

# ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

## ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДИНИТРОГЛИЦЕРИНОВЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

Т. М. Васильева<sup>1</sup>, Г. Н. Петрухина<sup>1</sup>, В. А. Макаров<sup>1</sup>, И. В. Серков<sup>2</sup>,  
Н. М. Грецкая<sup>3</sup>, В. В. Безуглов<sup>3</sup>

Исследовано действие 6 новых синтетических динитроглицериновых эфиров жирных кислот на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*. Включение в молекулу арахидоновой кислоты динитроглицерина привело к полной потере этой кислотой проагрегационных свойств. Исследованные вещества мягко ингибировали агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой ( $1 \cdot 10^{-3}$  М). Наиболее сильное действие на агрегацию тромбоцитов оказывали синтетические эфиры арахидоновой и докозагексаеновой кислот, что может обуславливаться их влиянием на окислительный метаболизм арахидоновой кислоты до проагрегантных эйкозаноидов. В присутствии сосудистой стенки в условиях ингибирования циклооксигеназы эндотелиоцитов ацетилсалициловой кислотой (10 мг/мл) динитроглицериновые эфиры докозагексаеновой и линолевой кислот вызывали значительное снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой ( $1 \cdot 10^{-3}$  М) и АДФ ( $1 \cdot 10^{-5}$  М). Возможно, что выраженный антиагрегационный эффект исследованных динитроглицериновых эфиров жирных кислот связан с их способностью быть донорами окиси азота и подавлять функциональную активность тромбоцитов в существенной степени за счет высвобождения NO, при наличии в системе соответствующей NO-генерирующей активности.

**Ключевые слова:** агрегация тромбоцитов, NO-доноры, органические нитраты, динитроглицериновые эфиры, арахидоновая кислота, докозагексаеновая кислота, линолевая кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в возникновении инфаркта миокарда и других кардио-васкулярных заболеваний играют атеросклероз и повышенное тромбообразование, протекающие при активном участии тромбоцитов. Для терапии сердечно-сосудистых заболеваний разрабатываются новые препараты, действие которых во многих случаях направлено на коррекцию процессов тромбоцитарной активации и агрегации. Перспективной группой веществ, которые могут быть использованы для создания подобных препаратов, являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), принадлежащие к *n-3* ряду. Антиагрегационное действие *n-3* полиеновых кислот было установлено во многих исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* [2, 6, 13, 21].

В настоящее время в клинике применяются эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты, зарекомендовавшие себя как эффективные ингибиторы атеросклероза и тромбогенеза. *n-3* ПНЖК подавляют окислительный метаболизм арахидоновой кислоты в тромбоцитах, снижают продукцию тромбоксана  $A_2$  и циклических эндоперекисей, обладающих проагрегантными свойствами [2, 11, 20]. В связи с изложенным целесообразно провести комплексное изучение производных полиеновых кислот, что будет способствовать выявлению более эффективных противотромботических средств, чем их природные прототипы.

Одним из способов повышения антиагрегационной активности может явиться целенаправленная химическая модификация полиеновых кислот с введением в их молекулы различных биологически-активных радикалов, например, потенциальных доноров окиси азота, таких, как динитрат глицерина. Эффективное ингибирование агрегации тромбоцитов при введении в организм человека NO-доноров: S-нитрозоглутатиона, тринитрата глицерина (нитроглицерина) и нитропрусида натрия, было показано во многих работах [3, 12, 14]. Антиагрегационное действие этих соединений связано с высвобождением NO, который активирует синтез цГМФ в тромбоцитах и, таким образом, снижает

<sup>1</sup> Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (зав. — проф. В. А. Макаров) Гематологического научного центра РАМН, Москва, 125167, Нов. Зыковский пр., 4а.

<sup>2</sup> Лаборатория биоэффекторов (зав. — И. В. Серков) Института физиологически активных соединений РАН, Московская обл., 142432, Ногинский р-н., пос. Черноголовка.

<sup>3</sup> Лаборатория оксилипинов (зав. — В. В. Безуглов) Института биоорганической химии им. Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

ет продукцию диацилглицерина и инозит-1,4,5-трифосфата, что приводит к уменьшению концентрации внутриклеточного кальция [4, 15].

