, ограничивающих стресс-реакцию и влияющих на NO-ергическую систему. В качестве таких соединений могут рассматриваться производные глутаминовой кислоты. Глутамат является предшественником ГАМК – нейромедиатора одной из основных стресс-лимитирующих систем, который принимает участие в различных метаболических реакциях, являясь промежуточным продуктом шунта Робертса, тесно связанного с циклом Кребса. Кроме того, глутамат, взаимодействуя с NMDA-рецепторами, способствует увеличению поступления кальция в клетку, при этом активируется нейрональная изоформа NO-синтазы. Известно также о тесном функциональном взаимодействии глутамат- и NO-ергической систем [9-11].

Целью работы было изучение влияния нового производного глутаминовой кислоты – глюфимета на развитие окислительного стресса, дыхательную функцию митохондрий сердца и головного мозга, артериального давления (АД) и гемостаз стрессированных животных и в условиях блокады нейрональной NO-синтазы.

МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на 64 белых беспородных крысах самках массой 200-250 г, находящихся во время стрессирования в стадии диэструса. Животных, полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область), содержали в условиях вивария ВолгГМУ. Уход за ними осуществлялся согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Международных рекомендаций “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” [The European Convention, 1986]. Протокол экспериментального исследования был одобрен Региональным независимым этическим комитетом (Волгоградский Медицинский Научный Центр) (протокол № 198-2014 от 25.04.2014 г).

Было сформировано 8 групп по 8 животных в каждой: 1 – группа позитивного контроля (интактные крысы); 2 – интактные животные, которым вводили ингибитор nNOS – 7-нитроиндазол (в дозе 50 мг/кг); 3 – группа негативного контроля – стрессированные самки, получавшие 0,9%-ный раствор хлорида натрия в аналогичном с опытными группами режиме; 4 и 5 – опытные группы, в которых стрессированным животным внутрибрюшинно вводили производное глутаминовой кислоты – глюфимет (в дозе 29 мг/кг) и фенибут (в дозе 50 мг/кг) соответственно; 6 – группа стрессированных крыс, получавших внутрибрюшинно 7-нитроиндазол (в дозе 50 мг/кг); 7 и 8 – группы стрессированных самок, которым соответственно вводили глюфимет и фенибут на фоне блокады nNOS. Выбор доз глюфимета и фенибута обусловлен результатами ранее проведённых в нашей лаборатории

исследований [12, 13], для 7-нитроиндазола – данными литературы [14].

Иммобилизационно-болевого стресс моделировали путем подвешивания животного за дорсальную кожную шейную складку на 24 часа [15]. У всех животных до и после подвешивания регистрировалось среднее артериальное давление (срАД) с помощью прибора для неинвазивного измерения Kent Scientific Corporation (Канада). Самок предварительно приучали к нахождению в пластиковых пеналах-держателях в течение одного часа на протяжении трёх дней.

Забор крови для определения показателей плазменно-коагуляционного звена гемостаза и агрегации тромбоцитов у всех групп наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) животных проводился из брюшного отдела аорты. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Показатели гемостаза определяли на программируемом оптико-механическом коагулометре Минилаб 701 с использованием наборов для определения протромбинового времени (ПВ), фибриногена (ФГ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) (НПО “РЕНАМ”, Россия). Агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе научно-производственной фирмы “Биола” (Россия) по методу Ворп в модификации Габбасова и соавт. [16]. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали ADP (“Renal”, Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ.

После забора крови у животных извлекали сердце и головной мозг, промывали их ледяным физиологическим раствором и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Полученные гомогенаты органов центрифугировали 10 мин (с охлаждением) при 600 г для осаждения дебриса и неразрушенных клеток. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали 20 мин (8000 g). Полученный супернатант сохраняли для последующего определения концентрации конечных метаболитов оксида азота, а осадок ресуспендировали и использовали в качестве митохондриальной фракции [17]. Интенсивность дыхания митохондрий при введении различных субстратов (сукцината, малата/глутамата) определяли полярографическим методом с помощью электрода Кларка и прибора “Эксперт-001-4(01)” (“Эконикс-Эксперт”, Россия). Скорость дыхания выражали в нмоль O_2 /мг белка/мин митохондрий и рассчитывали в следующих метаболических состояниях: V_3 – дыхание, сопряжённое с фосфорилированием в присутствии ADP, V_4 – дыхание после исчерпания добавленного ADP, а также дыхательный контроль как отношение V_3/V_4 [18].

Содержание продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и дикетонов выражали в единицах оптической плотности по модифицированной методике Placer [19]. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по методу Стальной и Гаришвили [20]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по убыли восстановленного глутатиона в реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) [21],

каталазы – по методике, основанной на способности пероксида водорода образовывать окрашенный комплекс с молибдатом аммония [22]. Суммарную активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина [23].

Концентрацию конечных метаболитов оксида азота – нитрит- и нитрат-ионов в сыворотке крови и гомогенатах сердца и головного мозга определяли модифицированным скрининг-методом [24], основанном на одноэтапном измерении с использованием реактива Грисса.

Концентрацию белка определяли с использованием коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific”, США).

