

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 621.8.039 + 616.151.5 + 547.587.51

Академик К.Г. Карагезян, А.В. Казарян, Л.В. Едоян, С.С. Овакимян

Молекулярные механизмы антикоагулянтного действия соединений кумариновой природы

(Представлено 30/XI 2005)

Ключевые слова: *тромбонемия, фосфолипиды, тромбопластическая активность, ГШ-17*

Гипопротромбонемия (ГПЕ) рассматривается как патологическое состояние организма различной этиологии и сопровождается ярко выраженным геморрагическим синдромом. Синтезируясь в печени, протромбин (П) демонстрирует высокую чувствительность к ее болезненным состояниям, сопровождающимся сложным переплетением биохимических реакций, ответственных за обеспечение физиологического статуса важнейшего витамин К-зависимого компонента системы гемокоагуляции.

Исследованиями последних лет продемонстрировано антикоагулянтное воздействие ряда молекулярных препаратов типа протеина Ц, оказывающего ингибирующее действие на активность фактора V и стимулируемого, в частности, липопротеидами высокой плотности [1]. Исключительный интерес представляют особенности сдвигов протромбинового времени (ПВ), развивающиеся под влиянием ряда наиболее популярных препаратов антикоагулянтного действия типа варфарина и проявляющиеся в виде ГПЕ, фиксируемой при инициаций патологических отклонений уже на уровне клеточных структур при активном участии β -2-гликопротеина с высоким индексом иммуносупрессорного эффекта, контролируемого стероидными гормонами [2, 3]. Антиоксидантотерапия как эффективный метод коррекции нарушений процесса гемокоагуляции получила широкое распространение в оптимизации состояния интеграции различных категорий фосфолипидов (ФЛ) в структурную организацию П [4].

Целью настоящей работы явилось исследование действия препарата кумаринового ряда под кодовым названием ГШ-17, представляющего собой N-морфолилтиоуреидо-3-карбамоил кумарин с умеренным гепатозащитным действием на дозо- и времязависимую динамику ПВ крови и тромбопластической активности (ТА) мозговой, миокардиальной, печеночной и почечной тканей белых крыс в эксперименте.

Исследования проводили на 120 беспородных белых крысах-самцах массой 180 - 200 г, предварительно голодавших в течение 12 ч и содержавшихся в обычных условиях вивария.

ПВ определяли 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, 30 и 60 мин после внутривенного (*angulus venosus*) и внутрибрюшинного введения 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 и 0.5 мл 1%-ного раствора ГШ-17. Отделенную центрифугированием при 6000 об/мин плазму крови хранили в холодильнике при 4 - 8° С. Расчет ПВ производили в секундах образования сгустка известным методом с использованием раствора Т, изготавливаемого из цельного мозгового гомогената контрольных белых крыс.

После взятия проб крови животных умерщвляли декапитированием под легким эфирным наркозом. На холоду в максимально ограниченные сроки исследуемые органы изолировали, освобождали от оболочек, кровеносных сосудов, а также многократно основательно промывали охлажденным физиологическим раствором и обезживали между прокладками фильтровальной бумаги. Для определения ТА в качестве источника П использовали контрольную плазму крови интактных белых крыс или людей-доноров.

Согласно результатам, приведенным в табл.1, ГШ-17 выступает в качестве эффективного ингибитора активности П, особенно после в/в введения его сверхмалых доз - 0.1 и 0.2 мл 1%-ного раствора. Этот эффект прослеживается уже на 10-й мин после инъекции и выражается в статистически достоверном увеличении ПВ; спустя 30 и тем более 60 мин после инъекции расхождения от величины этого показателя у практически здоровых животных оказываются статистически недостоверными, что свидетельствует о полном восстановлении уровня ПВ.

Для изучения особенностей сдвигов ТА мозговой, миокардиальной, печеночной и почечной тканей проведена сравнительная оценка характера и глубины ее отклонений в зависимости от объекта исследования, дозы примененного агента и длительности его экспозиции.