В настоящее время обнаружены цГМФ-независимые механизмы действия доноров NO [19]. В. Coles и соавт. (2002) было установлено, что нитролинолеат, продукт взаимодействия линолевой кислоты с пероксинитрилом, дозозависимо ингибировал тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, благодаря повышению уровня цАМФ [8]. NO-зависимое угнетение активации тромбоцитов *in vitro* и *in vivo* может быть следствием снижения связывания фибриногена с гликопротеином GP IIa/IIIb [9, 10], уменьшением экспрессии P-селектина [9], подавлением активности Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменника [7].

Поэтому выбранные нами для исследования динитроглицериновые эфиры различных жирных кислот могут сочетать ценные свойства как самих ПНЖК, так и доноров окиси азота, что делает их возможными кандидатами для использования в качестве базиса для разработки препаратов, обладающих модулирующим действием на свертывание крови и тонус сосудов.

Целью настоящей работы было изучение влияния новых синтетических динитроглицериновых эфиров жирных кислот на функциональную активность тромбоцитов человека *in vitro*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1,3-Динитрат глицерина синтезирован в лаборатории биоэффекторов ИФАВ РАН (зав. — И. В. Серков). Образцы динитроглицериновых эфиров природных жирных кислот ( $n = 5$ ), а также  $\alpha, \alpha$ -диметиларахидоновой кислоты были синтезированы сотрудниками лаборатории оксипиринов (зав. — В. В. Безуглов) Института биорганической химии им. Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН. Были изучены динитроглицериновые эфиры арахидоновой (AA-DNG),  $\alpha, \alpha$ -диметиларахидоновой (ADM-AA-DNG), линолевой (C18:2-DNG),  $\alpha$ -линоленовой (C18:3-DNG), докозагексаеновой (DHA-DNG), пальмитиновой (C16-DNG) кислот и динитроглицерин (DNG). Образцы представляли собой 1 % спиртовые растворы. Рабочие растворы исследуемых веществ готовили путем разведения исходных образцов дистиллированной водой до достижения необходимой концентрации. Субстанции хранили при температуре 4°C.

Работа состояла из двух этапов. В первой части изучали влияния синтезированных веществ на функциональную активность тромбоцитов *in vitro*. Следует отметить, что активность тромбоцитов по синтезу NO и NO-активных соединений из органических нитратов не высока. Поэтому во второй части было исследовано изменение агрегации тромбоцитов *in vitro* под влиянием динитроглицериновых эфиров жирных кислот и стенка аорты, которая, как известно, способна активно превращать органические нитраты в окись азота.

Эксперименты были выполнены с использованием венозной крови здоровых доноров ( $n = 60$ ), 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 перенесли 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 “Chrono-Log Corporation” (США) по методу G. G. V. Born [5]. С этой целью в кювету прибора помещали 450 мкл исследуемой 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 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 арахидоновую кислоту в концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  М. Арахидоновая кислота (АК), свободная от продуктов окисления, была предоставлена сотрудниками лаборатории оксипиринов (зав. — В. В. Безуглов) ИБХ РАН.

У белых беспородных крыс ( $n = 30$ ) под общим наркозом (этиловый эфир) извлекали аорту, которую затем прополаскивали в 0,05 М трис-НСL-буфере (рН 7,5) и разрезали вдоль [1]. 450 мкл богатой тромбоцитами плазмы инкубировали с кусочком аорты массой 10 мг и 50 мкл динитроглицеринового эфира в течение 5 мин при температуре 37°С. В части опытов кусочек аорты инкубировали 5 мин при 37°С с 10 мг/мл ацетилсалициловой кислотой, отмывали в трис-НСL-буфере и добавляли к богатой тромбоцитами плазме вместе с изучаемым веществом. После инкубации аорту удаляли и записывали кривую агрегации.

Таблица 1. Влияние динитроглицериновых эфиров жирных кислот на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, индуцированную АК ( $1 \cdot 10^{-3}$  М) ( $A_{max}$ ; %)

Вещество	Концентрация исследуемого вещества, мг/мл			
	0	0,1	0,01	0,001
AA-DNG	75 ± 3	12 ± 3*	50 ± 3*	—
ADM-AA-DNG	64 ± 3	48 ± 3*	63 ± 1	—
C18:2-DNG	55 ± 2	47 ± 3*	57 ± 3	—
C18:3-DNG	54 ± 3	30 ± 3*	42 ± 3*	46 ± 2*
DHA-DNG	54 ± 3	16 ± 2*	23 ± 1*	43 ± 3*
C16-DNG	53 ± 3	29 ± 4*	51 ± 2	48 ± 5

