

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-891

А. А. Спасов¹, А. Ф. Кучерявенко¹, В. А. Анисимова²

Исследовано влияние нового конденсированного производного бензимидазола РУ-891, проявляющего антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo*, на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика. Выявленная способность соединения РУ-891 снижать прирост внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированный тромбином, превосходящая препараты сравнения не связана с действием данного вещества на потенциал зависимые кальциевые каналы.

Ключевые слова: антиагрегантная активность; внутриклеточный кальций; производное бензимидазола

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря особым физико-химическим характеристикам, ионы кальция (Ca^{2+}) являются наиболее универсальными внутриклеточными посредниками, сопрягающими процессы, развивающиеся на поверхности тромбоцитов, с цитоплазматическими механизмами [11]. Биохимические процессы активации тромбоцитов с их последующей агрегацией различны, что обусловлено неодинаковым характером инициаторов агрегации. Однако все известные агонисты так или иначе способствуют увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Поэтому можно утверждать, что данным ионам принадлежит центральная роль в процессах агрегации тромбоцитов [12]. Источники Ca^{2+} могут быть внутри- и внеклеточными. Однако в регуляции функций тромбоцитов важную роль играют внутриклеточные ресурсы. Основными источниками внутриклеточного Ca^{2+} являются эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Изменение концентрации внутриклеточного кальция тромбоцитов является сигналом для активации или ингибирования ферментов, которые в свою очередь регулируют метаболизм, сократительную и секреторную активность, адгезию и клеточный рост [6]. Также известно, что повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах приводит к активации Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 , отщеплению от мембранных фосфолипидов арахидоновой кислоты и последующему образованию из нее тромбоксана A_2 , который по принципу положительной обратной связи способствует усилению стимуляции и вовлечению в процесс тромбообразования новых циркулирующих тромбоцитов [9].

Химический класс производных бензимидазола считается перспективным для разработки эффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов [1, 3]. В проведенных ранее исследованиях, среди соединений

данного класса выявлено вещество под шифром РУ-891, которое способно активно подавлять агрегацию тромбоцитов в опытах *in vitro* и *in vivo*. Этот факт послужил основанием для продолжения исследований с целью уточнения некоторых механизмов его антиагрегантного действия. Поэтому была предпринята попытка определить изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов экспериментальных животных под действием данного вещества.

Целью исследования явилось изучение влияния соединения РУ-891, ацетилсалициловой кислоты и верапамила на уровень внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах кролика, активированных тромбином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе проведено экспериментальное исследование влияния производного бензимидазола РУ-891 (гидробромид 9-[2-(3,4-диоксифенил)-2-оксоэтил]-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) [НИИ физической и органической химии ЮФУ] на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика [4]. Изучение влияния соединения РУ-891 на агрегацию тромбоцитов, вызванную кальциевым ионофором (A23187) в концентрации 3 мкМ проводили по методу Born G, в модификации З. А. Габбасова (1989) [2]. Исследования проводили на отмытых тромбоцитах кролика [9]. Соединение РУ-891 изучали в диапазоне концентраций 100 – 1 мкМ. Для оценки активности соединения определяли максимальную амплитуду агрегации, Δ % ингибирования функциональной активности тромбоцитов и ЭК_{50} в молях.

Определение изменений уровня внутриклеточного кальция проводили согласно методу, описанному Т. С. Cho и соавт. [5]. Для этого отмытые тромбоциты ($10^8/\text{мл}$) кролика были проинкубированы с 5 мкМ Fura-2/AM в течение 30 мин при $t = 37^\circ\text{C}$ в присутствии или отсутствии хлорида кальция (1 мМ). В качестве препаратов сравнения были выбраны антиагрегантное средство ацетилсалициловая кислота (“Sigma”, США), не влияющая на кальциевый гомеостаз, и антагонист ионов кальция верапамил (ЗАО “Северная звез-

¹ Кафедра фармакологии (зав. — акад. РАМН А. А. Спасов) ВолгГМУ, 400131, Волгоград, Площадь Павших борцов, 1.

² НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Проспект Стачки, 194/2.

да”, Россия). В качестве стимулятора выхода кальция из внутриклеточных депо был использован тромбин в концентрации 0,5 ед/мл.

Хелатирующая способность соединения РУ-891 по отношению к ионам кальция была изучена в интактных тромбоцитах в сравнении с ЭГТА (этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир тетрауксусной кислоты) (“Sigma”, США).

Оценку действия соединений и препаратов сравнения на уровень внутриклеточного кальция проводили в диапазоне концентраций от 100 до 1 мкМ.

Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi MPF-400 (Япония) при длине волны возбуждения 340 нм и 380 нм и длине волны испускания 510 нм в течение 2 мин. Концентрацию Ca^{2+} рассчитывали с помощью уравнения (J. Schaeffer и M. P. Blaustein [10]):

$$[Ca^{2+}]_i \text{ (нМ)} = 224 \text{ нМ} \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F),$$

где 224 нМ — константа диссоциации комплекса Fura-2/AM и кальция; F — интенсивность флуоресценции зонда в пробе (в отн. ед.) с тромбином, без и с веществами; F_{min} — собственная флуоресценция зонда, свободного от кальция, измеренная после добавления 10 мМ ЭГТА; F_{max} — флуоресценция зонда, насыщенного кальцием, измеренная после добавления в пробу 10 мкМ 0,1 % Triton X-100.

Для изученных соединений были экспериментально определены величины $ЭК_{50}$ (эффективные концентрации, в которых изученные соединения подавляют процесс высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} на 50 %).

Действие соединений на потенциалзависимые кальциевые каналы изучали, используя метод гиперкалиевой контрактуры [7]. Вещество было изучено в диапазоне концентраций 100 – 1 мкМ. В качестве препарата сравнения использовали антагонист Ca^{2+} — верапамил.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Соединение РУ-891 достоверно ингибировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную кальциевым ионофором А 23187 в концентрации 100 мкМ на 76 %. При снижении дозы в 10 и 100 раз данное вещество проявляло менее выраженную ингибирующую активность, которая составила 52,4 ($p < 0,01$) и 11,1 % ($p > 0,05$), соответственно. $ЭК_{50}$ соединения РУ-891 при этом было равно 13 мкМ (таблица).

В дальнейшем была изучена хелатирующая способность соединения РУ-891 по отношению к ионам кальция. В результате этого, было показано, что данное вещество в отличие от ЭГТА не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что соединение РУ-891 не является хелатором ионов кальция.

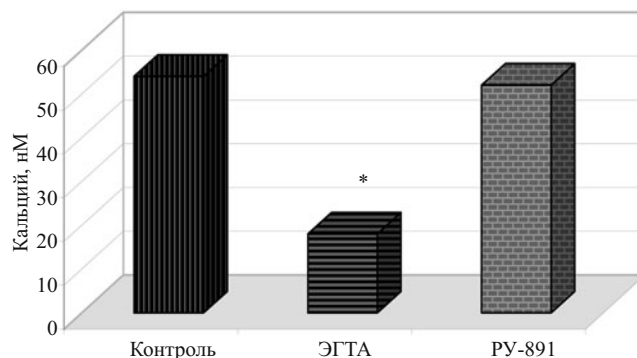


Рис. 1. Влияние соединения РУ-891 и ЭГТА на связывание ионов кальция в интактных тромбоцитах.

