

УДК 612.115+577.157.2+547.587.51+591.481.1+611.36+611.61+611.12

Академик К. Г. Карагезян, Дж. И. Гезальян, С. С. Овакимян

**Особенности экспериментально выявленных
антикоагулянтных свойств вновь синтезированного
препарата кумариновой природы**

(Представлено 22/XI 1999)

В настоящее время считается установленной решающая роль гипопротромбинемии (ГПЕ) как основного фактора, обуславливающего низкую степень активности свертываемости крови (СК).

По современным представлениям ГПЕ рассматривается как состояние, характерное для патологических состояний организма различной этиологии и сопровождающееся ярко выраженным геморрагическим синдромом. Будучи фактором, биосинтезирующимся в печеночной ткани, протромбин (П) демонстрирует высокую степень чувствительности к болезненным состояниям печени. Это тем более касается того сложного переплетения биохимических реакций, которые ответственны за обеспечение нормального уровня этого важнейшего компонента системы СК и в значительной мере являются витамин-К-зависимыми.

Болезненные состояния печени типа циррозов [1] характеризуются не только чувствительным пролонгированием протромбинового времени (ПВ) с вовлечением в процесс прокоагулянтов VII и X [2] как корреляционных факторов [3], но и развитием ярко выраженной тромбоцитопении различной природы.

Исследованиями последних лет продемонстрировано антикоагулянтное действие ряда молекулярных препаратов, например, типа так называемого протеина С, оказывающего ингибирующее действие на активность фактора V, и стимулируемого, в частности, липопротеидами высокой плотности [4].

С отмеченной точки зрения исключительный интерес представляют особенности сдвигов ПВ [5] под влиянием ряда наиболее популярных препаратов антикоагулянтного действия типа варфарина с определенной фармакокинетикой, проявляющейся в виде ГПЕ [6], фиксируемой уже при инициации патологических отклонений на уровне клеточных структур. В механизме развития резкого понижения активности П, в виде удлинения ПВ, усматривается интересный антикоагуляционный феномен иммунологической природы, проявляющийся при активном участии β -2-гликопротеина с высоким индексом иммуносупрессорного эффекта, в известной степени контролируемого стероидными гормонами. Это наиболее отчетливо проявляется в случае аутоиммунных гепатитов, характеризующихся торможением аутоантителопродукции под воздействием лекарственных средств, негативно отражающихся на балансе витамина К. ГПЕ, наблюдающаяся в условиях широкого использования медикаментозных препаратов антикоагулянтного, анестетического действия [7], а также применения факторов, вызывающих стойкую гипофибриногению, фибринолиз при циррозах и многих других болезненных состояниях [8], имеет в своей основе формирование состояния глубокого дефицита, обусловленного недостаточностью факторов V и VII, являющихся, как известно, фосфолипид-зависимыми ингибиторами активности П.

Антиоксидантотерапия как эффективный метод коррекции нарушений процесса гемокоагуляции получила широкое распространение в оптимизации состояния интеграции различных категорий фосфолипидов (ФЛ) [9] в структурную организацию П. Подключение их в формирование функциональной активности этих ингредиентов системы СК [10] совершается

вкупе с некоторыми метаболически активными аминокислотами типа глицина, а также ферментными системами аминокислотного метаболизма, такими, например, как аспартат- и аланинаминотрансферазы, демонстрирующие ярко выраженное антикоагулянтное действие, главным образом при цирротических поражениях печени. В связи с отмеченным примечательны фармакокинетика и фармакодинамика ряда соединений из серии ацетокумарина, обладающих ярко выраженным антикоагулянтным действием, потенцируемым ацетоаминофеном и ингибируемым признанным тканевым плазминогеном, эффективно активирующим процесс СК путем интенсивной мобилизации фактора VII.

Исходя из вышеизложенного, представляло существенный интерес проведение специальных наблюдений в направлении выявления природы действия синтезированного Дж. И. Гезаляна препарата кумаринового ряда под кодовым названием ГШ-17, представляющего собой N-морфолилтиоуреидо-3-карбамоил кумарин (с умеренным гепатопротекторным действием) на времязависимую динамику ПВ крови и тромбопластической активности (ТА) мозговой, миокардиальной, печеночной и почечной тканей белых крыс в эксперименте.

Исследования проводили на 110 беспородных белых крысах-самцах массой 180-200г, предварительно голодавших в течение 12 ч.