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

Таблица 2. Влияние динитроглицериновых эфиров жирных кислот на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, индуцированную АДФ ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) ( $A_{max}$ ; %)

Вещество	Концентрация исследуемого вещества, мг/мл			
	0 (контроль)	0,1	0,01	0,001
AA-DNG	79 ± 3	26 ± 2*	58 ± 3*	–
ADM-AA-DNG	69 ± 4	59 ± 2*	65 ± 5	–
C18:2-DNG	61 ± 8	47 ± 3*	57 ± 3	–
C18:3-DNG	59 ± 6	39 ± 6*	42 ± 3*	46 ± 2*
DHA-DNG	64 ± 4	48 ± 5*	67 ± 7	–
C16-DNG	59 ± 1	56 ± 2	57 ± 2	57 ± 2

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 6 новых синтетических динитроглицериновых эфиров жирных кислот на функциональное состояние тромбоцитов человека *in vitro*. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Наиболее выраженную антиагрегационную активность в случае АК-индуцированной агрегации проявил DHA-DNG. В случае АДФ-индуцированной агрегации динитроглицериновый эфир докозагексаеновой кислоты также оказался веществ, заметно снижающим способность тромбоцитов к взаимодействию друг с другом.

Динитроглицериновый эфир АК, в отличие от свободной арахидоновой кислоты, не индуцировал агрегацию тромбоцитов. После инкубирования богатой тромбоцитами плазмы с AA-DNG (5 мин, 37° С) наблюдали эффективное ингибирование АК- и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при концентрации исследуемого вещества 0,1 мг/мл.

Было также изучено влияние модификации молекулы арахидоновой кислоты на антиагрегационные свойства динитроглицеринового эфира. Известно, что введение двух метильных радикалов в  $\alpha$ -положение к карбоксильной группе существенно снижает гидролитическое расщепление таких эфиров гидролазами.

Синтезированный сотрудниками лаборатории оксипиринов ИБХ РАН динитроглицериновый эфир  $\alpha, \alpha$ -диметиларахидоновой кислоты также как и немодифицированный эфир не индуцировал агрегацию тромбоцитов человека, однако, в отличие от AA-DNG, весьма умеренно ингибировал межтромбоцитарное взаимодействия в концентрации 0,1 мг/мл и практически не влиял на способность тромбоцитов к агрегации в меньших дозах.

Динитроглицериновый эфир линоленовой кислоты снижал агрегацию тромбоцитов, индуцированную АК, в концентрациях 0,1 и 0,01 мг/мл, тогда как динитроглицериновые эфиры линолевой и пальмитиновой кислот достоверно, но умеренно снижали агрегацию тромбоцитов в концентрации 0,1 мг/мл и не оказывали эффекта в меньших концентрациях. Эти производные, за исключением C16-DNG, который был неактивен, умеренно снижали АДФ-индуцированную агрегацию в концентрации 0,1 мг/мл.

Во второй части работы был исследован возможный механизм действия динитроглицериновых эфиров ПНЖК. Для этого были выбраны два соединения: DHA-DNG, наиболее эффективно ингибирующий тромбоцитарную агрегацию, и C18:2-DNG, который практически не снижал активность тромбоцитов. Изучено также изменение агрегационной способности тромбоцитов при влиянии этих веществ в присутствии стенки аорты. В контрольном опыте вместо динитроглицериновых эфиров в систему добавляли динитроглицерин *per se*.

Инкубирование богатой тромбоцитами плазмы вместе с кусочком аорты приводило к практически полному подавлению как АК-, так и АДФ-индуцированной агрегации. При внесении в систему аорта + богатая тромбоцитами плазма C18:2-DNG, DHA-DNG либо DNG не происходило дополнительного уменьшения степени межтромбоцитарного взаимодействия (табл. 3). В случае АДФ-индуцированной агрегации при добавлении динитроглицериновых эфиров линолевой и докозагексаеновой кислот в концентрациях 0,01 – 0,001 мг/мл наблюдалось увеличение тромбоцитарной агрегации в 1,5 – 2,5 раза по сравнению с агрегацией тромбоцитов в системе аорта + АДФ (табл. 4).

