

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ГЕМОБИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО КСАНТИНА

А. А. Спасов, Л. В. Науменко, Ф. А. Халиуллин

Кафедра фармакологии ВолГМУ

Реология крови имеет важное значение для понимания многих патологических феноменов микроциркуляции. Существует целый ряд факторов, которые могут непосредственно влиять на реологические свойства крови. К ним относятся, прежде всего, вязкость плазмы и ее белковый состав, гематокрит, агрегация эритроцитов, способность эритроцитов адаптироваться кровотоку (деформируемость эритроцитов) [1, 4, 6]. Микрореологические свойства крови нарушаются при сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваниях, злокачественных опухолях, гнойно-воспалительных заболеваниях и других видах патологии. Успешное лечение этих заболеваний связано, в том числе, с устранением гемореологических нарушений. Однако число лекарственных препаратов, в основе механизма действия которых лежит влияние на деформабельность и агрегацию форменных элементов крови, весьма ограничено. Это определяет актуальность поиска лекарственных средств, способных корректировать данные нарушения.

В проведенных ранее исследованиях среди производных ксантина был выявлен ряд гемореологически активных соединений [5, 8]. Из этих веществ было выбрано наиболее активное соединение под лабораторным шифром С-83, которое по влиянию на основные гемореологические параметры не уступало, а по некоторым значительно превосходило пентоксифиллин. Причем наибольшая активность для данного соединения была установлена именно на патологических моделях, таких как сахарный диабет, адьювантный артрит.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать влияние соединения С-83 на основные гемореологические параметры – деформабельность и агрегацию форменных элементов крови.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах *in vitro* гемореологические нарушения моделировали с помощью гипертермии [7] с использованием крови кроликов.

Для этого пробы в объеме 1 мл помещали в термостат и инкубировали при 42,5 °С в течение 60 мин. Объектом исследования явилось соединение под лабораторным шифром С-83, относящееся к производным ксантина, синтезированное на кафедре фармацевтической химии Башкирского государственного университета. Изучаемое вещество добавлялось к образцам крови в конечных концентрациях  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  моль/л. В качестве препарата сравнения использовался пентоксифиллин в эквимольной концентрации. К контрольным образцам добавлялся теплый физиологический раствор натрия хлорида в аналогичном объеме – 10 мкл.

Измерения производились на вискозиметре АКР-2 (Россия). Влияние веществ на агрегацию эритроцитов оценивали по индексу агрегации, рассчитываемому как отношение вязкости крови при скорости сдвига 3 обратных секунды ( $\text{с}^{-1}$ ) к вязкости крови при  $100 \text{ с}^{-1}$ .

Определение заряда и микровязкости мембраны эритроцитов проводилось на спектрофлуориметре "Хитачи MPF-400" (Япония) с использованием положительно заряженного зонда *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ<sup>+</sup>) и *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-гексилпиридиния (ДСП-6) [2]. Флуоресценцию зонда в суспензии эритроцитов возбуждали и регистрировали при длинах волн 480 и 580 нм соответственно.

Влияние веществ на деформабельность эритроцитов оценивали вискозиметрическим методом при стандартизированном гематокрите 45 %. Предварительно исследуемые соединения в концентрациях  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  моль/л инкубиро-

вали в течение 30 мин с трижды отмытыми буфером красными клетками крови.

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научно-производственной фирмы "Биола" (г. Москва) по методу G. Vogt в модификации З. А. Габбасова и соавт. (1989). В качестве индуктора агрегации использовался 5 мкМ АДФ.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни и ANOVA (Newman-Keuls test) в статистических программах "Statistika 5.0" и программного обеспечения "Microsoft Excell 2000".

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было выявлено, что соединение С-83, добавленное к пробам, приводило к достоверному снижению индекса агрегации эритроцитов во всем диапазоне исследуемых концентраций. Кроме того, изучена зависимость эффекта от концентрации, и рассчитаны показатели концентраций, вызывающих 20 % от максимального эффекта ( $EC_{20}$ ), который у вещества С-83 превышал препарат сравнения в 1,3 раза, что свидетельствует о его превосходстве над пентоксифиллином по антиагрегантной активности. Известно, что большое значение в процессе агрегации имеет величина заряда эритроцита.

