

ФАРМАКОЛОГИЯ. ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 616.151.5-092.9:546.46:615.356

ВЛИЯНИЕ МАГНИЯ L-АСПАРАГИНАТА И ЕГО КОМБИНАЦИИ С ВИТАМИНОМ В₆ НА ПРОЦЕССЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ МАГНИЙДЕФИЦИТНОЙ ДИЕТЫ

И. Н. Иежица, М. С. Кравченко, А. А. Спасов, М. В. Харитонов,
А. Ю. Стуковина, Л. В. Науменко

Кафедра фармакологии и НИИ фармакологии ВолГМУ

Впервые о возможном угнетающем действии магния (Mg) на свертывающую систему крови сообщил Shionoya в 1927 г. [9]. С тех пор было проведено множество исследований с целью объяснения механизма влияния магния на процессы свертывания крови, агрегацию тромбоцитов и фибринолиз. Так, в условиях гипомagneзиемии у животных отмечены увеличение АДФ-индуцированной и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, снижение уровня антитромбина-3, протеина S, тромбоксана В₂, протеина С и эндотелина-1 [8, 10, 11].

Несмотря на возрастающий интерес к роли магния в патогенезе гемобиологических нарушений, к настоящему времени в сравнительном аспекте влияние различных магниевых солей на процессы агрегации тромбоцитов в условиях дефицита магния не изучалось.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить влияние Mg L-аспарагината и комбинации Mg L-аспарагината с витамином В₆ на процессы агрегации тромбоцитов животных при пероральном введении в условиях алиментарного дефицита магния.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на 91 белой беспородной крысе-самце с исходной массой 170–250 г. Первая "интактная" группа животных составляла контроль. Для моделирования гемобиологических изменений у остальных крыс вызывали алиментарный дефицит магния с помощью специальной магнийдефицитной диеты фирмы "ICN Biomedicals Inc." (Aurora, Ohio, США). Состав диеты полностью соответствовал рекомендациям Специализированного Комитета по Стандар-

там США в исследованиях питания [6]. Весь рацион готовился на деионизированной воде, эту же воду в ходе эксперимента использовали в качестве питьевой воды для животных, находящихся на диете. Интактные животные получали воду (содержание магния 20 мг/л) и полноценную диету, содержащую 0,5 г элементарного магния на кг диеты.

Скорость и глубину развития гипомagneзиемии контролировали, определяя содержание магния в плазме и эритроцитах животных спектрофотометрическим методом по цветной реакции с титановым желтым [5]. При снижении концентрации магния ниже 1,4 ммоль/л в эритроцитах и ниже 0,7 ммоль/л в плазме считалось, что у животных развилась гипомagneзиемия средней тяжести. После чего исследуемые соли магния – Mg L-аспарагинат и Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином В₆ и препарат сравнения "Магне В₆[®]" (Mg лактат с витамином В₆) – вводились перорально (в дозе 50 мг элементарного магния на кг веса животного) в течение 20 дней до полной компенсации уровня магния в плазме и эритроцитах. Витамин В₆ добавлялся к субстанции Mg L-аспарагината в дозе 5 мг/кг веса животного, таким образом, соотношение пиридоксина и элементарного магния составляло 1:10. Забор крови для определения концентрации магния в плазме и эритроцитах проводили сразу после установления выраженного дефицита магния, а затем на 1, 3, 6, 9, 13 и 20-й день введения солей магния.

После 20-дневного курса введения солей магния у животных под эфирным наркозом производился забор крови из брюшной аорты. Кровь стабилизировали 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 1:9. Агрегацию тромбоцитов исследовали на богатой тромбоцитами плазме [4] с помощью двухканального лазерного анализатора

агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научно-производственной фирмы "Биола" (Россия) по методу G. Born (1962) в модификации З. А. Габбасова и соавт. (1989) [7]. Подсчет количества тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме проводился в камере Горяева при помощи микроскопа "Биолам ЛОМО" (г. Санкт-Петербург) (окуляр $\times 7$; объектив $\times 40$) в 10 больших квадратах [1].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы "Statistica 6.0" с использованием непараметрического метода сравнения независимых групп по Краскел-Уоллис и Манн-Уитни [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных исследованиях было показано, что к 8-й неделе магнидефицитной диеты у животных отмечалось статистически значимое уменьшение уровня магния в эритроцитах в среднем на 56 % и в плазме в среднем на 47 % ($p \leq 0,05$), потускнение шерстного покрова и понижение веса в среднем на 30,18 % ($p \leq 0,05$).