Таблица 3. Влияние динитроглицериновых эфиров докозагексаеновой (DHA-DNG) и линолевой кислот (C18:2-DNG) и динитроглицерина (DNG) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, индуцированную АК ( $1 \cdot 10^{-3}$  М), в присутствии сосудистой стенки и при ингибировании циклооксигеназы сосудистой стенки ацетилсалициловой кислотой (АСК) (10 мг/мл) ( $A_{max}$ ; %)

Вещество	АК $1 \cdot 10^{-3}$ М	Аорта + АК	Аорта + АСК + АК	Вещество (мг/мл) + АК			Аорта + вещество + АК			Аорта + АСК + вещество + АК		
				0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
C18:2-DNG	64 ± 3	9 ± 1*	48 ± 2*	48 ± 4*	61 ± 3	77 ± 3	9 ± 1***	17 ± 2***	13 ± 2***	18 ± 3***,x,#	30 ± 3***,x,#	37 ± 4***,x,#
DHA-DNG	54 ± 1	7 ± 3*	44 ± 4*	34 ± 2*	48 ± 2*	51 ± 2	6 ± 1*	7 ± 1*	6 ± 1*	4 ± 1*,x,#	21 ± 2***,x,#	38 ± 2***,x,#
DNG	52 ± 2	7 ± 1*	38 ± 2*	17 ± 2*	28 ± 2*	37 ± 2*	7 ± 1*	7 ± 1*	7 ± 1*	10 ± 1***,x,#	31 ± 2***,x,#	33 ± 4***

**Примечание.** Различия достоверны по отношению к контролю: \* — АК  $1 \cdot 10^{-3}$  М ( $p < 0,05$ ); \*\* — Аорта + АК ( $p < 0,05$ ); x — Аорта + ацетилсалициловая кислота + АК ( $p < 0,05$ ); # — Вещество + АК ( $p < 0,05$ ).

Ацетилсалициловая кислота (10 мг/мл) восстанавливала агрегацию, индуцированную АДФ, до значений, сопоставимых с исходными. Однако достоверное снижение АК-индуцированной агрегации сохранялось (табл. 3).

При инкубировании богатой тромбоцитами плазмы и аорты, предварительно обработанной ацетилсалициловой кислотой, вместе с исследуемыми веществами отмечалось достоверное ослабление активности тромбоцитов по сравнению с таковой в случаях АК-индуцированной агрегации и системы аорта + ацетилсалициловая кислота + АК (табл. 3). Следует отметить, что уменьшение тромбоцитарной агрегации в системе аорта + ацетилсалициловая кислота + АК при действии DNG *per se* не столь сильно выражено, как при внесении в эту систему динитроглицериновых эфиров полиеновых кислот. C18:2-DNG в данном опыте достоверно снижал агрегацию тромбоцитов во всех исследованных концентрациях, в то время как при инкубировании богатой тромбоцитами плазмы с C18:2-DNG *per se* уменьшение тромбоцитарной активности было зафиксировано только при высоких концентрациях этого вещества (0,1 мг/мл).

DHA-DNG в системе аорта + ацетилсалициловая кислота + АК в концентрациях 0,1 и 0,01 мг/мл действовал соответственно в 8 и 2 раза сильнее, чем *per se*.

В случае АДФ-индуцированной агрегации в системе аорта + ацетилсалициловая кислота + АДФ DHA-DNG и DNG в концентрациях 0,1 – 0,001 мг/мл и C18:2-DNG в концентрациях 0,1 – 0,01 мг/мл достоверно ингибировали активность тромбоцитов по сравнению с исходной величиной (добавление в богатую тромбоцитами плазму только АДФ). Достоверное снижение тромбоцитарного взаимодействия по отношению к системе аорта + ацетилсалициловая кислота + АДФ наблюдали при действии 0,1 – 0,01 мг/мл DHA-DNG и DNG и 0,1 мг/мл C18:2-DNG (табл. 4).

Все три исследованные соединения в диапазоне концентраций 0,1 – 0,001 мг/мл (за исключением DHA-DNG в концентрации 0,001 мг/мл) в системе аорта + ацетилсалициловая кислота + АК проявляют антиагрегантные свойства сильнее, чем *per se*, и эти свойства более выражены на фоне индуцирования агрегации арахидоновой кислотой.