Как вытекает из табл. 2, контрольная ТА оказывается наиболее высокой в

головном мозге, затем сердечной мышце, печени и, наконец, почках, составляя соответственно 19.0 ± 0.68 , 35.0 ± 0.98 , 39.0 ± 0.66 , 45.0 ± 0.82 с. Начиная с 10-й мин после в/б и особенно в/в введения всех испытанных концентраций 1%-ного раствора ГШ-17, главным образом его сверхнизких доз, обнаруживается статистически достоверное падение ТА во всех исследованных тканях, наиболее обостряющееся спустя 30 и особенно 60 мин после введения препарата. Сдвиги ТА в большей степени выражены при в/в инъекциях.

Полученные данные свидетельствуют об исключительной избирательности ингибирующего действия ГШ-17 на ТА исследованных тканей, а также о высокой степени его активности в нормально метаболизирующей мозговой ткани, с трудом поддающейся воздействию ингибирующего агента. Отмеченные сдвиги обусловлены, по-видимому, исключительно высоким уровнем в мозговой ткани различных категорий ФЛ-глицеридов, наделенных свойствами факторов прокоагулянтного действия, таких, например, как холинсодержащие ФЛ: фосфатидилхолины (ФХ), лизофосфатидилхолины (ЛФХ), сфингомиелины (СФМ), а также фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и их лизопроизводные, вписывающиеся в структурную организацию тромбопластинов и выступающие в роли мощных стимуляторов их функциональной активности.

Низкий уровень ТА печеночной и почечной тканей, по всей вероятности, обусловлен присутствием здесь пока нераспознанных факторов антикоагулянтного действия. Вместе с тем не исключена возможность проявления синергического действия примененного нами ГШ-17 в отношении известных признанных ингибиторов ТА.

Что касается категории так называемых кислых ФЛ, представленной фосфатидилсерины (ФС), МФИ, полифосфоинозитами (ПФИ), кардиолипины (КЛ) и фосфатидными кислотами (ФК), активно комплексуемыми с факторами антикоагулянтного действия, как существующими в природе наподобие гепарина, так и синтетическими [4-7], то она характеризуется высоким уровнем стабилизирующего действия на процесс свертывания крови. Поэтому нарушения баланса 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, имеющими место при различных экстремальных и патологических состояниях, в частности при тромбозах [8].

Таким образом, ТА исследованных тканей и ПВ плазмы крови экспериментальных животных демонстрируют отчетливо проявляющуюся зависимость от дозы примененного агента и от путей его введения; особенно высокая

Таблица 1

Динамика изменения протромбинового времени (в сек) плазмы крови белых крыс с моделированным аллоксаном сахарным диабетом через 10, 30 и 60 мин после внутривенного (1) и внутривенного (2) введения им 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 и 0.5 мл 1% - ного раствора препарата ГПШ-17.

Контроль		0.1 мл		0.2 мл		0.3 мл		0.4 мл		0.5 мл	
здоровые	диабет	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых	% разницы от здоровых
Спустя 10 мин после введения препарата											
1. 16.1±0.51	11.7±0.43	-72.7	12.8±0.44 ^x	-79.5	12.4±0.42 ^x	-77.0	12.1±0.43 ^x	-75.2	11.9±0.44 ^x	-75.9	11.8±0.41 ^x
2. 15.8±0.49	10.9±0.39	-69.0	13.0±0.48 ^x	-82.3	12.6±0.44 ^x	-79.7	12.9±0.44 ^x	-81.6	12.5±0.39 ^x	-79.1	12.1±0.40 ^x
Спустя 30 мин после введения препарата											
1. 16.4±0.55	10.9±0.49	-66.5	14.6±0.59 ^{xx}	-89	13.2±0.41 ^x	-80.5	12.8±0.42 ^x	-78.0	12.2±0.42 ^x	-74.4	12.9±0.41 ^x
2. 16.0±0.48	10.1±0.38	-63.1	15.1±0.47 ^{xx}	-94	13.8±0.43 ^x	-86.3	13.4±0.41 ^x	-83.8	13.0±0.47 ^x	-81.3	13.2±0.42 ^x
Спустя 60 мин после введения препарата											
1. 16.0±0.49	10.1±0.40	-63.1	15.5±0.55 ^{xx} x	-96.6	15.0±0.53 ^{xx}	-96.7	14.6±0.41 ^x	-91.3	13.4±0.41 ^x	-83.8	13.0±0.42 ^x
2. 15.8±0.47	9.5±0.37	60.1	15.6±0.46 ^{xx} x	-98.7	15.2±0.43 ^{xx}	-96.2	14.9±0.40 ^{xx}	-94.3	14.4±0.43 ^x	-91.1	13.7±0.45 ^x

