

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

МНОГОКОМПОНЕНТНЫЙ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ПРОЛИЛ-ДИПЕПТИДА ГВС-111 И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ЦИКЛО-L-ПРОЛИЛГЛИЦИНА

Р. У. Островская¹, Л. А. Ляпина², В. Е. Пасторова², Т. Х. Мирзоев¹,
Т. А. Гудашева¹, С. Б. Середенин¹, И. П. Ашмарин²

В экспериментах *in vivo* показано, что ноотропный пролилсодержащий дипептид ГВС-111 оказывает антитромботический эффект, влияя на различные этапы свертывания крови. ГВС-111 проявляет антикоагулянтную и фибринолитическую активность, усиливает дестабилизацию фибрина, снижая активность фактора XIIIa. Эти эффекты проявляются как в случае внутривенного введения ГВС-111 (1 мг/кг), так и при введении препарата внутрь (10 мг/кг). В экспериментах *in vitro* у ГВС-111 (10^{-3} – 10^{-6} М) и его основного метаболита циклопролилглицина (до 10^{-10} М), выявлены те же виды активности. У последнего обнаружен также и антиагрегационный эффект. Наличие у ГВС-111 антитромботических свойств в сочетании с выявленной ранее нейропротективной активностью, низкой токсичностью и отсутствием побочных эффектов позволяет считать перспективным дальнейшую разработку этого препарата в качестве средства лечения инсультов.

Ключевые слова: ноотропы, нейропротективные вещества, дипептиды, ГВС-111, цикло-L-пролилглицин, фибринолитические, антикоагулянтные, антиагрегационные свойства, ишемия, инсульт

ВВЕДЕНИЕ

ГВС-111 (N-фенилацетил L-пролилглицина этиловый эфир) был сконструирован в качестве пептидного аналога ноотропного препарата пирацетама. Он имеет с последним общие ноотропные фармакофоры [7]. Соединение продемонстрировало выраженный ноотропный эффект, превосходя пирацетам по уровню эффективных доз и спектру активности [12]. Наряду с ноотропным эффектом, ГВС-111 обнаружил выраженную нейропротективную активность на таких моделях поражения мозга как травма, перинатальные повреждения [12]. На модели локальной ишемии коры большого мозга, вызванной воздействием сочетания интенсивного света и фоточувствительной краски, выявлена способность ГВС-111, введенного после ишемизирующего воздействия, уменьшать объем пораженной зоны мозга [10]. Исследованиями В. D. Watson и соавт. показано [15], что причиной некротического повреждения мозга в условиях этой модели ишемического инсульта является образование пристеночного тромба вследствие активации перекисного окисления в эндотелии сосуда. Это побудило нас исследовать влияние ГВС-111 на процессы тромбообразования. Проведение

этих исследований представлялось особенно целесообразным в свете обнаруженного ранее комплекса антитромботических эффектов у пролилсодержащих олигопептидов, в частности у модифицированного АКТГ 3 – 7, семакса [2].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы крысы линии Вистар массой 180 – 200 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария. Влияние ГВС-111 на свертываемость крови исследовали в условиях целого организма и в пробирочных экспериментах с использованием стандартных методов [4]. Исходя из литературных данных о высокой биологической стабильности дипептидов и собственных данных о достаточно высокой концентрации ГВС-111 при введении внутрь [3], в данной работе исследовали влияние, оказываемые на показатели свертываемости крови соединением ГВС-111 в условиях его введения внутривенно (1 мг/кг) и внутрь (10 мг/кг). В этих экспериментах ГВС-111 вводили в том же режиме, что и в экспериментах с фотоиндуцированным кортикальным тромбозом — в течение 10 дней [10]. Животным контрольной группы в тот же период вводили 0,9 % раствор натрия хлорида (внутривенно или внутрь соответственно). Каждая из перечисленных групп состояла из 7 – 8 крыс.

В экспериментах *in vitro* исследовали эффект ГВС-111 и циклического пролил-глицина (цикло-Про-Гли), который является, с одной стороны, основным метаболитом ГВС-111, а с другой — естественным метаболитом мозговой ткани [8]. В условиях пробирочного эксперимента ГВС-111 и цикло-Про-Гли добавляли в концентрациях 10^{-1} – 10^{-12} М; каждую концентрацию препарата исследовали на 8 – 10 образцах крови. В экспериментах обоих типов использовали кровь, взятую из яремной вены, с 0,129 М раствором цитрата в качестве антикоагулянтного средства (в отношении 9:1). Пробы крови

¹ Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина), института фармакологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Кафедра физиологии человека и животных (зав. — акад. РАМН И. П. Ашмарин) Биологического факультета МГУ.