* — данные статистически значимы по отношению к группе контрольных животных, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Для того, чтобы определить, является ли действие соединения РУ-891 и препаратов сравнения на уровень цитоплазматической концентрации Ca^{2+} результатом ингибирования входа и мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо, эксперименты были выполнены в два этапа как в присутствии, так и в отсутствие физиологических концентраций Ca^{2+} . На первом этапе индуцированный тромбином выход Ca^{2+} из клеточных депо в присутствии физиологических концентраций сопровождался увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} с базального уровня 50,6 нМ до 259,6 нМ. Данный показатель был принят за контроль. Соединение РУ-891, добавленное за 2 мин до индукции тромбином, дозозависимо ингибировало увеличение содержания внутриклеточного кальция. Соединение РУ-891 в концентрации 100 мкМ почти полностью блокировало выход внутриклеточного Ca^{2+} , количество которого в пробе составило 10,3 нМ, что соответствовало 95 % ингибирования данного процесса (рис. 2). В дозах 10 мкМ и 1 мкМ данное вещество ингибировало индуцированное тромбином увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах на 85,6 и 24,5 % соответственно (рис. 3). $ЭК_{50}$ для соединения РУ-891 составило 3,6 мкМ.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 100 мкМ оказалась не эффективной, так как не влияла на уровень внутриклеточного кальция, а антагонист ионов кальция верапамил достоверно снижал

Антиагрегантная активность соединения РУ-891 *in vitro* в отношении агрегации тромбоцитов, вызванной кальциевым ионофором в концентрации 3 мкМ ($M \pm m$)

Концентрация	Агрегация тромбоцитов, Δ % по отношению к контролю	$ЭК_{50}$, мкМ
100 мкМ	75,9 ± 2,7*	13
10 мкМ	52,4 ± 1,3*	
1 мкМ	11,1 ± 1,0	

* — данные статистически значимы по отношению к группе контрольных животных, критерий Манна-Уитни ($p < 0,01$).

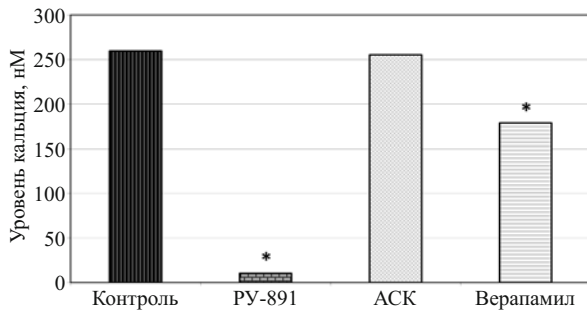


Рис. 2. Влияние соединения РУ-891 и препаратов сравнения в дозе 100 мкМ на уровень внутриклеточного кальция, индуцированный тромбином (кальциевая среда).

АСК — ацетилсалициловая кислота. * — данные статистически значимы по отношению к группе контрольных животных, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$). По оси абсцисс — названия препаратов, по оси ординат — значения уровня внутриклеточного кальция, нМ.

его. Выраженность ингибирующего эффекта при этом составила 33,3 % (рис. 2). Полученные данные соответствуют литературным данным по влиянию данных препаратов на кальциевый гомеостаз.

Таким образом, изученные соединения по их активности в отношении уменьшения прироста внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином в присутствии физиологических концентраций можно расположить в следующем порядке: РУ-891 > верапамил > ацетилсалициловая кислота.

При изучении влияния веществ на уровень внутриклеточного кальция в отсутствие внешнего Ca^{2+} ацетилсалициловая кислота была исключена из исследований ввиду своей неэффективности. Индуцированный тромбином выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо в безкальциевой среде сопровождался увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} с базального уровня 50,4 до 209,7 нМ.

Препарат сравнения верапамил в дозе 100 мкМ оказался неэффективным, так как количество кальция в клетке при введении препарата в пробу соответствовало контрольным значениям.

Соединение РУ-891 в дозе 100 мкМ практически полностью блокировало прирост внутриклеточного Ca^{2+} , по сравнению с контролем. Его количество в пробе составило 2,7 нМ. Процент ингибирования уровня внутриклеточного Ca^{2+} при этом соответствовал 98,7 %. При уменьшении концентрации соединения РУ-891 до 10 мкМ и 1 мкМ данный показатель составил 69,7 и 18,2 % соответственно. ЭК₅₀ соединения РУ-891 была равна 5,1 мкМ (рис. 3).