Определение ПВ проводили в оксалатной плазме крови, забираемой из *angulus venosus* (место слияния верхней полой и подключичной вен) шприцем, содержащим раствор указанного стабилизатора в объемном соотношении с кровью 1:9, до инъекции препарата (контроль), через 10 и 30 мин после внутривенного (*angulus venosus*) и внутрибрюшинного введения им 0.5 и 1.0 мл 1%-ного раствора ГШ-17. Отделенную центрифугированием при 6000 об/мин плазму крови хранили в холодильнике при 4-8°C. Расчет ПВ производили в секундах образования сгустка известным методом с использованием раствора Т, изготовляемого из цельного мозгового гомогената контрольных белых крыс.

После взятия проб крови животных умерщвляли декапитированием под легким эфирным наркозом. На холоду в максимально ограниченные сроки производили изолирование отмеченных органов, их освобождение от оболочек, кровеносных сосудов, а также основательную, многократную промывку охлажденным физиологическим раствором и обезвоживание между прокладками фильтровальной бумаги.

Определение ТА указанных тканей проводили при использовании в качестве источника П контрольной плазмы крови интактных белых крыс или людей-доноров.

Таблица 1

Динамика изменений протромбинового времени (с) плазмы крови белых крыс через 10 и 30 мин после внутрибрюшинного (1) и внутривенного (2) введения им 0.5 и 1.0 мл 1%-ного раствора ГШ-17

	Контроль (К) <i>n</i> =5	0.5 мл				1.0 мл			
		Через 10 мин, <i>n</i> =5	% разницы от К	Через 30 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К	Через 10 мин, <i>n</i> =5	% разницы от К	Через 30 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К
1	16.3±0.59	19.8±0.69	+21.5	21.2±0.60	+30.1	20.9±0.61	+28.2	22.0±0.63	+35.0
2	16.0±0.62	21.5±0.70	+34.4	24.0±0.63	+50.0	24.5±0.62	+53.1	25.0±0.68	+56.3

Примечание: $P < 0.001$.

Согласно результатам проведенных наблюдений, отраженным в табл. 1, ГШ-17 выступает в качестве эффективного ингибитора активности П особенно после в/в введения 0.5 мл 1%-ного раствора препарата. Этот эффект прослеживается уже на 10-й мин после инъекции и выражается в статистически достоверном удлинении ПВ, оказывающимся еще более демонстративным спустя 30 мин после инъекции его удвоенной дозы (1 мл) и характеризующимся заметным усилением антикоагулянтного действия.

Дальнейшее развитие настоящего исследования протекало в направлении изучения особенностей сдвигов ТА мозговой, миокардиальной, печеночной и почечной тканей с проведением сравнительной оценки характера и глубины ее отклонений в зависимости от объекта исследования, дозы примененного агента и длительности его экспозиции.

Как вытекает из табл. 2, контрольная ТА наиболее высокой оказывается в головном мозге, затем сердечной мышце, печени, и наконец, в почках, составляя соответственно 17.0 ± 0.62 , 33.0 ± 0.93 , 37.0 ± 0.62 , 43.0 ± 0.89 с. Через 10 мин после в/б введения 0.5 мл и особенно 1.0 мл 1%-ного раствора ГШ-17 обнаруживается статистически достоверное падение ТА во всех исследованных тканях. Аналогичная закономерность в еще более выраженном виде прослеживается в те же промежутки времени спустя 30 мин после введения препарата.

Таблица 2

**Динамика изменений тромбопластической активности
(с протромбинового времени) мозговой (1), миокардиальной (2),
печеночной (3) и почечной (4) тканей через 10 и 30 мин после
внутривенного введения им 0.5 и 1.0 мл 1%-ного раствора ГШ-17**

	Контроль (К) <i>n</i> =5	0.5 мл				1.0 мл			
		Через 10 мин, <i>n</i> =5	% разницы от К	Через 30 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К	Через 10 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К	Через 30 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К
1	17.0 ± 0.62	23.5 ± 0.70	+38.2	25.0 ± 0.74	+47.1	27.0 ± 0.78	+58.8	29.0 ± 0.87	+70.6
2	33.0 ± 0.93	43.0 ± 1.11	+30.3	56.0 ± 1.18	+69.7	50.5 ± 1.18	+53.0	51.0 ± 1.29	+54.5
3	37.0 ± 0.69	45.0 ± 0.83	+21.6	55.0 ± 0.82	+48.6	53.0 ± 0.84	+43.2	53.0 ± 0.81	+43.2
4	43.0 ± 0.89	58.5 ± 0.97	+36.0	59.0 ± 0.98	+37.2	59.0 ± 0.97	+37.2	59.0 ± 0.99	+37.2

Примечание: $P < 0.001$.