Статистическую обработку результатов проводили в программе “Statistica 6.0” с использованием параметрического t-критерия Стьюдента для парных сравнений, и с поправкой Бонферрони – для множественных. Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У intactных самок, которые получали 7-нитроиндазол, суммарная концентрация нитрит- и нитрат-ионов была достоверно ниже в сыворотке крови (на 27,6%), в гомогенатах сердца (на 44,0%) и головного мозга (на 28,1%) по сравнению с контролем (без блокады nNOS; $p \leq 0,05$) (рисунок). Уровень конечных метаболитов оксида азота после стрессорного воздействия у животных был выше в сыворотке крови (на 44,0%), сердце (на 40,2%) и головном мозге

(на 23,3%) относительно аналогичного показателя intactных крыс ($p \leq 0,05$), что может быть связано с активацией при стрессе iNOS [5]. Введение самкам глуфимета вызывало статистически значимое ($p \leq 0,05$) уменьшение исследуемого параметра в сыворотке крови (на 27,2%) и в сердце (на 33,5%); в мозге была отмечена тенденция к снижению (по сравнению с таковым у самок, подвергшихся иммобилизационно-болевого воздействию), которая не достигала уровня статистической значимости. У животных, получавших фенибут, уровень нитрит- и нитрат-ионов также был достоверно ниже в сыворотке крови (на 37,7%, $p \leq 0,05$) и в сердце (на 24,7%, $p \leq 0,05$), а в мозге – практически не отличался от исследуемого показателя стрессированных животных. При ингибировании nNOS концентрация конечных метаболитов NO в сыворотке крови была ниже на 17,7% ($p \leq 0,05$), в сердце – отмечена тенденция к снижению, а в мозге несколько выше, чем у крыс группы негативного контроля. У стрессированных самок, получавших глуфимет на фоне введения 7-нитроиндазола, исследуемый показатель был значительно меньше относительно данного параметра животных после стрессирования: в сыворотке крови – на 21,0%, в сердце – на 23,5% ($p \leq 0,05$), в мозге – на 21,3% ($p \leq 0,05$), а также ниже такового в сердце (на 14,3%) и мозге (на 30,3%, $p \leq 0,05$) крыс, которым вводили только ингибитор. У стрессированных животных, получавших фенибут на фоне блокады nNOS, наблюдалась аналогичная тенденция изменения показателя: в сыворотке крови он был ниже на 14,1%, в сердце – на 28,5% ($p \leq 0,05$), в головном мозге – на 7,6% по сравнению с исследуемым параметром самок группы негативного контроля (рисунок).

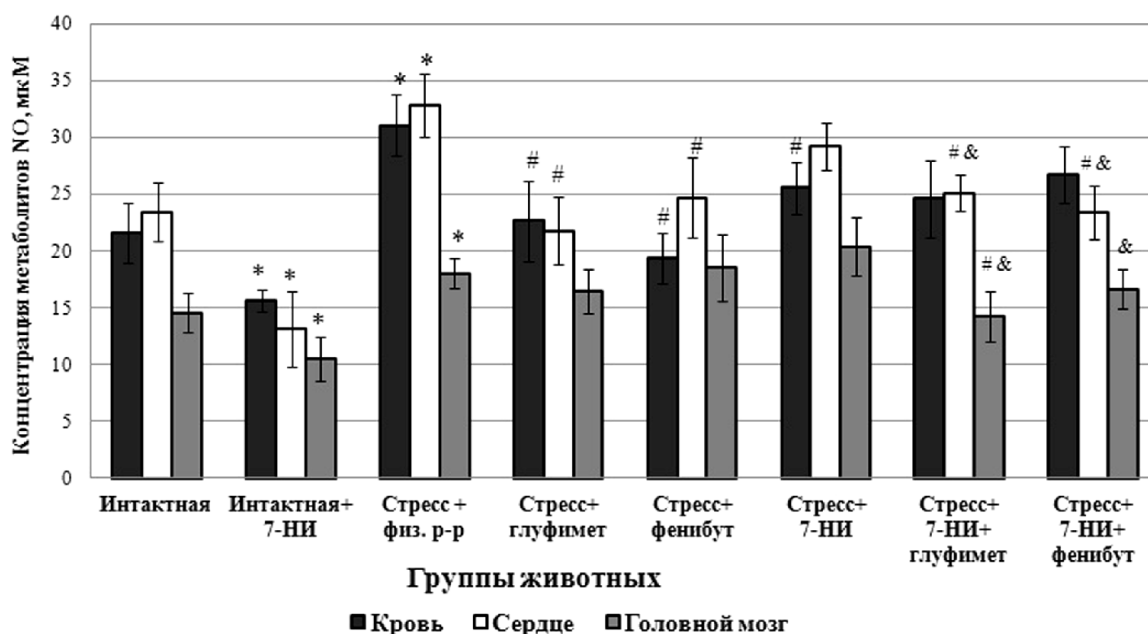


Рисунок. Изменение концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови, гомогенатах сердца и головного мозга животных различных групп. 7-НИ - 7-нитроиндазол; * - изменения достоверны относительно животных intactной группы (t-критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$); # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных самок (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p \leq 0,05$); & - изменения достоверны относительно группы стрессированных крыс, получавших 7-нитроиндазол (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p \leq 0,05$).

СТРЕССПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Введение интактным крысам 7-нитроиндазол не приводило к существенным изменениям показателей оксидантного и антиоксидантного статуса в митохондриях сердца и мозга по сравнению с самками группы позитивного контроля. Однако, концентрация продуктов ПОЛ в митохондриях сердца и головного мозга стрессированных животных была достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями интактных самок, что свидетельствует об усилении процессов ПОЛ при иммобилизационно-болевым воздействием. У крыс, получавших 7-нитроиндазол уровень ДК, дикетонов и МДА был существенно выше, чем у самок после стресса. Введение крысам глутимета вызывало значительное уменьшение образования ДК, дикетонов и МДА в исследуемых органах при стресс-реакции относительно изучаемых параметров животных группы негативного контроля как на фоне ингибитора nNOS, так и без него. У самок, получавших фенибут, наблюдалось менее выраженное

снижение уровня продуктов ПОЛ в сердце, и более выраженное – в мозге, чем у животных, которым вводили глутимет (табл. 1).

