

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОМИГРЕНЕВОГО ПРЕПАРАТА АНТАГОНИСТА СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТРОПОКСИНА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Т. М. Васильева¹, Г. Н. Петрухина¹, Н. Т. Мифтахова¹, В. А. Макаров¹,
Т. С. Ганьшина², С. Г. Бежанян², Р. С. Мирзоян²

Исследовано влияние противомигренового препарата антагониста серотониновых рецепторов (5-НТ₂) тропоксина на агрегационную способность тромбоцитов. Для оценки антиагрегационных свойств тропоксина измеряли агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М и адреналином в конечной концентрации $2,5 \cdot 10^{-6}$ М. Тропоксин достоверно ингибировал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* в диапазоне концентраций 0,01 – 7 мг/мл. В случае агрегации, индуцированной адреналином, тропоксин оказывал антиагрегационный эффект в концентрациях 2 – 7 мг/мл. Скорость агрегации достоверно уменьшалась и при применении тропоксина в концентрациях менее 2 мг/мл. Болюсное введение тропоксина кроликам в дозе 10 мг/кг приводило к снижению агрегации тромбоцитов *ex vivo* через 45 мин после инъекции и в течение следующих 30 мин после введения в 1,2 – 1,4 раза.

Ключевые слова: мигрень, агрегация тромбоцитов, 5-НТ₂-рецепторы, тропоксин, серотонин

ВВЕДЕНИЕ

Тропоксин — оригинальный противомигреновый препарат, разработанный в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, который в настоящее время проходит клинические испытания [4]. Установлено, что тропоксин, взаимодействуя с рецепторами серотонина 5-НТ₂-типа, предупреждает развитие констрикторных реакций мозговых сосудов и уменьшает возбуждающие ответы нейронов коры большого мозга, вызванные серотонином [2, 3]. Известно, что серотонин является не только основным патогенетическим элементом в развитии приступа мигрени, но и активным естественным проагрегантом. Поэтому способность противомигреновых средств ингибировать агрегационную способность тромбоцитов является важной составляющей эффективности этих средств.

Серотонин оказывает влияние на агрегацию тромбоцитов, связываясь со специфическими 5-НТ₂-рецепторами [8]. Взаимодействие серотонина с 5-НТ₂-рецепторами приводит к активации фосфолипазы С, генерации диацилглицерина и инозит-1,4,5-трифосфата, синтезу тромбоксана А₂ [13]. В результате этих про-

цессов происходят: изменение формы тромбоцитов, реакция высвобождения и обратимая агрегация [13]. Хотя серотонин представляет собой слабый активатор тромбоцитов, он усиливает агрегацию, индуцированную АДФ [18], тромбином [11], коллагеном [7], адреналином [16], арахидоновой кислотой [15], ФАТ и другими веществами [19]. Установлено, что в синергические механизмы вовлекается комплекс сигнальных молекул, включая фосфолипазы А₂ и С, ионы кальция, циклооксигеназу, МАР-киназу [18].

В терапии мигрени широко применяют блокаторы 5-НТ₂-рецепторов метисергид и пизотифен. Установлено, что данные препараты обладают антиагрегационными свойствами. Так, инкубирование тромбоцитов с метисергидом приводило к ингибированию агрегации, индуцированной арахидоновой кислотой, и реакции высвобождения [13]. Пизотифен так же как метисергид уменьшал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека, стимулированную серотонином [12]. Активность пизотифена была показана *in vitro* и *in vivo*. У пациентов, получавших пизотифен в течение двух месяцев, отмечалось снижение спонтанной агрегации тромбоцитов [14].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния противомигренового препарата антагониста 5-НТ₂-рецепторов тропоксина на агрегационную активность тромбоцитов.

¹ Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (зав. — проф. В. А. Макаров) Гематологический научный центр РАМН, Москва, 125167, Нов. Зыковский пр., 4а, e-mail: platelet@internets.ru.

² Лаборатория фармакологии цереброваскулярных расстройств ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тропоксин синтезирован в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Рабочие растворы тропоксина готовили путем разведения исходного образца дистиллированной водой до достижения необходимой концентрации.

Работа состояла из двух этапов. В первой части изучали влияние тропоксина на параметры агрегации *in vitro*. Во второй серии экспериментов исследовали влияние тропоксина на агрегацию тромбоцитов *ex vivo* и его сравнение с антиагрегационным эффектом препаратов, часто применяющихся в клинической практике для ингибирования тромбоцитарного взаимодействия. В качестве препарата сравнения использовали дипиридамол (курантил, “Берлин-Хеми”, Германия).