Особенности установленных феноменов в те же промежутки времени, но уже после в/в инъекции препарата ГШ-17 в известных концентрациях, отражены в табл. 3. В/в введение 0.5 и 1%-ного раствора ГШ-17, в отличие от в/б инъекций, оказывается несравненно более демонстративным в достижении антикоагулянтного эффекта, хотя как уже отмечалось выше, полученные результаты от в/б инъекций через 10 и особенно 30 мин также демонстрируют совершенно четкое, статистически достоверное отклонение от исходных величин.

**Динамика изменений тромбопластической активности
(с протромбинового времени) мозговой (1), миокардиальной (2),
печеночной (3) и почечной (4) тканей через 10 и 30 мин после
внутривенного введения им 0.5 и 1.0 мл 1%-ного раствора ГШ-17**

	Контроль (К) <i>n</i> =6	0.5 мл				1.0 мл			
		Через 10 мин, <i>n</i> =5	% разницы от К	Через 30 мин, <i>n</i> =5	% разницы от К	Через 10 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К	Через 30 мин, <i>n</i> =6	% разницы от К
1	17.5±0.66	25.9±0.63	+48.0	29.1±0.69	+66.3	27.7±0.74	+58.3	34.9±0.91	+99.4
2	33.9±0.91	43.9±1.11	+29.5	59.3±1.18	+75.0	56.3±1.10	+66.1	63.8±1.07	+88.2
3	37.0±0.89	48.0±1.00	+29.7	55.0±1.03	+48.6	59.9±1.04	+62.0	69.0±1.01	+86.5
4	43.0±0.93	59.9±1.03	+39.3	66.6±1.11	+55.0	69.3±1.09	+61.2	76.0±1.01	+76.7

Примечание: $P < 0.001$.

Полученные данные убеждают в исключительной избирательности ингибирующего действия ГШ-17 на ТА исследованных тканей.

В связи с отмеченным следует учесть достаточно высокую степень активности изученного показателя в нормально метаболизирующейся мозговой ткани, с трудом поддающегося воздействию ингибирующего агента. Отмеченные сдвиги обусловлены, по-видимому, исключительно высоким уровнем в мозговой ткани различных категорий ФЛ-глицеридов, наделенных свойствами факторов проагулянтного действия, таких, например, как холинсодержащие фосфолипиды: фосфатидилхолины (ФХ), лизофосфатидилхолины (ЛФХ), сфингомиелины (СФМ), а также фосфатидилэтаноламины (ФЭ) и их лизопроизводные, вписывающиеся в структурную организацию тромбопластинов и выступающие в роли мощных стимуляторов их функциональной активности.

Что касается ТА печеночной и почечной тканей, то не исключено, что и без того низкий уровень в них этого показателя обусловлен, по всей вероятности, присутствием здесь пока нераспознанных факторов антикоагулянтного действия. Мы допускаем возможность синергического действия примененного нами ГШ-17 в отношении известных признанных ингибиторов ТА.

С другой стороны, категория так называемых кислых ФЛ, представленная фосфатидилсеридами (ФС), инозитолсодержащими ФЛ, монофосфоинозотидами (МФИ), полифосфоинозотидами (ПФИ), кардиолипинами (КЛ) и фосфатидными кислотами (ФК), активно комплексуясь с факторами антикоагулянтного действия, как природносуществующими, наподобие гепарина, так и синтетическими [11-14], характеризуется высоким уровнем своего стабилизирующего эффекта на процесс СК. Поэтому нарушения баланса сумм количественных соотношений функционально различных категорий нейтральных ФЛ (ФХ, ЛФХ, СФМ, ФЭ) и кислых представителей этих соединений (ФС, МФИ, ПФИ, КЛ, ФК) чреваты грубыми расстройствами нормального гемокоагуляционного статуса организма, имеющего место при различных экстремальных и патологических состояниях, в частности при тромбозах [15].