Стрессорное воздействие приводило к снижению активности антиоксидантных ферментов по сравнению с исследуемыми показателями интактных крыс. Однако, активность СОД, ГПО и каталазы в митохондриях сердца и мозга у животных, получавших 7-нитроиндазол, была достоверно выше относительно стрессированных животных контрольной группы. Этот эффект, вероятно, обусловлен иницирующим влиянием свободных радикалов на активность антиоксидантных ферментов [25]. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что у животных опытной группы, которым вводили глутимет, не наблюдалось выраженной активации антиоксидантных ферментов по сравнению с изучаемыми параметрами стрессированных крыс в отличие от самок, получавших фенибут (табл. 1).

Таблица 1. Изменение уровня продуктов ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в митохондриях сердца и головного мозга крыс различных групп

Группы животных	Орган	ДК, D ₂₃₃ /мг белка	Дикетоны, D ₂₇₈ /мг белка	МДА, ммоль/мг белка	СОД, у.е./мг белка	ГПО, ммоль GSH/мин/ мг белка	Каталаза, мг H ₂ O ₂ /мин/ мг белка
Интактная	сердце	2,69±0,16	0,72±0,02	6,7±1,6	54,2±3,3	55,1±5,9	13,5±1,5
	мозг	2,05±0,2	0,41±0,03	11,6±0,5	24,8±4,2	17,5±1,0	8,7±0,8
Интактная + 7-нитроиндазол	сердце	2,80±0,25 (4,1%)	0,75±0,08 (4,2%)	7,7±1,3 (14,9%)	40,5±7,7 (-25,3%)	53,3±11,9 (-3,3%)	10,5±2,4 (-22,2%)
	мозг	2,26±0,18 (10,2%)	0,46±0,05 (12,2%)	10,1±1,6 (-12,9%)	23,6±5,1 (-4,8%)	14,4±3,1 (-17,7%)	9,5±1,4 (9,2%)
Стресс+ физ. р-р	сердце	3,27±0,12* (21,6%)	0,83±0,04* (15,3%)	9,9±1,1* (47,8%)	32,7±4,1* (-39,7%)	26,6±2,9* (-51,7%)	8,4±0,8* (-37,8%)
	мозг	2,61±0,18* (18,1%)	0,54±0,03* (31,7%)	18,1±0,7* (56,0%)	18,4±1,5 (-25,8%)	11,6±1,1* (-33,7%)	7,8±1,6 (-10,3%)
Стресс+ глутимет	сердце	2,51±0,3# (-23,2%)	0,68±0,05 (-18,1%)	7,9±0,8# (-20,2%)	39,6±5,6 (21,1%)	34,5±5,5 (29,7%)	13,1±1,0# (55,9%)
	мозг	2,05±0,23# (-21,5%)	0,44±0,04 (-18,5%)	12,7±2,2# (-29,8%)	22,5±3,8 (22,3%)	15,6±3,5 (34,5%)	8,8±1,6 (12,8%)
Стресс+ фенибут	сердце	2,85±0,12 (-12,8%)	0,73±0,07 (-12,0%)	8,3±0,5 (-16,2%)	51,4±6,2# (57,2%)	54,0±7,1# (103,0%)	12,5±1,7# (48,8%)
	мозг	1,67±0,22# (-36,0%)	0,39±0,06# (-27,8%)	11,1±2,5# (-38,7%)	28,3±5,2# (53,8%)	18,0±3,1 (55,2%)	8,6±1,6 (10,2%)
Стресс + 7-нитроиндазол	сердце	4,34±0,32# (32,7%)	1,17±0,16# (41,0%)	11,0±0,9 (11,1%)	43,9±4,0# (34,2%)	39,7±3,0# (49,2%)	14,7±0,5# (75,0%)
	мозг	2,39±0,12 (-8,4%)	0,60±0,05 (11,1%)	18,7±1,4 (3,3%)	34,0±4,4# (84,8%)	17,0±3,5# (46,5%)	9,7±1,0 (24,3%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глутимет	сердце	3,29±0,29& (-24,2%)	0,84±0,10& (-28,2%)	8,6±0,8& (-21,8%)	54,0±6,1# (23,0%)	32,1±2,9& (-19,1%)	12,0±0,6#& (-18,4%)
	мозг	1,92±0,09#& (-19,7%)	0,48±0,05 (-20,0%)	17,3±1,8 (-7,5%)	36,4±6,0# (7,1%)	17,6±3,3 (3,5%)	9,9±1,7 (2,1%)
Стресс + 7-нитроиндазол+ фенибут	сердце	3,11±0,14& (-28,3%)	0,75±0,04& (-35,9%)	8,3±0,6& (-24,5%)	43,5±5,5# (-0,9%)	35,1±5,8 (-11,6%)	10,9±0,6#& (-25,8%)
	мозг	2,02±0,17# (-15,5%)	0,48±0,08 (-20,0%)	13,2±1,3#& (-29,4%)	26,0±4,5& (-23,5%)	17,8±2,3 (4,7%)	8,0±1,3 (-17,5%)

Примечание. В таблице представлены % изменения показателей: в группе стрессированных животных относительно крыс интактной группы; в группах животных, получавших глутимет, фенибут, 7-нитроиндазол относительно группы стрессированных крыс; в группах животных, получавших глутимет и фенибут на фоне блокады nNOS относительно группы крыс, получавших 7-нитроиндазол. Здесь и в таблицах 2-4: * - изменения достоверны относительно интактной группы (t-критерий Стьюдента, p≤0,05); # - изменения достоверны относительно контрольной группы стрессированных самок (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, p≤0,05); & - изменения достоверны относительно группы стрессированных крыс, получавших 7-нитроиндазол (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, p≤0,05).