центрифугировали при скорости 1000 g в течение 5 мин при температуре 20 – 22°C. 200 мкл богатой тромбоцитами плазмы отбирали и помещали в пластмассовую трубку для определения агрегации тромбоцитов. Чтобы оценить гемостатические параметры, кровь с цитратом центрифугировали при 3000 g в течение 10 – 12 мин при 20 – 22°C. В пробирочных экспериментах ГВС-111 и цикло-Про-Гли добавляли к плазме в одной из указанных выше концентраций. Образцы с добавлением вместо пептида 0,85 % раствора натрия хлорида служили контролем. Антикоагулянтную активность пептидов определяли на основании двух тестов : времени рекальцификации (ВР) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). В опытах *in vitro* для определения ВР 100 мкл пептидов вносили в реакционную смесь, содержащую 100 мкл плазмы субстрата и 100 мкл 0,025 М раствора хлорида кальция. Для определения АЧТВ использовали 0,3% раствор кефалина. Суммарная фибринолитическая активность (СФА) и неферментативная фибринолитическая активность (НФА) пептидов в присутствии плазмы крови была определена на пластинах нестабилизированного фибрина. Гель фибрина был получен в плоскостонных чашках Петри при смешивании 1 U тромбина в 100 мкл 0,85% раствора натрия хлорида с 5 мл 0,2% раствора фибриногена, содержащего 6 мг монооксусной кислоты (“Sigma”). СФА и НФА определяли по величине зоны растворения на геле фибрина (в мм²). 50 мкл образца (отношение плазмы к пептиду 1:1) нанесли на гель, и чашки инкубировали в течение 2 ч при 37°C. НФА измеряли аналогичным образом, но для снижения ферментативного фибринолиза к образцам добавляли равный объем 6% -амино-капроновой кислоты. Активность активатора плазминогена (АП) определяли на стандартных фибриновых пластинах. Активность фактора XIIIa определяли по скорости полимеризации фибрина, катализируемой тромбином. Агрегацию тромбоцитов определяли согласно методу J. V. R. Born [6] с добавлением к обогащенной тромбоцитами плазме крови 2 мкМ АДФ (“Sigma”) в качестве агониста агрегации. В пробирочных экспериментах к плазме крови добавляли 50 мкл пептида в различных концентрациях. Агрегацию выражали в относительных единицах и в процентах.

Все данные были проанализированы по *t*-критерию Стьюдента. Показатели *p* < 0,05 рассматривались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные в экспериментах с внутривенным введением ГВС-111 представлены на рисунке, а, результаты экспериментов с пероральным введением препарата на рисунке, б. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГВС-111 оказывает анти-тромботический эффект, влияя на различные этапы свертывания крови.

Для более детальной оценки активности ГВС-111 были выполнены эксперименты *in vitro*. Результаты представлены в табл. 1.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что ГВС-111 в условиях пробирочного эксперимента оказывает антикоагулянтное действие (увеличивает АЧТВ и ВР), проявляет фибринолитическую активность (увеличивает индекс СФА). В большинстве изученных концентраций ГВС-111 уменьшает активность фактора XIIIa.

Результаты изучения цикло-Про-Гли представлены в табл. 2.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что цикло-Про-Гли оказывает антикоагулянтное и фибринолитическое действие. Наиболее эффективной концентрацией цикло-Про-Гли в условиях пробирочного эксперимента оказалась 10⁻¹⁰, в которой этот дипептид оказывал выраженное антиагрегационное действие, снижая агрегацию тромбоцитов до 1,6% по сравнению с контролем.