Примечания: n=60; x-p<0.001; xx-p<0.01; xxx-p>0.5

Динамика изменений троболастической активности (в сек ПВ) мозговой (1), миокардиальной (2), печеночной (3) и почечной (4) тканей через 10, 30 и 60 мин после внутривенного (а) и внутримышечного (б) введения им 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, и 0.5 мл 1%-го раствора препарата ГШ-1

Группы	Контроль (К)		0.1 мл	% Разницы от (К)	0.2 мл	% Разницы от (К)	0.3 мл	% Разницы от (К)	0.4 мл	% Разницы от (К)	0.5 мл	% Разницы от (К)
	здоровые	длавет										
Спустя 10 мин после введения препарата												
1 а	19.0±0.68	11.3±0.61 ^х	-40.5	13.3±0.63 ^х	-30	12.2±0.61 ^х	-32.1	12.6±0.59 ^х	-33.7	12.2±0.63 ^х	11.9±0.61 ^х	-35.8
1 б	19.8±0.66	11.6±0.60 ^х	-41.4	13.9±0.61 ^х	-29.8	13.4±0.60 ^х	-32.3	13.5±0.60 ^х	-31.8	13.7±0.61 ^х	13.8±0.61 ^х	-30.8
2 а	35.0±0.98	29.3±0.91 ^х	-16.3	31.1±0.89 ^х	-11.0	30.3±0.90 ^х	-13.4	30.1±0.91 ^х	-14.0	30.0±0.91 ^х	30.1±0.89 ^х	-14.3
2 б	35.6±0.97	28.8±0.93 ^х	-19.1	32.3±0.87 ^х	-9.0	30.9±0.91 ^х	-13.2	30.4±0.90 ^х	-14.4	30.2±0.89 ^х	30.0±0.87 ^х	-15.2
3 а	39.0±0.66	31.3±0.67 ^х	-19.7	34.4±0.67 ^х	-11.8	34.0±0.65 ^х	-12.8	33.6±0.67 ^х	-13.8	32.8±0.66 ^х	32.9±0.67 ^х	-15.9
3 б	39.7±0.93	32.7±0.69 ^х	-17.6	34.9±0.69 ^х	-19.1	34.3±0.67 ^х	-13.6	33.9±0.65 ^х	-14.6	33.1±0.67 ^х	33.3±0.67 ^х	-16.4
4 а	45.0±0.82	37.7±0.81 ^х	-16.2	40.3±0.81 ^х	-10.0	39.8±0.80 ^х	-11.6	39.1±0.78 ^х	-13.1	38.6±0.79 ^х	38.0±0.77 ^х	-14.2
4 б	45.7±0.88	39.2±0.83 ^х	-14.2	41.0±0.83 ^х	-10.3	40.5±0.81 ^х	-12.4	39.6±0.77 ^х	-13.1	39.1±0.77 ^х	38.6±0.75 ^х	-14.4
Спустя 30 мин после введения препарата												
1 а	18.9±0.67	11.0±0.59 ^х	-41.8	16.6±0.61 ^х	-12.2	13.6±0.60 ^х	-29.1	13.1±0.57 ^х	-32.5	12.8±0.61 ^х	12.4±0.63 ^х	-32.3
1 б	19.4±0.66	11.8±0.60 ^х	-39.2	17.1±0.60 ^х	-11.9	14.1±0.61 ^х	-27.3	13.9±0.59 ^х	-28.4	13.9±0.63 ^х	14.1±0.61 ^х	-29.4