У интактных животных, получавших 7-нитроиндазол, существенных отличий в дыхательной функции митохондрий исследуемых органов выявлено не было по сравнению с крысами, которым этот ингибитор nNOS не вводили. Интенсификация процессов ПОЛ при стрессорном воздействии приводила к повреждению митохондрий сердца и мозга, которое характеризовалось увеличением поглощения кислорода в состоянии V_4 по Чансу с использованием малата в качестве субстрата на 29,1% и 33,0%, сукцината – на 37,8% и 19,4% соответственно относительно исследуемого показателя интактных животных ($p \leq 0,05$). При стимуляции дыхания добавлением в полярографическую ячейку ADP (состояние V_3 по Чансу) скорость потребления кислорода митохондриями сердца была ниже на 20,6%, чем у интактных самок при использовании субстрата первого дыхательного комплекса и на 17,2% при использовании субстрата второго комплекса ($p \leq 0,05$); в мозге достоверных отличий V_3 от интактных крыс не наблюдалось, однако отмечена тенденция к снижению (табл. 2).

У животных, которым вводили глутимет, малатзависимая скорость поглощения кислорода митохондриями сердца в состоянии V_4 была меньше на 14,4%, при использовании сукцината – на 22,3% относительно изучаемого параметра стрессированных крыс ($p \leq 0,05$). Исследуемый показатель в состоянии V_3 имел тенденцию к повышению по сравнению с таковым стрессированных животных контрольной группы. В митохондриях головного мозга достоверных отличий от скоростей нестимулированного и стимулированного ADP дыхания не отмечено

как с использованием субстрата первого митохондриального комплекса, так и второго по сравнению с изучаемыми параметрами животных после иммобилизационно-болевого воздействия (табл. 2).

Скорость потребления кислорода митохондриями сердца самок, получавших фенибут, при использовании субстрата окисления малата была меньше на 17,4%, сукцината – на 28,2% по сравнению с аналогичным показателем стрессированных крыс ($p \leq 0,05$); в мозге отмечена тенденция к снижению, которая не достигала уровня статистической значимости. В состоянии V_3 дыхание митохондрий сердца при использовании малата было выше на 20,3% ($p \leq 0,05$), при использовании сукцината – не отличалось от уровня контрольной группы стрессированных животных. В митохондриях головного мозга также не наблюдалось изменений данного показателя относительно стрессированных крыс (табл. 2).

Введение ингибитора nNOS на фоне стресса приводило к усилению дыхания митохондрий сердца и головного мозга без добавления ADP как при использовании малата, так и сукцината, а после стимуляции ADP исследуемый параметр практически не отличался от уровня у стрессированных самок. Введение стрессированным животным глутимета на фоне ингибитора nNOS приводило к снижению в митохондриях сердца скорости потребления O_2 в состоянии V_4 при использовании малата в качестве субстрата (на 16,4%), сукцината (на 50,5%) по сравнению с митохондриальным дыханием животных, получавших только 7-нитроиндазол ($p \leq 0,05$).

Таблица 2. Скорости поглощения кислорода (V_3 и V_4) и коэффициенты дыхательного контроля (V_3/V_4) митохондрий сердца и мозга крыс

Группы животных	Исследуемый орган	Малат			Сукцинат		
		V_4 , нмоль O_2 /мг белка/мин	V_3 , нмоль O_2 /мг белка/мин	V_3/V_4	V_4 , нмоль O_2 /мг белка/мин	V_3 , нмоль O_2 /мг белка/мин	V_3/V_4
Интактная	Сердце	13,2±1,0	88,0±8,1	6,7±0,9	13,1±0,9	82,5±6,1	6,3±0,7
	Мозг	7,7±0,9	48,5±9,0	6,4±1,2	7,6±0,9	45,3±7,9	6,0±1,1
Интактная + 7-нитроиндазол	Сердце	13,9±2,8	100,3±11,1	7,2±1,4	14,7±1,9	81,1±11,8	5,5±0,8
	Мозг	7,6±0,8	44,8±7,6	5,9±1,5	7,7±1,4	39,7±3,7	5,1±0,7
Стресс + физ.р-р	Сердце	17,0±1,6*	72,9±7,4*	4,3±0,6*	18,0±1,7*	65,4±9,4*	3,6±0,6*
	Мозг	10,2±1,7*	47,6±6,0	4,7±0,9*	9,1±1,5*	41,5±6,1	4,7±0,9*
Стресс + глутимет	Сердце	14,6±1,7 [#]	77,4±4,9	5,3±0,3 [#]	14,0±1,7 [#]	66,4±7,9	4,7±0,9 [#]
	Мозг	9,2±1,1	44,8±3,9	4,9±0,5	9,5±0,9	46,0±4,5	4,8±0,5
Стресс + фенибут	Сердце	14,1±1,1 [#]	87,7±5,1 [#]	6,2±0,5 [#]	12,9±1,0 [#]	67,5±4,6	5,2±0,5 [#]
	Мозг	8,8±1,2	45,9±8,2	5,2±0,7	7,7±1,0	41,8±7,6	5,4±0,9
Стресс + 7-нитроиндазол	Сердце	18,0±1,7	74,2±5,1	4,2±0,4	18,7±2,4	69,5±7,6	3,7±0,7
	Мозг	10,1±3,1	41,3±5,4	4,1±1,4	10,6±2,0	33,6±5,2	3,2±0,7
Стресс + 7-нитроиндазол + глутимет	Сердце	15,0±1,1 ^{&}	60,3±9,7 ^{#&}	4,0±0,8	9,3±2,5 ^{&}	59,8±8,6	6,4±2,2 ^{#&}
	Мозг	10,2±2,7	60,7±5,7	5,9±1,9	11,3±1,4 [#]	58,3±5,3 ^{#&}	5,2±0,4 ^{#&}
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут	Сердце	15,3±1,0 ^{&}	71,4±6,3 ^{#&}	4,7±0,5	12,9±1,4 ^{&}	57,2±5,3 ^{&}	4,4±0,7
	Мозг	7,6±1,9	48,8±4,3	6,4±1,0	7,8±0,7 ^{&}	43,4±6,9	5,6±1,3 ^{#&}

СТРЕССПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

В митохондриях головного мозга изучаемый показатель существенно не отличался от аналогичного параметра крыс, получавших ингибитор nNOS. Скорость поглощения кислорода после добавления ADP (V_3) у этих крыс в митохондриях сердца была ниже, а в головном мозге – достоверно выше с использованием и малата (на 47,1%), и сукцината (на 73,5%) по сравнению с митохондриями животных, получавших на фоне стресса 7-нитроиндазол ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

У самок, которым вводили и фенибут, и 7-нитроиндазол, скорость нестимулированного дыхания митохондрий в сердце с использованием малата снижалась относительно такового у крыс, получавших 7-нитроиндазол, на 14,9%, сукцината – на 31,2% ($p \leq 0,05$); в мозге эти параметры снижались на 25,0% и 26,7% соответственно ($p \leq 0,05$). Скорость V_3 достоверно отличалась от аналогичного показателя животных, получавших 7-нитроиндазол только в митохондриях сердца с использованием сукцината в качестве субстрата – она была ниже на 17,7% ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

Сопряжение процессов дыхания и синтеза АТФ в митохондриях отражает коэффициент дыхательного контроля, который у стрессированных животных в сердце был на 35,8% меньше, чем у интактных самок при использовании малата и на 42,9% при использовании сукцината ($p \leq 0,05$); в мозге – на 26,6% и 21,7% соответственно ($p \leq 0,05$) (табл. 2). Введение крысам глутимета вызывало увеличение данного показателя в митохондриях сердца на 23,3% при использовании малата в качестве субстрата и на 30,3% при использовании сукцината; в головном мозге достоверных отличий от аналогичного показателя стрессированных самок отмечено не было. Аналогичная картина наблюдалась и у животных, получавших фенибут: в митохондриях сердца исследуемый параметр оказался выше на 44,2% для малата и на 44,4% для сукцината ($p \leq 0,05$) относительно такового крыс группы негативного контроля. У самок, получавших ингибитор nNOS, коэффициент дыхательного контроля как в митохондриях сердца, так и головного мозга практически не отличался от стрессированных животных, а у крыс, получавших глутимет, на фоне ингибитора nNOS, изучаемый показатель достоверно отличался в исследуемых органах только при использовании сукцината: он был выше в сердце на 73,0%, в мозге – на 62,5% по сравнению с аналогичным параметром стрессированных самок, которым вводили только 7-нитроиндазол. Подобная тенденция была отмечена и у животных, получавших фенибут и ингибитор nNOS: коэффициент дыхательного контроля у них был выше, чем у крыс с блокадой nNOS в митохондриях сердца на 18,9%, головного мозга – на 75,0% ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

Уровень сРАД у интактных самок практически не изменялся, а у интактных крыс, получавших ингибитор nNOS, через 24 часа увеличивался на 16,0% относительно исходного. У 5 из 8 животных после иммобилизационно-болевого воздействия изучаемый параметр был выше на 18,4% относительно исходного

уровня и статистически значимо отличался от прироста данного показателя интактных крыс без дефицита NO ($p \leq 0,05$); у 3 из 8 – сРАД снижалось к 24-му часу иммобилизации. У стрессированных самок, получавших 7-нитроиндазол, наблюдалось снижение уровня сРАД на 14,1% относительно исходного ($p \leq 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем стрессированных крыс). У животных, которым вводили исследуемые соединения как на фоне 7-нитроиндазола, так и без него, изучаемый параметр существенно не изменялся (табл. 3).

Таблица 3. Изменение прироста сРАД у животных различных групп

Группы животных	Исходное сРАД	сРАД после стрессирования	% прироста
Интактная	100,4±3,6	99,8±2,9	-0,6±4,7
Интактная + 7-нитроиндазол	105,3±4,8	122,0±5,6	16,0±5,1
Стресс + физ. р-р	101,7±3,2	120,4±3,9	18,4±4,4*
Стресс + глутимет	103,1±2,9	103,2±3,1	0,1±3,6 [#]
Стресс + фенибут	102,8±3,0	102,1±2,4	-0,7±4,4 [#]
Стресс + 7-нитроиндазол	102,6±3,5	88,0±3,9	-14,2±3,9 [#]
Стресс + 7-нитроиндазол + глутимет	103,3±2,5	106,7±4,1	3,3±4,1 ^{#&}
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут	106,2±3,7	103,3±3,4	-2,7±3,4 ^{#&}

Иммобилизационно-болевое воздействие у животных вызывало повышение степени агрегации тромбоцитов, укорочение АЧТВ, протромбинового времени (ПВ) и увеличение концентрации фибриногена в плазме крови по сравнению с таковыми интактных самок ($p \leq 0,05$). Введение крысам глутимета вызывало значительное снижение агрегационной способности тромбоцитов и уменьшение уровня фибриногена ($p \leq 0,05$), однако существенно не влияло на АЧТВ и ПВ. Схожая тенденция отмечалась и у крыс, получавших фенибут, за исключением АЧТВ и ПВ – у них данные параметры были выше относительно таковых стрессированных крыс. Введение 7-нитроиндазола значительно ухудшало показатели агрегации и гемостаза, а введение глутимета на фоне ингибитора nNOS достоверно снижало степень агрегации тромбоцитов и повышало протромбиновое время ($p \leq 0,05$) относительно изучаемых параметров животных, получавших только 7-нитроиндазол. У стрессированных животных, которым вводили и фенибут, и ингибитор nNOS, отмечалось только увеличение АЧТВ, остальные показатели существенно не отличались от аналогичных параметров крыс с блокадой нейрональной NOS (табл. 4).