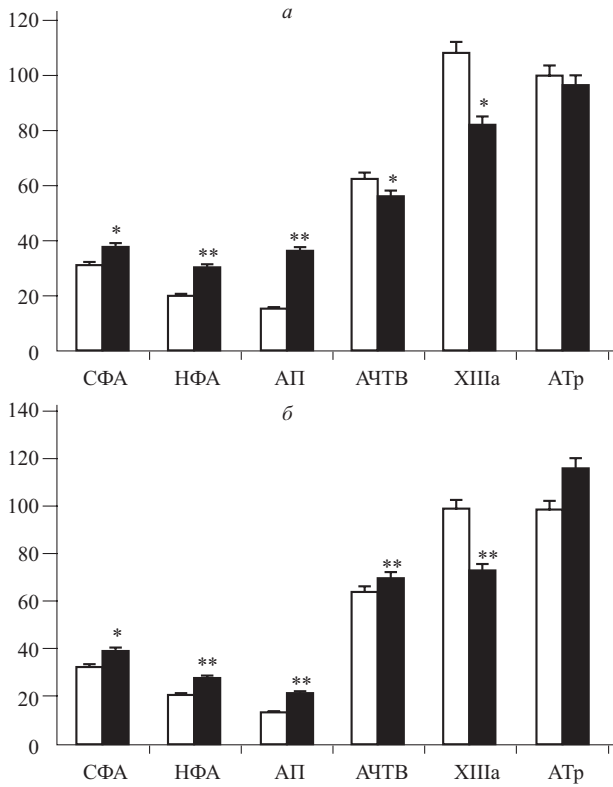
Полученные в настоящей работе данные об увеличении под влиянием ГВС-111 параметров НФА свидетельствуют о способности ГВС-111 препятствовать тромбообразованию на стадии превращения фибриногена в фибрин, а повышение показателей СФА и активности тканевого активатора плазминогена указывает на фибринолитические свойства ГВС-111. Соединение также усиливает деполимеризацию фибрина, снижая активность фактора XIIIa, известного как стабилизатор полимеризации фибрина после формирования устойчивого сгустка с ковалентными связями. Это эффект проявляется в случае парентерального введения ГВС-111 и при введении препарата внутрь. Увеличение показателя АЧТВ, указывающее на способность ГВС-111 замедлять превращение протромбина в тромбин, т.е. оказывать антикоагулянтный эффект, выявлено только при пероральном введении дипептида.

Перечисленные эффекты, выявленные в условиях целого организма, в основном воспроизводятся и в условиях пробирочного эксперимента, т.е. при непосредственном воздействии дипептида на кровь. В этих условиях многокомпонентная антитромботическая активность продемонстрирована не только у ГВС-111,

Таблица 1. Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативная активность (НФА), активность активатора плазминогена (АП), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), время рекальцификации (ВР), уровень фактора XIIIa, агрегация тромбоцитов (АТр) в плазме крови крыс при добавлении к ней ГВС-111 в разных концентрациях (M t)

Концентрация препарата, M	СФА*, мм ²		НФА, мм ²		АП, мм ²		АЧТВ, с		ВР, с		XIIIa, ед/мл	АТр, %	
10 ⁻⁴	34	5,2	20,5	2	11,2	1	68,3	3,2**	102	3*	60*	98,4	3,1
10 ⁻⁶	30	2	20	0,9	10	0,7	75	2**	77,5	2,0*		125,4	11,1*
10 ⁻⁸	33	2,8	20	1,1	10	0,9	72	12	70	3,2	70	101,6	2,4
10 ⁻¹⁰	30	1,9	19	1,3	9,2	1			80	9,1	90	100	12,6
10 ⁻¹¹	29,3	1	20	2	10	0,9	62,5	20	60	2		98,4	10,5
0,85% NaCl	27,8	3	18	3,3	10	2,1	53,3	2	67	2,2	80	100	6,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы относительно соответствующих проб контроля: * — *p* < 0,01; ** — *p* < 0,05.



Влияние ГВС-111, введенного в течение 10 дней внутривенно в дозе 1 мг/кг (а) и внутривенно в дозе 10 мг/кг (б), на суммарную фибринолитическую активность (СФА, мм²), неферментативную активность (НФА, мм²), активность активатора плазминогена (АП, мм²), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, с), уровень фактора XIIIa (в ед/мл), агрегацию тромбоцитов (АТр).

Светлые столбики — контроль, 0,9% NaCl, темные — ГВС-111. Различия статистически значимы при: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

но и у его основного метаболита цикло-Про-Гли. У этого циклического дипептида выявлена также и антиагрегационная активность. Важно подчеркнуть, что эти эффекты *in vitro* воспроизведены при таких концентрациях изученных дипептидов, которые могут иметь место в крови при их системном введении ($10^{-5} - 10^{-6}$ М). Интересно отметить, что цикло-Про-Гли проявляет антиагрегационный эффект в еще более низких концентрациях (10^{-10} М).

J. A. Zivin [14] указывает, что лечение ишемического инсульта должно базироваться на использовании двух видов терапии: тромболитической и нейропротективной. Недостатком большинства известных тромболитических препаратов является высокий риск геморрагических осложнений [9]. ГВС-111 не влияет на показатели первичного гемостаза, что исключает развитие под его влиянием кровоточивости.