Таким образом, включение в молекулу АК остатка динитроглицерина привело к потере этой кислотой проагрегационных свойств. Предварительная инкубация богатой тромбоцитами плазмы с AA-DNG приводила к снижению агрегации тромбоцитов, индуцированной как АК, так и АДФ. Подобный эффект может быть связан с высвобождением NO, происходящим при метаболизме AA-DNG. Однако, по-видимому, развитие антиагрегационного действия у динитроглицеринового эфира АК нельзя объяснить только генерацией NO, так как введение остатка динитроглицерина в молекулы других исследованных ПНЖК, за исключением докозагексаеновой, не приводило к выраженному антиагрегационному эффекту. Можно предположить, что антиагрегационное действие динитроглицеринового эфира АК, связано с нарушением окислительного метаболизма арахидоната, что сопровождается снижением образования эндогенных индукторов агрегации PGH<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub> и TXA<sub>2</sub>. Косвенно это предположение подтверждает практически полная потеря ингибирующей активности динитроглицеринового эфира АК после введения в его молекулу двух метильных радикалов в α-положение к карбоксильной группе. Полученное соединение, ADM-AA-DNG, не является ни индуктором, ни ингибитором агрегации тромбоцитов человека, что по-видимому, связано с его неспособностью влиять на окислительный метаболизм АК.

В 1989 г. D. C. Sane и соавт. сообщили, что физиологическая регуляция агрегации тромбоцитов посредством системы NO-цГМФ, ограничивается ингибированием каскада фосфолипазы A<sub>2</sub> и подавлением образования АК и TX A<sub>2</sub> [17]. Следует отметить, что все исследованные в работе вещества снижали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов значительно слабее, чем АК-индуцированную, что подчеркивает особую чувствительность арахидонового пути активации тромбоцитов к новым соединениям.

Динитроглицериновые эфиры ПНЖК с меньшим, по сравнению с АК, числом двойных связей оказались менее активными ингибиторами АК-индуцированной агрегации тромбоцитов, и проявляли умеренный эффект лишь в концентрации 0,1 мг/мл по отношению к АДФ-индуцированной агрегации, причем насыщенный эфир (C16-DNG) был неактивен в последнем тес-

Таблица 4. Влияние динитроглицериновых эфиров докозагексаеновой (DHA-DNG) и линолевой кислот (C18:2-DNG) и динитроглицерина (DNG) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, индуцированную АДФ (1 · 10<sup>-5</sup> М), в присутствии сосудистой стенки и при ингибировании циклооксигеназы сосудистой стенки ацетилсалициловой кислотой (АСК) (10 мг/мл) (A<sub>max</sub>; %)

Вещество	АДФ 1 · 10 <sup>-5</sup> М	Аорта + АДФ	Аорта + АСК + АДФ	Вещество (мг/мл) + АДФ			Аорта + вещество + АДФ			Аорта + АСК + вещество + АДФ		
				0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
C18:2-DNG	59 ± 2	12 ± 2*	54 ± 1*	44 ± 3***	50 ± 1*	50 ± 3	8 ± 1***	21 ± 3***	32 ± 3***	48 ± 2***,x,#	51 ± 1***	53 ± 3
DHA-DNG	57 ± 2	14 ± 3*	55 ± 3	34 ± 3***	52 ± 2	55 ± 3	6 ± 1***	26 ± 1***	35 ± 3***	25 ± 3***,x,#	46 ± 3***,x	50 ± 2***
DNG	60 ± 1	9 ± 1*	49 ± 2*	25 ± 1***	46 ± 3*	55 ± 3	9 ± 1***	10 ± 1***	10 ± 1***	25 ± 2***,x	42 ± 2***,x	50 ± 2***

Примечание. Различия достоверны по отношению к контролю: \* — АДФ 1 · 10<sup>-5</sup> М (p < 0,05); \*\* — Аорта + АДФ (p < 0,05); x — Аорта + ацетилсалициловая кислота + АДФ (p < 0,05); # — Вещество + АДФ (p < 0,05).

те. Это может быть связано с существенно сниженным, чем у AA-DNG, влиянием указанных соединений на окислительный метаболизм АК с образованием проагрегантных эйкозаноидов. В этой группе несколько выделялся динитроглицериновый эфир линоленовой кислоты, который проявлял способность умеренно ингибировать АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов во всем диапазоне исследованных концентраций без явно выраженной зависимости доза-эффект, что не имеет в настоящее время объяснения.