В условиях алиментарного дефицита магния у животных наблюдалось повышение тромбогенного потенциала крови. При добавлении индуктора АДФ в концентрации 0,5 мкмоль индекс агрегации статистически значимо увеличивался на 55,45 %, что свидетельствует о повышенной стимуляции обратимой первичной волны агрегации тромбоцитов. Процессы полной активации тромбоцитов, выделения гранулярного содержимого и тем самым включения отсроченной вторичной волны агрегации тромбоцитов исследовали при добавлении АДФ-индуктора в концентрации 5,0 мкмоль. При этом наблюдалось достоверное увеличение степени агрегации на 66,19 %. В коллаген-индуцированной агрегации в группе магнидефицитных животных степень агрегации повысилась на 63,21 % ($p \leq 0,05$), что указывает на

увеличение сосудистого механизма агрегации тромбоцитов. Количество тромбоцитов крови магнидефицитных крыс по отношению к интактной группе достоверно не изменялось (см. табл.).

При пероральном введении исследуемых солей магнидефицитным животным наблюдалось восстановление уровня магния в плазме и эритроцитах. Рассчитанные методом регрессионного анализа сроки полной компенсации алиментарного дефицита магния в эритроцитах для группы животных, получавших Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином B₆, соответствовали 5 суткам, Mg L-аспарагинат и магне B₆[®] – 11 суткам.

К 20-му дню введения солей магния наблюдалось снижение тромбогенного потенциала крови животных. При этом в наибольшей степени отмечено ингибирование процессов коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, что можно объяснить выраженным влиянием магния на фибринолиз. Так, в группе животных, получавших Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином B₆, степень агрегации максимально снизилась на 72,39 % ($p \leq 0,05$), в группах Mg L-аспарагината и магне B₆[®] – на 19,60 и 13,87 % соответственно по сравнению с магнидефицитными животными. При этом по данному показателю Mg L-аспарагинат с витамином B₆ статистически значимо превосходил другие исследуемые соли магния.

В группе животных, получавших комбинацию Mg L-аспарагината с витамином B₆, отмечалось ингибирование процесса агрегации (АДФ в концентрации 5 мкмоль) на 30,50 % ($p \leq 0,05$), в группах Mg L-аспарагината и магне B₆[®] – на 12,59 и 18,25 % соответственно, что свидетельствует об уменьшении тромбогенного потенциала у животных в данных группах. При добавлении АДФ-индуктора в концентрации 0,5 мкмоль наблюдалось уменьшение внутренней секреторной активности тромбоцитов в группах, получавших соли магния.

Влияние органических солей магния при пероральном введении (50 мг/кг элементарного Mg) на агрегацию тромбоцитов магнидефицитных животных, индуцированную коллагеном и АДФ, $M \pm m$

Группа	АДФ (5 мкмоль)		АДФ (0,5 мкмоль)		Коллаген		Тромбоциты	
	Степень агрегации, max	Δ %	Индекс агрегации	Δ %	Степень агрегации, max	Δ %	Тыс. в 1 мкл	Δ %
Интактные	34,67 \pm 2,45 (n 22)	–	1,93 \pm 0,35 (n 24)	–	2,37 \pm 0,22 (n 26)	–	1074,78 \pm 2,89 (n 23)	–
Диета	53,90 \pm 7,35* (n 5)	55,45	3,20 \pm 1,01* (n 10)	66,19	3,87 \pm 0,76* (n 6)	63,21	1159,84 \pm 73,20 (n 8)	7,91
Mg L-аспарагинат в комбинации с витамином B ₆	37,46 \pm 4,55** (n 7)	8,04	2,02 \pm 0,29** (n 6)	4,52	1,07 \pm 0,37**.*.‡ (n 7)	– 54,93	1060,08 \pm 72,70 (n 6)	– 1,37
Mg L-аспарагинат	47,12 \pm 4,36* (n 6)	35,89	1,63 \pm 0,61** (n 8)	-15,39	3,11 \pm 0,61 (n 7)	31,22	1177,16 \pm 56,04 (n 8)	9,53
Магне B ₆ [®]	44,06 \pm 11,51 (n 5)	27,09	2,32 \pm 1,22 (n 6)	20,42	3,33 \pm 0,81 (n 6)	40,58	1062,50 \pm 28,82 (n 6)	– 1,14
Kruskal-Wallis test	H(4,N=45) = 7,562591 p 0,1090		H(4,N=54) = 5,768095 p 0,2172		H(4,N=52) = 15,24153 p 0,0042		H(4,N=51) = 4,576338 p 0,3336	

* – отличия достоверны от интактной группы; ** – отличия достоверны от группы животных, получавших магнидефицитную диету; § – достоверно от группы животных, получавших Mg L-аспарагинат; ‡ – достоверно от группы животных, магне B₆[®] (Mg лактат с витамином B₆).