Особенностью ГВС-111, выявленной нами ранее, является наличие у него выраженного нейропротективного действия. Известно, что каскад метаболических сдвигов в условиях ишемии включает следующие основные звенья. Субстратный дефицит и снижение потенциала нейрональных мембран ведет к массивному выбросу возбуждающих аминокислот. Возникающее в результате этого накопление цитоплазматического кальция сопровождается повышением концентрации свободнорадикального кислорода и активацией Са-зависимых протеолитических энзимов. Показано, что ГВС-111 действует нормализующим образом на все три основных звена метаболической патологии. Так, в экспериментах на культуре тканей зернистых нейронов мозжечка выявлена способность ГВС-111 (10^{-6} М) уменьшать гибель клеток, вызванную воздействием глутамата в нейротоксических концентрациях (75 мМ) [1]. Выявлена антиоксидантная активность ГВС-111 *in vivo* в условиях стрессорных воздействий [5]. Обнаружен нейропротективный эффект ГВС-111 на различных нейрональных моделях *in vitro*: культуре тканей нейронов коры большого мозга [11] и мозжечка, подвергшихся действию H₂O₂ и глюкозно-кислородной депривации [1]. В экспериментах на изолированных нейронах виноградной улитки продемонстрирован блокирующий эффект ГВС-111 ($10^{-8} - 10^{-9}$ М) в отношении потенциал-зависимых кальциевых и калиевых каналов [13]. Не исключено, что способность ГВС-111 уменьшать эффекты кальция может играть определенную роль в реализации не только нейропротективного действия, но также и замедляющего влияния дипептида на процессы тромбообразования, основные этапы которого являются кальций-зависимыми.

Таблица 2. Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативная активность (НФА), активность активатора плазминогена (АП), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), время рекальцификации (ВР), агрегация тромбоцитов (АТр), уровень фактора XIIIa в плазме крови крыс при добавлении к ней цикло-Про-Гли в разных концентрациях (М м)

Концентрация препарата, М	СФА, мм ²	НФА, мм ²	АП, мм ²	АЧТВ, с	ВР, с	XIIIa, ед/мл	АТр, %
10 ⁻⁴	36 0,2**	25 0,1**	9,8 0,3	30 0,9	70 2,2	100	
10 ⁻⁵	36 0,6**	25 0,1**	9,8 0,5	32 2,6	90 1*	—	30,0 5,7**
10 ⁻⁶	36 0,9**	25 0,1**	9,6 0,3	33 2,8	70 2,1	100	61,0 11,2*
10 ⁻⁸	30 1*	20 5**	10,5 1,0	33 2,9	83 3,1	100	40,0 7,1**
10 ⁻¹⁰	30 0,2*	20 0,1*	9,0 0	38 2,3*	92 2,1*	80	1,6 1,1**
10 ⁻¹¹	30 0,1*	20 0,1*	9,0 0	37 2,5*	86 2,0*	—	60 0,5
0,85% NaCl	25 1,3	16 2	9,4 1,4	28 1,3	77 2,9	100	100 8,5

На сегодняшний день на разных фазах клинических испытаний находятся несколько десятков препаратов, влияющих на то или иное звено названного метаболического каскада. Введение блокаторов Са-каналов сопровождается существенными изменениями гемодинамики с последующим “обкрадыванием” мозга.

Значительная часть антиоксидантов проявляет нейрорепротективный эффект лишь в условиях предварительного введения, но не на фоне развившейся патологии. Для большинства блокаторов глутаматергических рецепторов характерно развитие выраженных побочных эффектов со стороны ЦНС вплоть до психотических состояний. Нейротропная активность ГВС-111 носит избирательный характер и проявляется только в восстановлении нарушенных мнестических функций; каких-либо дополнительных эффектов в отношении ЦНС у этого препарата не выявлено. Препарат характеризуется большой терапевтической широтой и низкой токсичностью.

Сочетание у ГВС-111 нейрорепротективных и антитромботических свойств при отсутствии перечисленных выше отрицательных эффектов позволяет полагать, что его применение может открыть новые возможности эффективной терапии инсульта. Исходя из литературных предпосылок и собственных данных о высокой биологической стабильности дипептидов [3] и сохранении антитромботического эффекта ГВС-111 при его пероральном введении, полагаем, что речь может идти как о терапии острой фазы заболевания с использованием парентеральных путей введения, так и о длительной пероральной терапии постинсультных состояний и цереброваскулярной недостаточности.