Снижение отрицательного заряда и, как следствие, электрофоретической подвижности эритроцитов свидетельствует об изменении реологических свойств крови. Проведенные исследования с помощью положительно заряженного зонда ДСМ<sup>+</sup> продемонстрировали высокую степень влияния соединения С-83 и пентоксифиллина на флуоресценцию зонда ДСМ<sup>+</sup>. При этом изучаемое вещество не уступало препарату сравнения по интенсивности флуоресценции (рис. 1). Можно полагать, что полученные данные могут свидетельствовать об увеличении электроотрицательности мембран эритроцитов под влиянием изучаемых соединений. Важным процессом агрегации микрореологическим параметром является деформируемость красных клеток крови – способность эритроцита изменять свою форму в ответ на деформирующее усилие. В результате проведенного исследования выявлено, что соединение С-83 достоверно по отношению к прогретым образцам крови кроликов, увеличивает скорость фильтрации эритроцитов на 24,8 % (рис. 2).

Пентоксифиллин повышал способность эритроцитов к деформации на 20,91 % ( $p <$

0,05).

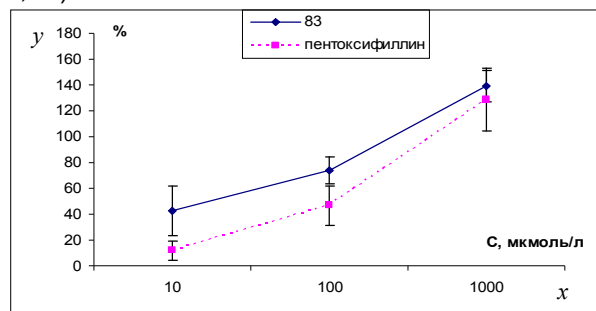


Рис. 1. Влияние соединения С-83 и пентоксифиллина в различных концентрациях на интенсивность флуоресценции зонда ДСМ<sup>+</sup> во взвеси эритроцитов кроликов:

x – концентрация изучаемых соединений (мкмоль/л); y – изменение интенсивности флуоресценции ( $\Delta$  %).

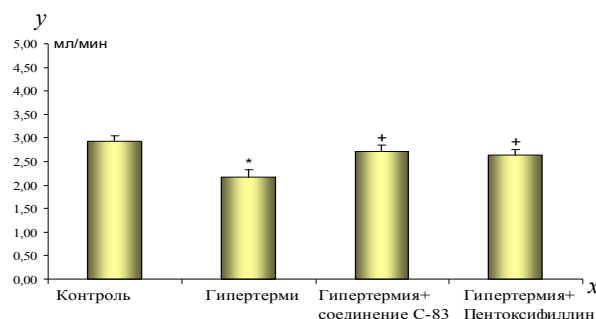


Рис. 2. Влияние соединений С-83 и пентоксифиллина на скорость фильтрации взвеси отмытых эритроцитов прогретых образцов крови кроликов (42 °С, 1 ч),  $M \pm m$ : x – контрольные образцы и пробы с изучаемыми соединениями;

y – скорость фильтрации эритроцитарной взвеси (мл/мин); \* – данные достоверны по отношению к контрольным образцам крови кроликов (Критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ ); + – данные достоверны по отношению к образцам крови кроликов, обработанных методом теплового воздействия (42,5 °С, 1 ч) (Критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ )

В свою очередь, это свидетельствует о повышении деформабельности эритроцитов. Установление механизма влияния исследуемых соединений на деформабельность эритроцитов методом вискозиметрии взвеси отмытых эритроцитов позволило определить следующее. Так, при добавлении исследуемых соединений в прогретые образцы крови кроликов в концентрациях  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л наблюдается снижение вязкости при различных скоростях сдвига (см. табл.). Вискозиметрические методики с использованием ротационных вискозиметров позволяют выделить отдельно участие клеточной поверхности и внутреннего содержимого эритроцитов в их деформируемости [4]. Наибольшее влияние на данный показатель соединения оказывают при низких скоростях сдвига, где главными

определяющими являются вязкость самой мембраны и клеточная геометрия. Также вы-

явлена зависимость реологического эффекта от концентрации соединений.

**Влияние соединений С-83 и пентоксифиллина на вязкость взвеси отмытых эритроцитов, в образцах крови кроликов, обработанных методом теплового воздействия, при различных скоростях сдвига, СПз ( $M \pm m$ )**

Соединение	Концентрация, моль/л	Скорость сдвига, с		
		300	30	3
Контроль	–	2,26±0,1	3,14±0,23	5,74±0,41
Гипертермия	–	2,86±0,06*	4,26±0,15*	7,90±0,47*
Гипертермия	$1 \cdot 10^{-4}$	2,40±0,15**	3,36±0,22**	6,26±0,42**
+	$1 \cdot 10^{-5}$	2,48±0,12**	3,40±0,36**	6,42±0,69**
Соединение С-83	$1 \cdot 10^{-6}$	2,68±0,19	3,48±0,32**	6,58±0,33**
Гипертермия	$1 \cdot 10^{-4}$	2,62±0,13	3,46±0,24**	6,34±0,28**
+	$1 \cdot 10^{-5}$	2,48±0,08**	3,52±0,25**	6,58±0,28**
Пентоксифиллин	$1 \cdot 10^{-6}$	2,58±0,10**	3,64±0,41	6,82±0,41**

Примечание. Данные статистически достоверны ( $p < 0,05$ ):

\* – по отношению к контролю (Критерий Стьюдента);

\*\* – по отношению к гипертермии (Критерий Стьюдента).

Исследуемое соединение оказывало выраженное влияние на показатель анизотропии флуоресценции – оптический эквивалент вязкости мембраны в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ . Однако достоверно по отношению к контролю оказывало влияние на данный показатель лишь в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$ , а в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  и  $1 \cdot 10^{-6}$  уступал по активности пентоксифиллину ( $p < 0,05$ ).

Не менее важное значение в нарушении внутрисосудистого гомеостаза играет и функциональное состояние тромбоцитов – центрального звена гемокоагуляции. Соединение С-83 снижало индекс агрегации тромбоцитов на 43,5 %, превосходя пентоксифиллин на 42,5 % ( $p < 0,05$ ). Индекс дезагрегации исследуемые соединения в равной степени повышали на 9,63 %. Скорость агрегации тромбоцитов снижалась на 27,7 % для соединения С-83, а для пентоксифиллина повышалась на 25,6 %.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлено, что в основе механизма действия соединения С-83 лежит его мембранотропная активность (повышение электроотрицательности мембраны эритроцитов, уве-

личение их деформируемости). Кроме того, гемореологическая активность соединения С-83 определяется и его ингибирующим влиянием на процессы агрегации тромбоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Викулов А. Д., Мельников А. А., Багракова С. В. // Физиология человека. – 2003. – Т. 29, № 4. – С. 76–83.
2. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов – М.: Наука, 1989. – 277 с.
3. Катюхин Л. Н. // Авиакосмос и экологическая медицина. – 2002. – № 1. – С. 64–67.
4. Катюхин Л. Н., Ганелина И. Е., Олесин А. И. и др. // Физиол. чел. – 1996. – Т. 22, № 6. – С. 95–99.
5. Науменко Л. В., Арькова Н. В., Степанов А. В. // Матер. IX регион. конф. молодых исследователей Волгоградской области. – Волгоград, 2005. – С. 12–13.
6. Петрищев Н. Н., Власов Т. Д., Сиповский В. Г. и др. // Кардиология. – 2001. – № 10. – С. 53–56.
7. Плотников М. Б., Колтунов А. А., Алиев О. И. // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1996. – Т. 59, № 6. – С. 54–55.
8. Сласов А. А., Науменко Л. В., Арькова Н. В. и др. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2005. – Вып. 60. – С. 422–423.

© А. А. Сласов, Л. В. Науменко, Ф. А. Халиуллин, 2006