2 а	34.9±0.93	29.6±0.62 ^х	-15.2	32.0±0.83 ^х	-8.3	31.2±0.89 ^х	-10.6	30.6±0.59 ^х	-12.3	30.9±0.90 ^х	31.0±0.87 ^х	-11.5
2 б	35.3±0.91	28.1±0.90 ^х	-20.4	32.9±0.81 ^х	-6.8	31.9±0.89 ^х	-9.6	31.5±0.87 ^х	-10.8	31.4±0.87 ^х	31.7±0.85 ^х	-11.0
3 а	38.6±0.65	31.0±0.66 ^х	-19.7	35.7±0.67 ^х	-7.5	35.2±0.66 ^х	-8.8	34.1±0.68 ^х	-11.7	34.8±0.67 ^х	33.9±0.67 ^х	-9.2
3 б	39.3±0.69	32.9±0.67 ^х	-16.6	36.4±0.68 ^х	-7.4	35.7±0.68 ^х	-9.2	34.7±0.67 ^х	-11.7	33.1±0.67 ^х	34.5±0.68 ^х	-8.2
4 а	44.9±0.81	37.9±0.83 ^х	-15.6	41.7±0.81 ^х	-7.1	40.9±0.81 ^х	-8.9	39.6±0.79 ^х	-11.8	39.9±0.77 ^х	39.0±0.77 ^х	-11.3
4 б	45.9±0.82	39.1±0.81 ^х	-14.6	41.0±0.83 ^х	-6.3	42.3±0.80 ^х	-7.6	40.3±0.77 ^х	-12.0	41.8±0.76 ^х	43.3±0.75 ^х	-8.7
Спустя 60 мин после введения препарата												
1 а	19.1±0.67	11.5±0.57	-39.8	18.3±0.63 ^х	-4.2	16.5±0.61 ^х	-13.6	14.0±0.56 ^х	-26.7	13.0±0.61 ^х	12.8±0.61 ^х	-29.0
1 б	20.0±0.67	11.7±0.59	-41.5	19.2±0.67 ^х	-4.0	17.3±0.61 ^х	-13.5	14.8±0.57 ^х	-26.0	14.1±0.63 ^х	14.9±0.63 ^х	-29.5
2 а	35.2±0.91	29.9±0.63	-15.1	34.7±0.91 ^х	-1.4	32.1±0.79 ^х	-8.8	31.1±0.85 ^х	-11.6	31.3±0.90 ^х	32.0±0.83 ^х	-11.0
2 б	35.9±0.91	28.9±0.61	-19.5	35.5±0.93 ^х	-1.1	32.9±0.77 ^х	-8.4	32.3±0.87 ^х	-10.0	31.9±0.87 ^х	32.9±0.85 ^х	-11.2
3 а	39.1±0.67	31.4±0.65	-19.7	37.4±0.65 ^х	-4.4	37.0±0.65 ^х	-5.4	34.5±0.67 ^х	-11.8	35.3±0.67 ^х	34.8±0.66 ^х	-9.7
3 б	39.9±0.69	33.3±0.64	-16.5	38.7±0.67 ^х	-3.0	37.5±0.67 ^х	-6.0	35.2±0.68 ^х	-11.8	36.1±0.67 ^х	35.9±0.69 ^х	-9.5
4 а	45.1±0.81	37.8±0.81	-16.2	43.7±0.83 ^х	-3.1	41.5±0.80 ^х	-8.0	40.9±0.81 ^х	-9.3	41.3±0.77 ^х	41.0±0.80 ^х	-8.4
4 б	46.7±0.82	38.9±0.83	-16.3	44.8±0.81 ^х	-2.0	43.6±0.81 ^х	-6.6	42.8±0.82 ^х	-8.4	43.4±0.76 ^х	42.4±0.81 ^х	-7.0

Примечания: n=60; остальные обозначения те же, что в табл. 1.