Таким образом, 7-нитроиндазол вызывал снижение концентрации конечных метаболитов NO у интактных животных, что согласуется с литературными

Таблица 4. Изменение степени агрегации тромбоцитов и показателей системы гемостаза у животных различных групп

Группы животных	Исследуемый показатель			
	Степень агрегации тромбоцитов, у.е.	АЧТВ, с	Протромбиновое время, с	Фибриноген, г/л
Интактная	25,0±2,5	16,3±0,9	23,2±1,9	3,3±0,3
Интактная + 7-нитроиндазол	30,6±2,9* (22,4%)	15,4±0,47 (-5,5%)	23,1±1,6 (-0,9%)	3,3±0,4 (0,0%)
Стресс + физ.р-р	31,1±3,5* (24,4%)	13,1±0,5* (-19,6%)	18,6±0,9* (-19,8%)	5,3±0,2* (60,6%)
Стресс + глүфимет	23,6±3,2 [#] (-24,1%)	13,9±0,3 (6,1%)	18,2±0,9 (-2,1%)	4,6±0,3 [#] (-13,2%)
Стресс + фенибут	23,7±2,5 [#] (-23,8%)	14,2±0,7 [#] (8,4%)	19,7±1,0 (5,9%)	4,8±0,4 (-9,4%)
Стресс + 7-нитроиндазол	30,6±3,1 (-1,6%)	12,9±0,8 (-1,5%)	17,8±2,0 (-4,3%)	5,1±0,2 (-3,8%)
Стресс + 7-нитроиндазол + глүфимет	26,2±1,6 ^{#&} (-14,4%)	13,2±0,5 (2,3%)	21,4±1,4 ^{#&} (20,2%)	5,2±0,3 (2,0%)
Стресс + 7-нитроиндазол + фенибут	28,8±2,7 (-5,9%)	14,1±0,7 ^{#&} (9,3%)	18,9±1,4 (6,2%)	4,8±0,3 (-5,9%)

Примечание. В таблице представлены % изменения показателей:

- в группе стрессированных животных относительно крыс интактной группы;
- в группах животных, получавших глүфимет, фенибут, 7-нитроиндазол относительно группы стрессированных крыс;
- в группах животных, получавших глүфимет и фенибут на фоне блокады nNOS относительно группы крыс, получавших 7-нитроиндазол.

данными [26]. Кроме того, у этой группы животных было отмечено повышение сРАД. Возможно, это связано с тем, что, по имеющимся в литературе сведениям, 7-нитроиндазол в высокой дозе блокирует и нейрональную, и эндотелиальную NOS (eNOS) [27-29]. Оксид азота, вырабатываемый eNOS, высвобождается в кровяное русло, выполняет функцию вазодилататора, регулирующего сосудистый тонус и АД. Дефицит NO при блокаде eNOS вызывает повышение АД [30]. Известно также, что 7-нитроиндазол ингибирует моноаминоксидазу Б (МАО Б) [31-34], субстратом которой являются адреномиметик дофамин – предшественник норадреналина и адреналина. Под действием средних концентраций дофамина повышается систолическое и пульсовое АД, в высоких концентрациях он активирует сосудистые α 1-адренорецепторы, что приводит к генерализованной вазоконстрикции и повышению АД.

Известно также, что оксид азота, продуцируемый eNOS, вследствие увеличения уровня внутриклеточного cGMP вызывает снижение агрегации тромбоцитов [35, 36]. В настоящей работе показано повышение степени агрегации тромбоцитов у интактных самок с дефицитом NO, что также может указывать на ингибирование не только нейрональной, но и эндотелиальной NOS 7-нитроиндазолом.

Иммунизационно-болевое воздействие приводит к увеличенному образованию конечных метаболитов оксида азота, повышение концентрации которых обнаружено в крови, гомогенатах сердца и головного мозга стрессированных животных по сравнению с интактными крысами. Усиление синтеза NO осуществляется, вероятно, за счёт индуцибельной изоформы NO-синтазы, которая активируется при стрессе [5]. Оксид азота, продуцируемый при этом

в больших количествах, может легко переходить в пероксинитрит – прооксидантное соединение, вступающее либо в прямые окислительные, либо косвенные, радикал-опосредованные реакции с белками, липидами и ДНК, что приводит к изменению функционирования клетки от нарушения клеточной сигнализации до развития некроза и апоптоза [2, 6]. Помимо этого, полученные нами данные свидетельствуют об уменьшении ADP-индуцированной скорости потребления кислорода митохондриями сердца и мозга при стрессорном воздействии и о повышении данного показателя после истощения ADP, что говорит о разобщении процессов дыхания и синтеза АТФ. Причиной этого может служить окислительное повреждение I и II комплексов цепи переноса электронов (ЦПЭ) пероксинитритом. Следствием утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий является образование АФК и развитие оксидативного стресса [3, 37]. Это подтверждается усиленным образованием первичных и вторичных продуктов ПОЛ в митохондриях сердца и мозга и снижением активности антиоксидантных ферментов. Развивающийся оксидативный стресс играет важную роль и в развитии дисфункции эндотелия, нарушая его вазодилатирующую функцию и увеличивая протромбогенный потенциал [38].