Динитроглицериновый эфир докозагексаеновой кислоты (от 0,1 до 0,001 мг/мл) достоверно снижал агрегацию тромбоцитов, вызванную АК, демонстрируя выраженную зависимость доза-эффект и превосходя в этом тесте AA-DNG. Этот результат вполне согласуется с собственным антиагрегационным эффектом DHA, который связывают, главным образом, с ингибированием окислительного метаболизма арахидоновой кислоты [2]. Как и другие DNG-эфиры AA-DHA ингибировал межтромбоцитарное взаимодействие, индуцированное АДФ, лишь в концентрации 0,1 мг/мл.

Отсутствие выраженного антиагрегационного действия у динитроглицериновых эфиров в концентрациях менее 0,1 мг/мл может объясняться низким уровнем активности тромбоцитов по отношению к органическим нитратом, и как следствие, слишком малым количеством окиси азота, образующегося из них в этих клетках. Поэтому во второй части работы было исследовано влияние на агрегацию тромбоцитов DHA-DNG, C18:2-DNG и самого DNG в присутствии сосудистой стенки, которая выступала в качестве биохимической машины, генерирующей NO из органических нитратов. Установлено, что совместное действие тромбоцитарных и эндотелиальных NO-синтаз ингибирует активность тромбоцитов, подавляя их адгезию и активацию, а также вызывает дезагрегацию [15]. Однако в данных условиях и без испытуемых соединений наблюдали практически полное ингибирование как АК-, так и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. На этом фоне эффект доноров NO был практически не различим. Причем значения агрегации в присутствии DNG сохранялись во всем диапазоне исследованных концентраций, тогда как DNG-эфиры в концентрации менее 0,1 мг/мл уменьшали супрессию агрегации, вызванную АДФ и, в большей степени, АК. Последний, на первый взгляд странный результат, может быть объяснен одновременным взаимодействием DNG-эфиров с системами генерации NO из органических нитратов эндотелия и циклооксигеназного метаболизма АК. Известно, что окись азота, как и арахидонат, активируют циклооксигеназу эндотелиальных клеток и таким образом стимулируют продукцию простаглицина (PGI<sub>2</sub>), который является сильным ингибитором агрегации [16, 18]. Вполне возможно, что в концентрации 0,01 мг/мл и ниже эффект DNG-эфиров на синтез простаглицина выражен сильнее, чем генерация окиси азота, способного влиять на тромбоциты,

что и приводит к повышению значений агрегации в этих условиях. DNG *per se*, по-видимому, не влияет на синтез простаглицина.

Чтобы исключить влияние простаглицина на активность тромбоцитов в следующей серии экспериментов циклооксигеназа эндотелиоцитов аорты была заблокирована ацетилсалициловой кислотой (10 мг/мл). В этом случае антиагрегационное влияние (особенно на АК-индуцированную агрегацию) DHA-DNG, C18:2-DNG и DNG было более выраженным, чем действие этих веществ *per se*. Таким образом, вероятно, что исследованные динитроглицериновые эфиры жирных кислот являются донорами окиси азота и ингибируют функциональную активность тромбоцитов в существенной степени за счет высвобождения NO, при условии, что соответствующая NO-генерирующая активность присутствует в системе.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, гранты 01-04-48429 и 02-04-22002НЦНИа.

## ВЫВОДЫ

1. Введение динитроглицеринового радикала в молекулу арахидоновой кислоты превращает ее из проагреганта в антиагрегант.
2. Подобная модификация других жирных кислот (за исключением DNG-эфира докозагексаеновой кислоты, активность которого сравнима с AA-DNG) не сообщает им выраженных антиагрегационных свойств *per se*.
3. В присутствии сосудистой стенки при ингибировании циклооксигеназы эндотелиоцитов ацетилсалициловой кислотой динитроглицериновые эфиры докозагексаеновой и линолевой кислот вызывают значительное снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой и АДФ.
4. Антиагрегационная активность исследованных веществ более выражена при инициации процесса агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой по сравнению с АДФ.
5. Исследованные динитроглицериновые эфиры жирных кислот являются донорами окиси азота и способны ингибировать функциональную активность тромбоцитов за счет высвобождения NO, если соответствующая NO-генерирующая активность присутствует в системе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Балуда, К. М. Лакин, Т. И. Лукоянова и др., *Бюл. экпер. биол.*, **94**(9), 79 – 80 (1982).
2. J. J. Agren, O. Hanninen, A. Hanninen, and K. Seppanen, *Thromb. Res.*, **57**(4), 565 – 575 (1990).
3. H. Aoki, M. Inoue, T. Mizobe, et. al., *Br. J. Anaesth.*, **79**(4), 476 – 481(1997).
4. S. C. Body, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2**(Suppl. 1), 13 – 25 (1996).
5. G. G. V. Born, *Nature (London)*, **194**, 927 – 929 (1962).