Эксперименты по изучению влияния тропоксина на агрегационную активность тромбоцитов *in vitro* выполнены на венозной крови здоровых доноров ($n = 20$), которую получали путем пункции кубитальной вены и стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами.

Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре фирмы “Biola” (Россия) по методу G. G. V. Vorn [9]. С этой целью в кювету прибора помещали 300 мкл исследуемой богатой тромбоцитами плазмы. Исследуемое вещество добавляли в кювету агрегометра, инкубировали в течение 5 мин при 37° С и затем индуцировали процесс тромбоцитарной агрегации. В качестве проагрегантов в работе использовали АДФ (“Boehringer Mannheim”, Австрия) в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М и адреналин (Reanal, Венгрия) в конечной концентрации $2,5 \cdot 10^{-6}$ М. 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. В ряде экспериментов измеряли скорость агрегации тромбоцитов, которую определяли как максимальный наклон агрегационной кривой.

В экспериментах по изучению влияния тропоксина на агрегацию тромбоцитов *ex vivo* использовали кроликов обоего пола массой 3 – 4 кг ($n = 4$), которым болюсно внутривенно вводили данный препарат в дозе 10 мг/кг. Для инъекции тропоксин предварительно растворяли в 5 мл физиологического раствора. Образцы крови для оценки тромбоцитарной активности забирали из краевой вены уха животного методом свободного падения капель. Кровь брали до введения вещества (контрольный опыт) и через 15, 45, 75 и 90 мин после введения. Стабилизацию крови и приготовление

образцов бедной и богатой тромбоцитами плазмы, а также измерение тромбоцитарной агрегации проводили с применением тех же методик, что и при работе с кровью доноров.

Статистический анализ полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой части работы было исследовано влияние тропоксина на функциональное состояние тромбоцитов человека *in vitro*. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Инкубирование богатой тромбоцитами плазмы вместе с тропоксином в течение 5 мин при 37° С приводило к достоверному снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* во всем диапазоне изученных концентраций. При этом заметное ингибирование агрегации наблюдалось только при высоких (значительно выше физиологических) концентрациях тропоксина. В более низких концентрациях (0,01 – 0,1 мг/мл) препарат уменьшал активность тромбоцитов в 1,3 раза. Следует отметить, что антиагрегационное действие тропоксина практически не изменялось при снижении его концентрации от 2 до 0,01 мг/мл (табл. 1).

В случае агрегации, индуцированной адреналином, тропоксин оказывал антиагрегационный эффект в концентрациях 2 – 7 мг/мл (табл. 1), однако его эффект был более выражен по сравнению с АДФ-индуцированной агрегацией. В то же время скорость агрегации достоверно уменьшалась при применении тропоксина в концентрациях менее 2 мг/мл (табл. 2).

В результате экспериментов показано, что тропоксин достоверно ингибировал агрегацию, индуцированную АДФ и адреналином, *in vitro*. Известно, что под влиянием проагрегантов происходит активация тромбоцитов, в ходе которой развивается экзоцитоз множества соединений, стимулирующих агрегационный процесс. В частности, из плотных тромбоцитарных гранул высвобождается серотонин, который затем связывается с 5-НТ₂-рецепторами и, таким образом, стимулирует активность тромбоцитов. Вероятно, тропоксин, являясь антагонистом 5-НТ₂-рецепторов [1, 4, 5], блокирует их взаимодействие с серотонином, и снижает способность тромбоцитов к агрегации. Существование у тропоксина механизма, сопряженного с влиянием на реакцию высвобождения, подтверждается также и уменьшением скорости агрегации, индуцированной адреналином, при инкубировании богатой тромбоцитами плазмы с этим препаратом.