Введение животным производного глутаминовой кислоты – глүфимета способствовало увеличению сопряжения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца и мозга относительно такового стрессированных животных контрольной группы, что выразилось в повышении коэффициента дыхательного контроля. Отмечено также уменьшение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ, тенденция к увеличению

активности СОД, каталазы и ГПО в митохондриях сердца и головного мозга, нормализация артериального давления и снижение степени агрегации тромбоцитов. Помимо этого, концентрация конечных метаболитов оксида азота в крови, сердце и мозге была значительно ниже, чем у стрессированных животных, что говорит об ограничении стресс-реакции. Однако, на показатели внешнего и внутреннего пути свертывания системы гемостаза исследуемое вещество влияния не оказывало.

Препарат сравнения фенибут в меньшей степени, по сравнению с глуфиметом, ограничивал процессы ПОЛ в митохондриях сердца, а в мозге – в большей. Данное вещество является β-фенильным производным ГАМК – нейромедиатора центральной нервной системы, что, вероятно, может объяснить более высокую активность его в головном мозге. Кроме того, фенибут, как и глуфимет, уменьшал митохондриальную и эндотелиальную дисфункцию, что выражалось в снижении скорости нестимулированного дыхания, повышении коэффициента дыхательного контроля, нормализации АД и улучшении показателей гемостаза.

На фоне ингибирования nNOS исследуемые соединения также ограничивали интенсивность стресс-реакции, что выражалось в уменьшении концентрации нитрит- и нитрат-ионов, продуктов ПОЛ, повышении коэффициента дыхательного контроля и соответственно сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца и головного мозга, а также нормализации вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия относительно показателей группы животных, получавших 7-нитроиндазол.

Стресспротекторное действие производного глутаминовой кислоты – глуфимета обусловлено, вероятно, входящими в его химическую структуру фрагментами ГАМК, фенибута и глицина, которые ограничивают стресс-реакцию на центральном и периферическом уровнях [39, 40]. Кроме того, известно, что глутаматергическая система находится в тесной функциональной взаимосвязи со стресслимитирующими системами ГАМК- и NO-ергической [41]. Возможно, глуфимет модулирует активность названных систем путём взаимодействия с глутаматергической.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, иммобилизационно-болевого стресс, вызванный подвешиванием животных за дорсальную кожную шейную складку на 24 часа, вызывает интенсификацию процессов ПОЛ, что является причиной митохондриальной и эндотелиальной дисфункции. Введение ингибитора nNOS 7-нитроиндазола приводит к неоднозначным патогенетическим сдвигам у стрессированных животных: усугублению митохондриальной дисфункции. Это сопровождается усилением процессов ПОЛ главным образом в кардиомиоцитах и увеличением активности антиоксидантных ферментов, резкому снижению АД после

24-х часовой иммобилизации относительно исходных данных, отсутствию изменений концентрации метаболитов оксида азота в сыворотке крови, сердце и головном мозге, а также показателей гемостаза по сравнению с таковыми стрессированных животных контрольной группы.

Производные нейрoактивных аминокислот – глуфимет и фенибут – оказывают стресспротективное действие, ограничивают процессы ПОЛ, повышают активность антиоксидантных ферментов, улучшают дыхательную функцию митохондрий, способствуют снижению концентрации метаболитов NO в сыворотке крови, сердце и головном мозге, нормализации АД, оказывают антиагрегантное действие у стрессированных животных и при введении ингибитора nNOS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kluge M.A., Fetterman J.L., Vita J.A. (2013) *Circ. Res.*, **112**, 1171-1188.
2. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. (2007) *Physiol. Rev.*, **87**(1), 315-324.
3. Chen Y.R., Zweier J.L. (2014) *Circ. Res.*, **114**(3), 524-537.
4. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2007) *Apoptosis*, **12**(5), 913-922.
5. Munhoz C.D., Garcia-Bueno B., Madrigal J.L.M., Lepsch L.B., Scavone C., Leza J.C. (2008) *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **41**, 1037-1046.
6. Pierini D., Bryan N.S. (2015) *Methods Mol. Biol.*, **1208**, 63-71.
7. Villanueva C., Giulivi C. (2010) *Free Radic. Biol. Med.*, **49**(3), 307-316.
8. Gądek-Michalska A., Tadeusz J., Rachwalska P., Spyra J., Bugajski J. (2012) *Pharmacol. Rep.*, **64**(6), 1381-1390.
9. Santini C.O., Fassini A., Scopinho A.A., Busnardo C., Correa F.M., Resstel L.B. (2013) *Auton. Neurosci.*, **177**(2), 244-252.
10. Alves F.H., Crestani C.C., Resstel L.B., Correa F.M. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**(7), 1703-1711.
11. Ferraro G., Montalbano M.E., La Grutta V. (1999) *Epilepsia*, **40**, 830-836.
12. Перфилова В.Н., Тюренков И.Н., Лебедева С.А., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. (2007) Региональное кровообращение и микроциркуляция, **6**(4), 64-67.
13. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. (2015) Бюлл. эксперим. биол. мед., **159**(3), 366-369.
14. Kwon Y.B., Yoon Y.S., Han H.J., Lee J.H. (1999) *Anat. Histol. Embryol.*, **28**(5-6), 325-329.
15. Ковалев Г.В., Гурбанов К.Г., Тюренков И.Н., Найденов С.Н. (1983) Фармакология и токсикология, **46**(3), 41-44.
16. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. (1989) Лаб. дело, №10, 15-18.
17. Lanza I.R., Sreekumaran K.N. (2009) *Methods Enzymol.*, **457**, 349-372.
18. Brand M.D., Nicholls D.G. (2011) *Biochem. J.*, **435**, 297-312.
19. Ушкалова В.Н., Иоанидис Н.В., Кадочникова Г.Д., Деева З.М. (1993) Контроль перекисного окисления липидов, изд-во НГУ, Новосибирск, 181 с.
20. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) в кн.: Современные методы в биохимии, Медицина, М., 66-68.
21. Моин В.М. (1986) Лаб. дело, №12, 12-16.

22. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
23. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Вопр. мед. химии, **36**, 88-91.
24. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. (2005) Клини. лаб. диагн., **6**, 15-18.
25. Милякова М.Н., Шабанов В.В. (2006) Биомед. химия, **52**, 130-137.
26. Salter M., Duffy C., Garthwaite J., Strijbos P.J. (1996) J. Neurochem., **66**, 1683-1690.
27. Prickaerts J., Steinbusch H.W.M., Smits J.F.M., de Vente J. (1997) Eur. J. Pharmacol., **337**, 125-136.
28. Rickard N.S., Gibbs M.E., Ng K.T. (1999) Learn. Mem., **6**(5), 458-466.
29. Mutlu O., Ulak G., Belzung C. (2011) Fundam. Clin. Pharmacol., **25**(3), 368-377.
30. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980) Nature, **288**, 373-376.
31. Desvignes C., Bert L., Vinet L., Denoroy L., Renaud B., Lambas-Senas L. (1999) Neurosci Lett., **261**(3), 175-178.
32. Royland J.E., Delfani K., Langston J.W., Janson A.M., Di Monte D.A. (1990) Brain Res., **839**(1), 41-48.
33. Herraiz T., Aran V.J., Guillen H. (2009) Free Radic. Res., **43**(10), 975-984.
34. Czarnecka A., Konieczny J., Lenda T., Lorenc-Koci E. (2015) Brain Res., **1625**, 218-237.
35. Cavallini L., Coassin M., Borean A., Alexandre A. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 5545-5551.
36. Galler A.B., Garcia Arguinzonis M.I., Baumgartner W., Kuhn M., Smolenski A., Simm A., Reinhard M. (2006) Histochem. Cell Biol., **125**, 457-474.
37. Spiers J.G., Chen H.J., Sernia C., Lavidis N.A. (2015) Front. Neurosci., **8**(456). DOI: 10.3389/fnins.2014.00456.
38. Austin A.W., Wissmann T., von Kanel R. (2013) Semin. Thromb. Hemost., **39**(8), 902-912.
39. Ковалев Г.В., Спасов А.А., Богачев Н.А. (1987) Бюлл. эксперим. биол. мед., **104**(11), 588-590.
40. Перфилова В.Н. Тюренков И.Н. (2005) Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, **4**(1), 21-26.
41. Myers B., Mark Dolgas C., Kasckow J., Cullinan W.E., Herman J.P. (2014) Brain Struct. Funct., **219**(4), 1287-1303.

Поступила: 01. 12. 2016.
Принята к печати: 18. 01. 2017.

PROTECTIVE EFFECTS OF A NEW GLUTAMIC ACID DERIVATIVE AGAINST STRESS AFTER nNOS BLOCKADE

*I.N. Tyurenkov, T.A. Popova, V.N. Perfilova, I.I. Prokofiev, A.V. Borisov,
M.V. Kustova, G.I. Zaypullaev, O.V. Ostrovskij*

Volgograd State Medical University,
1 Pavshikh Bortsov sq., Volgograd, 400131 Russia; e-mail: vnperfilova@gmail.com

We studied the effects of a new glutamic acid derivative, glufimet, on oxidative stress, activity of antioxidant enzymes, mitochondrial respiration, endothelial vasodilation and anti-platelet activity in female rats after exposure to 24-hour immobilization pain stress and 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor. A single dose administration of glufimet (29 mg/kg intraperitoneally) 10 minutes before stress exposure caused a decrease of NO metabolites in serum (by 27.2%) and heart homogenate (33.5% ($p \leq 0.05$), respectively, compared with the control group. Administration of 7-nitroindazole with glufimet also decreased the studied parameters by 14.3% in the heart homogenate and by 30.3% in the brain ($p \leq 0.05$) compared with stress exposed rats receiving only the nNOS inhibitor. Glufimet decreased the levels of primary and secondary products of lipid peroxidation (LPO), conjugated dienes by 20% ($p \leq 0.05$) and 17.3% ($p \leq 0.05$), ketodienes by 16% and 13.7%, malondialdehyde by 15% ($p \leq 0.05$) and 26.6% ($p \leq 0.05$) in the heart and brain mitochondria of stress exposed rats, respectively, compared with the control group. Glufimet administration also increased SOD activity (by 14.4% and 13.1%, respectively), catalase (by 19% and 26.8%, respectively) and glutathione peroxidase (GPx) activity (by 45.5% ($p \leq 0.05$) and 7.3%, respectively). The antioxidant effect of glufimet may be also attributed to increased coupling between the processes of mitochondria respiration and oxidative phosphorylation. This was evidenced by an increase in the respiratory control ratio (RCR) (by 46.0% ($p \leq 0.05$) for malate/glutamate and by 49.7% ($p \leq 0.05$) for succinate) in the heart mitochondria. A statistically significant increase in RCR (by 37.3% ($p \leq 0.05$)) was observed in stress exposed female rat brain mitochondria for succinate. RCRs differed significantly for succinate in the heart and brain of rats receiving glufimet after nNOS blockade. RCR increased by 62.3% ($p \leq 0.05$) in the heart mitochondria and by 72.2% ($p \leq 0.05$) in the brain mitochondria compared with the RCRs in stress exposed rats receiving 7-nitroindazole.

Key words: immobilization-painful stress, reactive oxygen species, mitochondrial respiration, hemostasis