6. B. J. Burri, R. M. Dougherty, D. S. Kelley, and J. M. Iacono, *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**(2), 359 – 362 (1991).
7. H. Chen, and Z. G. Guo, *Zhongguo. Yao. Li. Xue. Bao.*, **20**(4), 333 – 337 (1999).
8. B. Coles, A. Bloodsworth, J. P. Eiserich, et.al., *J. Biol. Chem.*, **277**(8), 5832 – 5840 (2002).
9. A. Gries, C. Bode, K. Peter, et. al., *Circulation.*, **97**(15), 1481 – 1487 (1998).
10. D. Keh, M. Gerlach, I. Kurer, et. al., *Blood Coagul. Fibrinolysis.*, **7**(6), 615 – 624 (1996).
11. S. D. Kristensen, E. B. Schmidt, and J. Dyerberg, *J. Int. Med. Suppl.*, **225**(731), 141 – 150 (1989).
12. E. J. Langford, R. J. Wainwright, and J. F. Martin, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **16**(1), 51 – 55 (1996).
13. M. Mutanen, and R. Freese, *Curr. Opin. Lipidol.*, **7**(1), 14 – 19 (1996).
14. P. R. Parrish and D. F. Larson, *J. Extra Corpor. Technol.*, **31**(4), 162 – 168 (1999).
15. M. W. Radomski, and S. Moncada, *Thromb. Haemost.*, **70**(1), 36 – 41 (1993).
16. D. Salvemini, M. G. Currie, and V. Mollace, *J. Clin. Invest.*, **97**(11), 2562 – 2568 (1996).
17. D. C. Sane, A. Bielawska, C. S. Greenberg, and Y. A. Hannun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**(2), 708 – 714 (1989).
18. E. Sievi, T. A. Lahteenmaaki, J. Alanko, et. al., *Arzneimittelforschung.*, **47**(10), 1093 – 1098 (1997).
19. N. Sogo, K. S. Magid, C. A. Shaw, et. al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**(2), 412 – 419 (2000).
20. P. S. Sohal, V. E. Baracos, M. T. Clandinin, *Biochem. J.*, **286**(Pt 2), 405 – 411 (1992).
21. E. Vericel, C. Calzada, P. Chapuy, and M. Lagarde, *Atherosclerosis*, **147**(1), 187 – 192 (1999).

Поступила 19.12.02

## THE EFFECT OF NEW SYNTHETIC DINITROGLYCEROL ESTERS OF FATTY ACIDS ON THE ON THE HUMAN PLATELET AGGREGATION *IN VITRO*

T. M. Vasil'eva<sup>1</sup>, G. N. Petrukhina<sup>1</sup>, V. A. Makarov<sup>1</sup>, I. V. Serkov<sup>2</sup>, N. M. Gretskeya<sup>3</sup>, and V. V. Bezuglov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Hemostasis Pathology and Pharmacology, Scientific Hematology Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167 Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Bioeffects, Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

<sup>3</sup> Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A series of six new synthetic dinitroglycerol esters of fatty acids on the human platelet aggregation was studied *in vitro*. Inclusion of the dinitroglycerol moiety into the molecule of arachidonic acid deprived this acid from pro-aggregant activity. All six compounds produced moderate (dose-dependent) inhibition of the platelet aggregation process induced by arachidonic acid ( $1 \cdot 10^{-3}$  M). Platelet aggregation was most significantly affected by dinitroglycerol esters of arachidonic and docosahexaenoic acids. This is probably explained by the influence of these esters on the oxidative metabolism of arachidonic acid to eicosanoids playing the role of proaggregants. In the presence of vessel wall (rat aorta fragments), dinitroglycerol esters of arachidonic and docosahexaenoic acids incubated with platelets (5 min, 37°C) significantly reduced their aggregation induced by arachidonic acid ( $1 \cdot 10^{-3}$  M) or docosahexaenoic acid ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) under the conditions of endothelial cyclooxygenase suppressed by acetylsalicylic acid (10 mg/ml). The pronounced antiaggregant effect of the synthetic dinitroglycerol esters studied is probably related to their ability to act as NO donors suppressing the activity of thrombocytes (provided that the NO production activity is present in the system).