терапевтическая эффективность констатируется при введении сверхнизких доз препарата в полном соответствии с развиваемой в последнее время концепцией об исключительно высокой функциональной активности сверхнизких доз факторов химической и физической природы [9-17], получившей подтверждение в результатах наших последних исследований [18].

Институт молекулярной биологии НАН РА

**Ակադեմիկոս Կ.Գ. Ղարազյոզյան, Ա.Վ. Ղազարյան, Լ. Վ. Եդոյան,
Ս.Ս. Նովակիմյան**

**Կումարինային շարքին պարկանող միացությունների հակամակարդիչ
ազդեցության մոլեկուլյար մեխանիզմները**

Ուսումնասիրությունների արդյունքով ցույց է տրված կումարինային միացությունների շարքին պարկանող ԳՇ-17 միացության կարգավորիչ դերը՝ սպիտակ առնետների մոտ ալոքսանով մոդելացված շաքարախտի պայմաններում փեղի ունեցող արյան մակարդունակության բարձրացման գործում: ԳՇ-17-ը պրոթրոմբինի ակտիվության արդյունավետ ինգիբիտոր է մանավանդ նրա զերցածր ներերակային ներարկման ժամանակ: Ցույց է տրված նաև միացության ազդեցությունը փրոմբոպլաստիկ ակտիվության վրա:

Academician K.G. Karageuzyan, A.V. Ghazaryan, S.S. Hovakimyan, L.V. Edoyan

Molecular Mechanism of Anticoagulant Action of Compounds with Coumarin Nature

Our data obtained have shown that GSh-17 preparation with coumarin nature demonstrates the pronounced normalizing effect under the conditions hiperhemacoagulation taking place at experimental diabetes mellitus, modulated by alloxan. GSh-17 is a effective inhibitor of prothrombin activity especially at its intravenous introduction in midget dozes that is shown by full restoration prothrombin time. It has been shown also selectively inhibition action of a preparation on tromboplasthic activity in different tissue.

Литература

1. *Griffin J.H., Kojima K., Banka C. L. et al.* - J. Clin. Invest. 1999. N 2. V. 103. P. 219-227.
2. *McGlasson D.L., More L., Best H. A. et al.* - Clin. Lab. Sci. 1999. N 3. V. 12.

Р. 137-139.

3. *Rashid M., Durie P., Andrew M. et al.* - Am. J. Clin. Nutr. 1999 N 3. V. 70. P. 378-382.

4. *Pengo V., Basilio A., Rampazzo P. et al* - Thromb. res. 1999. N 2 V. 81. P. 256-258.

5. *Карагезян К.Г.* Условнорефлекторная регуляция свертывания крови. Канд. дис. Ереван. 1954. 310 с.

6. *Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Погосбеков С.Д.* В кн.: Липиды в организме животных и человека. М. Наука, 1974. С. 55-64.

7. *Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Погосбеков С.Д.* - Бюл. эксперим. биол. и мед. 1975. N 8. С. 6-8.

8. *Овакимян С.С.* Фосфолипиды фибриногена и изменения их содержания в процессе фибринообразования. Автореф. канд. дис. Ереван. 1970. 31 с.

9. *Бурлакова Е.Б.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 3-11.

10. *Духович Ф.С., Горбатова Е.Н., Курочкин В.К., Петрунин В.А.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 12-15.

11. *Блюменфельд Л.А.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 15-20.

12. *Ашмарин И.П., Лелекова Т.В.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 21-28.

13. *Клемкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусинина М.М., Рыбакова Е.Ю.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 34-39.

14. *Ло Ш., Ли В.,* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 44-48.

15. *Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 49-54.

16. *Пальмин Н.П., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И., Бурлакова Е.Б.* - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 55-63.

17. Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной пероксидации в мембранах клеток головного мозга - Рос. хим. журнал. 1999. Т. 43. С. 63-71.

18. *Едоян Л.В.* Качественно-количественные нарушения фосфолипидов субклеточных образований гепатоцитов аллоксандиабетических белых крыс и корректирующее действие сверхнизких доз факторов химической и физической природы. Автореф. канд. дис. Ереван. 2004. 26 с.