Так, в группе Mg L-аспарагината индекс агрегации снизился на 65,30 % ($p \leq 0,05$), а в группах Mg L-аспарагината с витамином B₆ и магне B₆[®] – на 37,11 % ($p \leq 0,05$) и 27,54 % соответственно относительно группы магнидефицитных животных. Статистически значимых различий по данным показателям между исследуемыми солями магния обнаружено не было.

Полученные данные соответствуют ранее проведенным исследованиям. Так, по имеющимся литературным данным [8, 10, 11], дефицит магния приводит к увеличению процессов АДФ- и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, а при введении солей магния магнидефицитным животным отмечается восстановление данных показателей. На уровне пре-мРНК магний регулирует образование фибронектина (адгезивный экстрацеллюлярный белок), который усиливает адгезию и требуется для активации тромбоцитов, нейтрофилов и эндотелиоцитов. При этом магний напрямую не влияет на связывание фибронектина с эндотелиоцитами, а действует как антагонист, препятствуя кальций-индуцированному связыванию [12]. Таким образом, магний опосредованно препятствует образованию агрегатов тромбоцитов, которые могут, с одной стороны, способствовать внутрисосудистому свертыванию с высвобождением большого количества тромбоцитарных факторов свертывания и биологически активных веществ, а с другой стороны, закупоривая мелкие сосуды, вызывать стаз в системе микроциркуляции [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что Mg L-аспарагинат и его комбинация с пиридоксином восстанавливают процессы агрегации тромбоцитов. При этом исследуемые соли по активности оказались сопоставимыми с препаратом сравнения магне B₆[®], нормализуя нарушения у животных с дефицитом магния.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С., Балуда В. П. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. – Томск, 1980. – 71 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Иконникова Е. И., Черноусова Л. А., Мошкина И. Р. // Клинич. лаб. диагностика. – 1999. – № 6. – С. 20–21.
4. Люсов В. А., Савенков М. П. // Кардиология. – 1998. – № 5. – С. 5–8.
5. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987.
6. Bieri J. G. // J. Nutr. – 1980. – Vol. 110. – P. 1726.
7. Bom G. V. // Nature (Lond). – № 194. – P. 927–929.
8. Kh R., Khullar M., Kashyap M., et al. // J. Hypertens. – 2000. – Vol. 18, № 7. – P. 919–926.
9. Sacha T., Skotnicki A. B. // Przegl. Lek. – 1997. – Vol. 54, № 2. – P. 122–125.
10. Scheibe F., Haupt H., Vlastos G. A. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. – 2000. – Vol. 257, № 7. – P. 355–361.
11. Seelig M. S. // J. Am. college Nutrition. – 1993. – Vol. 12. – P. 442–458.
12. Serebruanu V. L., Herzog W. R., Edenbaum L. R., et al. // Magnes Res. – 1996. – Vol. 9, № 3. – P. 155–163.

УДК 547.551.42

ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ГИДРОХЛОРИДА N-(2,6-ДИМЕТИЛФЕНИЛ)-2-(ЭТИЛАМИНО)АЦЕТАМИДА (MEGX)

А. А. Озеров, Н. В. Рогова, Л. А. Смирнова, К. А. Кузнецов, Е. Г. Глухова,
А. И. Луганченко, С. С. Лемишко

Лаборатория медицинской химии ВНИЦ РАМН и АВО,
кафедра фармацевтической и токсикологической химии ВолГМУ

N-(2,6-Диметилфенил)-2-(этиламино)ацетамид (моноэтилглицин-ксилид – MEGX) является одним из наиболее широко применяющихся маркеров активности изофермента цитохорма P450 – CYP3A4, ответственного за метаболизм около 60 % современных лекарственных средств [3]. MEGX-тест характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью и значительной прогностической ценностью при диагностике хронической патологии печени [4] и оценке лекарственного взаимодействия за счет индукции или ингибирования CYP3A4 [2]. Однако в отличие от готовых тест-систем, основанных на использовании MEGX, сама субстанция MEGX не поставляется ведущими производителями химических реактивов и реа-

гентов для биохимических анализов, что побудило нас к разработке простого и технологичного метода получения MEGX для нужд собственных клинических исследований.

Синтез гидрохлорида MEGX был осуществлен нами по адаптированной схеме, предложенной для получения ксикаина (лидокаина) [1]. На первой стадии синтеза 2,6-диметиланилин подвергали ацилированию хлорангидридом хлоруксусной кислоты в среде безводной уксусной кислоты. Полученный 2-хлор-N-(2,6-диметилфенил)ацетамид аминировали избытком моноэтиламина в среде 95 %-го этанола при температуре 100 °С и после выделения MEGX-основания превращали его в конечный гидрохлорид обработкой метанольным