ВЫВОДЫ

1. Пролилсодержащий дипептид ГВС-111 (ноопепт) оказывает выраженный антитромботический эффект, проявляя как в случае введения внутривенно (1 мг/кг), так и внутрь (10 мг/кг) антикоагулянтную и фибринолитическую активность, усиливая дестабилизацию фибрина, снижая активность фактора XIIIa.

2. ГВС-111 и его основной метаболит цикло-L-пролилглицин *in vitro* также проявляют указанные выше свойства. Цикло-L-пролилглицин, кроме того, оказывает выраженное антиагрегационное действие.

3. Наличие у ГВС-111 антитромботических свойств в сочетании с нейрорепротективной активностью позволяют полагать перспективной разработку препарата в качестве средства лечения ишемических инсультов.

Работа поддержана грантами РФФИ 99-04-48476, 00-04-48624а, 00-04-48627а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Андреева, Е. В. Стельмашук, Н. К. Исаев, и др., *Бюл. экпер. биол.*, **130**(10), 418 – 421 (2000).
2. И. П. Ашмарин, Е. П. Карасева, Л. А. Ляпина, Г. Е. Самонина, *Биохимия*, **63**, 149 – 155 (1998).
3. С. С. Бойко, Р. У. Островская, В. П. Жердев, и др. *Бюл. экпер. биол.*, **129**(4), 426 – 429 (2000).
4. В. В. Долгов, Н. А. Авдеева, К. А. Щегинкович, *Методы исследования гемостаза*, Минздрав, Москва, (1996), сс. 3 – 58.
5. А. В. Лысенко, Р. У. Островская, Е. И. Ускова, и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **60**, 15 – 18 (1997).
6. J. V. R. Born, *Nature*, **194**, 927 – 929.8520 (1962).
7. T. Gudasheva, T. Voronina, R. Ostrovskaya, et al., *J. of Med. Chemistry*, **31**, 157 (1996).
8. T. Gudasheva, R. Ostrovskaya, S. Wojko, et al., *Eur. J. of drug metabolism and pharmacokinetics.*, **22**, 245 – 252 (1997).
9. K. R. Lees, *Pharmacology of cerebral ischemia*, Ed. Kriegelstein Sc. Publ. Stuttgart (1996), pp. 691 – 699.
10. R. Ostrovskaya, G. A. Romanova, I. V. Barskov, et al., *Behav. Pharmacol.*, **10**, 549 – 563 (1999).
11. R. Ostrovskaya, J. Busciglio, T. Grechenko, et al., *2nd Eur. congress of Pharmacol. Drugs against disease to improve quality of life: gateway to the 21 st Century through EPHAR symposia*, PS82 (1999).
12. S. B. Seredenin, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., US Patent № 5, 439, 930, Aug., 1995.
13. E. I. Solnzeva, Yu. I. Bukanova, et al., *Gen. Pharmacol.*, **29**, 101 – 104 (1997).
14. I. A. Zivin, *Neurology.*, **53**(1), 14 – 19 (1999).
15. B. D. Watson, W. D. Dietrich, R. Busto, et al., *Ann. Neurol.*, **17**, 497 – 504 (1985).

Поступила 26.03.2001

A MULTICOMPONENT ANTITHROMBOTIC EFFECT OF THE NEUROPROTECTOR PROLYL-CONTAINING DIPEPTIDE GVS-111 AND ITS METABOLITE CYCLO-L-PROLYLGLYCINE

R. U. Ostrovskaya¹, L. A. Lyapina², V. E. Pastorova², T. Kh. Mirzoev¹, T. A. Gudasheva¹, S. B. Seredenin¹, and I. P. Ashmarin²

¹ Laboratory of Psychopharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

² Department of Human and Animal Physiology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia Moscow

The experiments *in vivo* showed that the new nootropic prolyl-containing GVS-111 produces an antithrombotic effect, influencing various stages of the blood coagulation process. GVS-111 exhibits anticoagulant and fibrinolytic properties and enhances fibrin destabilization by reducing the XIIIa factor activity. These effects are manifested upon both intraperitoneal (1 mg/kg) and peroral (10 mg/kg) administration of GVS-111 (in both cases, a single daily treatment over a period of 10 days). The same effects (anticoagulant, fibrinolytic, antifibrin-stabilizing) were observed in *in vitro* experiments with both GVS-111 (10^{-3} – 10^{-6} M) and its main metabolite cyclo-L-prolyl-glycine (up to 10^{-10} M). In addition, the latter metabolite exhibited an antiaggregant effect. The antithrombotic activity of GVS-111, together with previously established neuroprotector properties, low toxicity, and the absence of complications, makes this compound a promising antistroke drug.