Следует отметить, что тропоксин достоверно ингибировал АДФ-индуцированную агрегацию во всем диапазоне исследованных концентраций, в то время как подавление адреналин-индуцированной агрегации

Таблица 1. Влияние тропоксина на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* (A_{max} ,%)

Проагрегант	Концентрация тропоксина, мг/мл						
	0 (контроль)	7	5	2	1	0,1	0,01
АДФ, $1 \cdot 10^{-5}$ М	58,6 ± 1,9	21,6 ± 1,9*	30,9 ± 1,9*	41,3 ± 1,5*	44,1 ± 1,4*	45,2 ± 1,9*	46,6 ± 1,7*
Адреналин, $2,5 \cdot 10^{-6}$ М	58,2 ± 3,5	1,6 ± 0,5 *	6,9 ± 1,1*	39,4 ± 6,4*	52,3 ± 3,8	52,8 ± 3,4	47,9 ± 4,9

Примечание. Здесь и в табл. 2 – 4 * — различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Таблица 2. Влияние тропоксина на скорость агрегации тромбоцитов человека, индуцированной адреналином ($2,5 \cdot 10^{-6}$ М) *in vitro*

Показатель	Концентрация тропоксина, мг/мл					
	0 (контроль)	5	2	1	0,1	0,01
Скорость агрегации, % в мин	50,4 ± 7,6	4,1 ± 0,7*	21,7 ± 3,9*	29,8 ± 3,1*	32,3 ± 3,1*	30,5 ± 3,9

Таблица 3. Влияние тропоксина (10 мг/кг, внутривенно) на агрегацию тромбоцитов кролика *ex vivo* АДФ ($1 \cdot 10^{-5}$ М) (A_{max} ,%)

Показатель	До введения (контроль)	После введения			
		15 мин	45 мин	75 мин	90 мин
Агрегация тромбоцитов	34,1 ± 1,7	27,0 ± 3,2	28,2 ± 1,9*	23,7 ± 4,4*	33,7 ± 1,7

Таблица 4. Влияние дипиридамола (25 мг/кг, *per os*) на агрегацию тромбоцитов кроликов *ex vivo* АДФ ($1 \cdot 10^{-5}$ М) (A_{max} ,%)

Показатель	До введения	После введения				
		30 мин	60 мин	90 мин	180 мин	240 мин
Агрегация тромбоцитов	40,8 ± 1,7	31,4 ± 0,9*	31,9 ± 1,0*	40,8 ± 4,7	24,2 ± 3,1*	42,2 ± 1,1

наблюдалось только при высоких дозах. Данный эффект, возможно, связан с природой пуринергических и α_{2A} -адренорецепторов и, следовательно, различными путями тромбоцитарной активации, которые инициируются АДФ и адреналином [10].

Во второй части работы изучалось влияние тропоксина на агрегационную способность тромбоцитов *ex vivo*. С этой целью кроликам внутривенно вводили тропоксин в дозе 10 мг/кг. Опыты показали, что болюсное введение тропоксина приводило к снижению агрегации тромбоцитов *ex vivo* через 45 мин после инъекции. Действие препарата сохранялось в течение следующих 30 мин и прекращалось спустя 90 мин после введения (табл. 3).

Далее была проведена сравнительная оценка антиагрегационного эффекта тропоксина с ингибирующим влиянием дипиридамола, механизм действия которого хорошо известен. Данный препарат был выбран для сравнения, так как он является одним из используемых лекарственных средств при лечении ишемических инсультов, ишемической болезни сердца и других заболеваний, сопровождающихся повышенным риском тромбообразования [18]. Показано, что дипиридамола обладает антиагрегационным и антиадгезивным эффектами. Антиагрегационный эффект дипиридамола связан со способностью этого препарата селек-

тивно ингибировать цГМФ-зависимую фосфодиэстеразу V типа и усиливать действие NO на тромбоциты [6]. Кроме того, дипиридамола повышает концентрацию аденозина в крови. Учитывая, что аденозин стимулирует аденилатциклазу, этот эффект также может способствовать снижению агрегации тромбоцитов [17].

Введение кроликам *per os* дипиридамола в дозе 25 мг/кг вызывало угнетение функциональной активности тромбоцитов в сроки 30, 60 и 180 мин после введения препарата (табл. 4). Следовательно, при введении кроликам дипиридамола ингибировал тромбоцитарную агрегацию в 1,2 – 1,7 раза. В то же время при внутривенной инъекции животным тропоксина наблюдалось уменьшение агрегационной активности тромбоцитов в 1,2 – 1,4 раза по сравнению с контрольной величиной.

Таким образом, из полученных данных следует, что противомигренозный препарат и антагонист 5-НТ₂-рецепторов тропоксин обладает антиагрегационными свойствами как *in vitro* так и *ex vivo*, причем его эффект сравним с ингибирующим влиянием дипиридамола. Следовательно, тропоксин наряду с выраженной цереброваскулярной антисеротониновой активностью, оказывает существенное влияние на агрегационную

способность тромбоцитов, что следует рассматривать как положительное свойство препарата.

ВЫВОДЫ

1. Противомигреновый препарат антагонист 5-HT₂-рецепторов тропоксин ингибирует агрегацию тромбоцитов.

2. Антиагрегационный эффект тропоксина *ex vivo* сравним с ингибирующим влиянием дипиридамола.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований проект № 04-04-48608а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. С. Ганьшина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(3), 17 – 20 (2003).
2. Т. С. Ганьшина, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Москва (2004).
3. Р. С. Мирзоян, Т. С. Ганьшина, Л. М. Косточка и др., *V Российской нац. конгресс “Человек и лекарство”*, Москва, 1998, 21 – 25 апреля, с. 589.
4. Р. С. Мирзоян, С. Б. Середенин, Т. С. Ганьшина, и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **61** (2), 28 – 31 (1998).
5. Р. С. Мирзоян, А. В. Топчян, Т. С. Ганьшина, Л. М. Косточка, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(3), 21 – 23 (2000).

6. B. Aktas, A. Utz, P. Hoenig-Liedl, et. al., *Stroke.*, **34**(3), 764 – 769 (2003).
7. D. Awabdy, L. J. Bryan-Lluka, and J. C. Wanstall, *Eur. J. Pharmacol.*, **459**(1), 1 – 7 (2003).
8. A. Bhatnagar, D. J. Sheffler, W. K. Kroeze, et. al., *J. Biol. Chem.*, **279**(3), 34614 – 34623 (2004).
9. G. Born, *Nature (London)*, **194**, 927 – 929 (1962).
10. I. P. Casserly, and E. J. Topol, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **59**(3), 478 – 500 (2002).
11. J. W. Heemskerk, M. A. Feijge, S. O. Sage, and U. Walter, *Eur. J. Biochem.*, **223**(2), 543 – 551 (1994).
12. J. Hladovec, *Thromb. Res.*, **43**(5), 545 – 561(1986).
13. Li B. Y., Li W. H. *Zhongguo, Yao. Li. Xue. Bao.*, **19**(4), 383 – 386 (1998).
14. S. Mazal and E. A. Rachmilewitz, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **43**(12) 1137 – 1140 (1980).
15. S. A. Saeed, H. Rasheed, and A. U. Gilani, *Acta Pharmacol. Sin.*, **24**(10), 958 – 964 (2003).
16. B. H. Shah, H. Rasheed, I. H. Rahman, et. al., *Exp. Mol. Med.*, **33**(4), 226 – 233 (2001).
17. M. Taniguchi, S. Magata, T. Suzuki, et. al., *J. Am. Coll. Surg.*, **198**(5), 758 – 769 (2004).
18. H. Tran and S. S. Anand, *JAMA.*, **292**(15), 1867 – 1874 (2004).
19. D. M. Vanags, J. V. Lloyd, S. E. Rodgers, and Bochner F., *Eur. J. Pharmacol.*, **358**(1), 93 – 100 (1998).

Поступила 26.01.05

EFFECT OF THE NEW ANTIMIGRAINE DRUG SEROTONIN RECEPTOR ANTAGONIST TROPOXIN ON PLATELET AGGREGATION

T. M. Vasil'eva¹, G. N. Petrukhina¹, N. T. Miftakhova¹, V. A. Makarov¹,
T. S. Gan'shina², S. G. Bedzhanyan², and R. S. Mirzoyan²

¹ Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167 Russia

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

The effect of the new antimigraine drug tropoxin – the serotonin receptor (5-HT₂) antagonist – on the human platelet aggregation *in vitro* induced by ADP (1×10^{-5} M) and epinephrine (2.5×10^{-6} M) was studied. Tropoxin reliably inhibited the ADP-induced platelet aggregation in a concentration range of 0.01 – 7 mg/ml. A significant inhibition effect with respect to the epinephrine-induced platelet aggregation was observed in a drug concentration range of 2 – 7 mg/ml, although a reliable antiaggregant activity was also observed below 2 mg/ml. A bolus administration of tropoxin (10 mg/kg) in rabbits decreased the ADP-induced platelet aggregation *ex vivo* by a factor of 1.2 – 1.4. The effect appeared 45 min after treatment and was observed during subsequent 30 min.