Следовательно, согласно нашим наблюдениям, ТА исследованных тканей как и ПВ плазмы

крови экспериментальных животных, демонстрируют отчетливо проявляющуюся зависимость изменчивости от дозы примененного агента и от путей его введения.

Таким образом, полученные результаты позволяют прийти к заключению о ярко выраженных антикоагулянтных свойствах препарата ГШ-17, выяснение тонких молекулярных механизмов которых нуждается в последующем более обстоятельном изучении на предмет выявления особенностей позитивных и негативных эффектов изученного препарата на различные жизненноважные биологические свойства функционирующих систем клетки и организма в целом.

Институт молекулярной биологии НАН РА
Ереванский государственный медицинский университет

Литература

1. Oyama H., Ikeda A., Inouse S. et al. - No To Shinkei. 1999. № 4. V. 51. P. 325-330.
2. Masche U. P., Rentsch K. M., von Felter A. et al. - Eur. Clin. Pharmacol. 1999. № 11. V. 54. P. 857-864.
3. Guy S. R., Magliocca J. F., Fruchtman S. et al. - Transpl. Int. 1999. № 4. V. 12. P. 278-280.
4. Griffin J. H., Kojima K., Banka C. L. et al. - J. Clin. Invest. 1999. № 2. V. 103. P. 219-227.
5. McGlasson D. L., More L., Best H. A. et al. - Clin. Lab. Sci. 1999. № 3. V. 12. P. 137-139.
6. Rashid M., Durie P., Andrew M. et al. - Am. J. Clin. Nutr. 1999. № 3. V. 70. P. 378-382.
7. Dogan I. V., Ovali E., Eti Z. et al. - Anesth. Analg. 1999. № 2. V. 88. P. 432-436.
8. Tsujioka H., Suehiro A., Kakishita E. - Am. Haematol. 1999. № 1. V. 61. P. 34.
9. Pengo V., Biasalo A., Rampazzo P. et al. - Thromb. Res. 1999. № 2. V. 81. P. 256-258.
10. Huang Y. S., Hwang S. J., Chan C. Y. et al. - Chung. Hua. I. Hsueh. Tsa. Chih. 1999. № 6. V. 62. P. 327-333.
11. Карагезян К. Г. Условно-рефлекторная регуляция свертывания крови. Канд. дис. Ереван. 1953. 310 с.
12. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Погосбекова С. Д. В кн.: Липиды в организме животных и человека. М.: Наука, 1974. С. 55-64.
13. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Погосбекова С. Д. и др. - Бюл. эксперим. биол. и мед. 1975. № 8. С. 6-8.
14. Овакимян С. С. Фосфолипиды фибриногена и изменения их содержания в процессе фибринообразования. Автореф. канд. дис. Ереван. 1970. 31 с.
15. Jacobsen E. M., Sandset P. M., Wisloff F. - Tromb. Res. 1999. № 4. V. 94. P. 213-220.

Ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան, Ջ. Ի. Գյոզալյան, Ս. Ս. Հովակիմյան

**Նոր սինթեզված կոմարինային բնույթի միացության հակամակարդիչ
յուրատիպ ֆունկցիոնալ առանձնահատկությունները**

Ջ. Ի. Գյոզալյանի կողմից վերջերս սինթեզված կոմարինային բնույթի ԳՇ-17 պայմանական անվանմամբ միացության 1% լուծույթի 0.5-1.0 մլ ներերակային կամ ներորովայնային ներարկումները սպիտակ առնետներին, հաջորդվում են նրանց արյան պլազմայի պրոտրոմբինային ժամանակի և ուղեղային, սրտամկանային, լյարդային և երիկամային հյուսվածքների տրոմբոպլաստինային ժամանակի հավաստի երկարացմամբ, որը վկայում է նշված նյութի վառ արտահայտված հակամակարդիչ հատկությունների մասին:

Ստացված արդյունքներն առիթ են հանդիսանում նրանց հիմքում թաքնված մոլեկուլային օրինաչափությունների հայտնաբերման և առավել մանրակրկիտ հետազոտությունների զարգացման համար ինչպես արյան, այնպես էլ վերը նշված հյուսվածքների բջիջների, ենթաբջջային գոյացությունների, նրանց թաղանթների, առանձին մոլեկուլների և ամբողջական օրգանիզմի մակարդակով: