

УДК 615.03+615.21+616.831-005.4+612.824+612.11.7

Эффекты конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином и афобазола на агрегацию тромбоцитов

Н.Р.Мирзоян

*Кафедра клинической фармакологии ЕГМУ им. М. Гераци
0025, Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, ГАМК, конъюгат ГАМК с докозагексаеноилдофамином, афобазол

Цереброваскулярные расстройства продолжают занимать одно из первых мест во всем мире в качестве причины смерти и инвалидизации населения. Тот факт, что применяемые в настоящее время лекарства для лечения этих расстройств не обладают достаточной эффективностью, делает проблему фармакотерапии ишемических поражений мозга чрезвычайно важной и социально значимой.

Вместе с тем известно, что важную роль в кровоснабжении мозга играют агрегационные свойства крови [4]. Гемостаз реализуется плазменным и клеточным компонентами, которые находятся в тесном взаимодействии. Важная роль в клеточном гемостазе принадлежит тромбоцитам. Хорошо известна также антиагрегационная активность полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). В соответствии с этим, важным представляются изыскание и изучение новых производных ПНЖК с целью выявления более эффективных противотромботических средств. Одним из способов синтеза таких дериватов ПНЖК явилась направленная химическая модификация полиеновых кислот с введением в их молекулы различных биологически-активных радикалов, которая проводилась сотрудниками лаборатории оксипиринов (зав. - д.х.н. В. В. Безуглов) Института биоорганической химии им. Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина РАН, в результате чего был синтезирован докозагексаеноилдофамин.

Проведенными ранее исследованиями были получены данные, указывающие на наличие у докозагексаеноилдофамин выраженной цереброваскулярной и антиагрегационной активности [2,3]. Учитывая то, что одним из наиболее эффективных путей фармакологической коррекции цереброваскулярных расстройств считается стимуляция ГАМК-рецепторов мозга, которая усиливает активность тормозной системы ГАМК, восстанавливая нарушенный ишемией баланс между

возбуждающими и тормозными процессами, и одновременно понижает тонус сосудов мозга, улучшая кровоснабжение мозга [5], в вышеуказанной лаборатории был синтезирован конъюгат ГАМК и докозагексаеноилдофамина (ГАМК-ДГК-ДА). Выбор этого производного ГАМК обусловлен его возможным влиянием не только на систему ГАМК, но и на агрегацию тромбоцитов, так как повышение коагулологического потенциала крови также играет важную роль в возникновении и развитии цереброваскулярных заболеваний.

Предыдущими исследованиями было выявлено нейропротекторное действие разработанного в Институте фармакологии под руководством академика РАМН С.Б. Середина селективного анксиолитика афобазола в условиях локальной ишемии мозга, вызванной окклюзией средней мозговой артерии у крыс [1,6]. Впоследствии нами была выявлена также способность афобазола усиливать микроциркуляцию головного мозга. Причем было установлено, что в реализации цереброваскулярного и нейропротекторного действия афобазола важную роль играет система ГАМК.

В соответствии с вышеизложенным, представляло интерес изучение антиагрегационной активности конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином и афобазола. Исследование было проведено совместно с сотрудниками лаборатории патологии и фармакологии гемостаза Гематологического научного центра РАМН Т.М. Васильевой, Г.Н. Петрухиной и В.А. Макаровым

Материал и методы

Для оценки антиагрегационных свойств рабочие растворы исследуемых соединений готовили путем разведения исходных образцов дистиллированной водой до достижения необходимой концентрации. Эксперименты были выполнены на богатой тромбоцитами плазме, полученной из донорской крови по стандартной процедуре. Агрегация тромбоцитов исследовалась на агрегометре фирмы "Chrono-Log Corrogation" (США) по методу G. Ворн [7]. С этой целью в кювету прибора помещали 450 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Оптическим контролем служил такой же объем плазмы, не содержащей тромбоцитов. О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции (A_{\max}) по сравнению с исходной величиной. Исследуемое вещество добавляли в кювету агрегометра, инкубировали в течение 5-ти минут при 37°C и затем индуцировали процесс тромбоцитарной агрегации. В качестве контрольных образцов использовали богатую плазму тех же доноров.

В качестве проагрегантов в работе использовали АДФ (Boehringer Mannheim, Австрия) в конечной концентрации 1×10^{-5} М, адреналин

(Reanal, Венгрия) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл и арахидоновую кислоту в конечной концентрации 1×10^{-3} М.

Результаты исследования обрабатывали методом вариационной статистики с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы «Biostat».

Результаты и обсуждение

Конъюгат ГАМК с докозагексаеноилдофамином

Конъюгат ГАМК с докозагексаеноилдофамином ингибировал АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов во всем диапазоне исследованных концентраций. При этом в концентрации 1 мМ ГАМК с докозагексаеноилдофамином снижал агрегацию в 4,8 раза по сравнению с контролем. Заметное антиагрегационное влияние конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином сохранялось и при его использовании в более низких концентрациях. Так, в концентрации 0,01 мМ ГАМК с докозагексаеноилдофамином уменьшал тромбоцитарную активность в 1,7 раза по сравнению с контрольным опытом. При использовании в качестве индуктора агрегации АДФ конъюгат ГАМК с докозагексаеноилдофамином вызывал незначительное ингибирование тромбоцитарного взаимодействия (в 1,3 раза) только в максимальной изученной концентрации 1 мМ (табл. 1).

Следует отметить, что конъюгат ГАМК с докозагексаеноилдофамином обладал менее выраженной антиагрегационной способностью, чем докозагексаеноилдофамин, оказавшимся наиболее активным соединением в ряду синтетических производных полиненасыщенных жирных кислот, исследованных ранее [2].

Таблица 1
Влияние конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином и докозагексаеноилдофамина на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* (A_{max} , %)

Контроль	Концентрация конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином, мМ				Концентрация докозагексаеноилдофамина, мМ		
	1	0,5	0,1	0,01	0,2	0,02	0,002
АК (1×10^{-3} М) 52,6±1,5	11,0±3,7*	16,3±4,0*	25,3±3,1*	29,9±2,3*	2±1*	19±8*	41±3
АДФ (1×10^{-3} М) 63,9±2,3	50,6±2,6*	57,6±2,6	58,6±5,5	61,2±4,9	45±2*	45±2*	51±3

* достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Афобазол

Афобазол заметно ингибировал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* лишь в максимальных исследованных концентрациях (0,5 мг/мл и 1 мг/мл): тромбоцитарная активность снижалась с $52,0 \pm 5,1\%$ в контрольном эксперименте до $10,4 \pm 2,1\%$ и $26,0 \pm 3,7\%$, соответственно (табл. 2). В случае АК-индуцированной агрегации афобазол в данных концентрациях полностью подавлял взаимодействие тромбоцитов. При инкубировании богатой тромбоцитами плазмы с более низкими концентрациями афобазола (0,25 мг/мл и 0,1 мг/мл) наблюдалось уменьшение агрегации, индуцированной арахидоновой кислотой, в 3,3 и 2,4 раза соответственно (табл. 3).

Следовательно, афобазол проявляет антиагрегационные свойства при его использовании в высоких концентрациях.

Таблица 2

Влияние на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ (1×10^{-5} М) *in vitro* (A_{max} , %)

АДФ 1×10^{-5} М (контроль)	Концентрация афобазола, мг/мл			
	1	0,5	0,1	0,01
$52,0 \pm 5,1$	$10,4 \pm 2,1^*$	$26,0 \pm 3,7^*$	$43,9 \pm 3,3$	$47,7 \pm 3,4$

* достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Таблица 3

Влияние на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную арахидоновой кислотой (1×10^{-3} М) *in vitro* (A_{max} , %)

АК 1×10^{-3} М (контроль)	Концентрация афобазола, мг/мл				
	1	0,5	0,25	0,1	0,01
$77,5 \pm 4,5$	0 *	0*	$23,2 \pm 7,5^*$	$31,7 \pm 9,7^*$	$71,0 \pm 6,4$

* достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что конъюгат ГАМК с докозагексаеноилдофамином обладает заметной антиагрегационной активностью, но она менее выражена, чем у докозагексаеноилдофамина. Антиагрегационные свойства афобазола проявляются лишь при использовании высоких концентраций препарата. Выявленные неодинаковые антиагрегационные эффекты конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином и афобазола несомненно следует отнести к их положительным свойствам, так как повышение активности свертывающей системы крови относится к факторам риска в развитии цереброваскулярных и других сердечно-сосудистых заболеваний.

Обнаруженная нами в предыдущих исследованиях характерная особенность агониста ГАМК – афобазола и производного ГАМК – конъюгата ГАМК с докозагексаеноилдофамином в значительно большей степени усиливать кровоснабжение ишемизированного мозга по сравнению с интактным [3] и выявленные антиагрегационные свойства этих препаратов создают экспериментальную базу для разработки и внедрения нового комплексного подхода к фармакотерапии цереброваскулярных расстройств. Это стратегия поиска новых цереброваскулярных препаратов, основанная на сочетанном воздействии как на систему ГАМК, включающую в себя тормозную систему ЦНС и тонус мозговых сосудов, так и на агрегацию тромбоцитов.

Поступила 25.07.08

Դոկոզահեքսանոյլդոպամինով ԳԱԿԹ լծորդիչի և աֆոբազոլի ազդեցութիւնը թրոմբոցիտների ագրեգացիայի վրա

Ն.Ռ. Միրզոյան

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է դոկոզահեքսանոյլդոպամինով ԳԱԿԹ լծորդիչի և ԳԱԹԿ-խթանիչ աֆոբազոլի ազդեցութիւնը թրոմբոցիտների ագրեգացիայի վրա: Դոկոզահեքսանոյլդոպամինով ԳԱԿԹ լծորդիչը ցուցաբերել է հակաագրեգանտային ակտիվություն: Աֆոբազոլն ընկճում է թրոմբոցիտների ագրեգացիան միայն բարձր կոնցենտրացիաներով:

The effects of GABA-docosahexaenoyldopamine conjugate and afobazol on platelet aggregation

N.R.Mirzoyan

This study is dedicated to research of the effects of GABA-docosahexaenoyldopamine conjugate and GABA-agonist afobazol on platelet aggregation. GABA-docosahexaenoyldopamine conjugate has shown antiaggregatory activity. Only high concentrations of afobazol inhibit the platelet aggregation.

Литература

1. Баласанян М.Г. Изучение роли оксида азота в механизмах нейропротекторного и анксиолитического действия афобазола в сравнительном аспекте. Дис. док. фарм. наук. Ереван, 2003.
2. Васильева Т.М., Петрухина Г.Н., Макаров В.А., Мифтахова Н.Т. и др. Влияние дофаминамидов полиненасыщенных жирных кислот на свертывающую систему крови и мозговое кровообращение. Экспер. и клин. фармакол., 2002, 65, 6, с. 41-45.

3. *Васильева Т.М.* Влияние производных полиненасыщенных жирных кислот, антитромбоцитарных антител и гидролизата фибрин-мономера на агрегацию тромбоцитов. Автореферат канд. дис., М., 2003.
4. *Габриелян Э.С., Амроян Э.А.* Вазоактивные простагландины в гомеостазе мозгового кровообращения. Ереван, 1983.
5. *Ганьшина Т.С., Курдюмов И.Н., Силкина И.В., Грецкая Н.М., Дружинина А.А.* Влияния производных ГАМК на кровоснабжение мозга крыс в условиях экспериментальных цереброваскулярных расстройств. Мат. III Съезда фармакологов России, С-Пб., 23-27 сентября; 2007, ч. 1, с. 1-652-1-653.
6. *Топчян А.В.* Фармакологическая коррекция кровоснабжения и функционального состояния мозга при его локальном ишемическом поражении. Дисс. док. мед. наук, М., 1998.
7. *Born G.V.R.* Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962, 194, 5, p. 927-929.