Далее представилось необходимым выяснить, не связана ли выраженная кальций-блокирующая активность соединения РУ-891 с влиянием на потенциалзависимые кальциевые каналы. Поэтому данное вещество было изучено на модели гиперкалиевой контрактуры.

Соединение РУ-891 в концентрации 100 мкМ не оказывало ингибирующего влияния на гиперкалиевую контрактуру. Препарат сравнения верапамил блокиро-

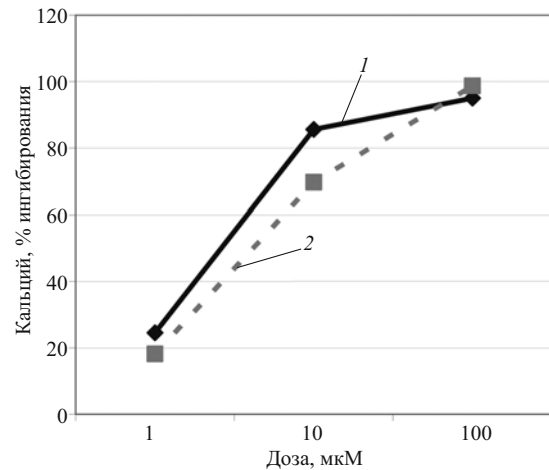


Рис. 3. Влияние соединения РУ-891 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином в кальциевой (1) и безкальциевой (2) среде.

По оси абсцисс — дозы, в которых было изучено соединение РУ-891, по оси ординат — Δ % ингибирования соединением РУ-891 уровня внутриклеточного кальция, как в присутствии внешнего кальция, так и при его отсутствии.

вал гиперкалиевую контрактуру на 95,15 %. А в концентрациях 10 и 1 мкМ выраженность ингибирования по отношению к контролю составила 64,29 и 53,78 % соответственно.

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что соединение РУ-891 ингибирует агрегацию тромбоцитов, вызванную кальциевым ионофором. В связи с тем что механизм активации красных кровяных пластинок под действием данного индуктора связан с входом в клетку ионов кальция и последующей стимуляцией высвобождения его из внутриклеточных депо, можно предположить, что соединение РУ-891 способно снижать уровень внутриклеточного кальция. Это было доказано и в последующих исследованиях в опытах с флуоресцентными зондами. Прирост флуоресценции Fura-2/AM, индуцированный тромбином, в присутствии внеклеточного Ca^{2+} отражает суммарное повышение внутриклеточного Ca^{2+} за счет входа в клетку и мобилизации из внутренних источников. В то же время увеличение флуоресценции Fura-2/AM, индуцированное тромбином в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} , отражает высвобождение ионов Ca^{2+} только из внутриклеточных депо. Как было показано, вещество РУ-891 выражено влияло на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах в отсутствие внешнего кальция, что позволяет предположить наличие у данного вещества действия именно на внутриклеточные кальциевые ресурсы.

В отличие от соединения РУ-891 препарат сравнения верапамил снижал уровень внутриклеточного Ca^{2+} только в кальциевой среде, за счет того, что блокировал вход ионов Ca^{2+} в клетку. Однако в безкальциевой среде верапамил был не активен, что доказывает отсутствие у данного вещества прямого влияния на высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В даль-

нейшем это было подтверждено в опытах с гиперкалиевой контрактурой портальной вены крыс, в результате которых было показано, что антикальциевый эффект верапамила связан с влиянием на потенциалзависимые кальциевые каналы, что совпадает с данными литературы [8]. В отличие от него у вещества РУ-891 данный эффект не наблюдали. Следовательно, полученные данные позволяют предположить, что антиагрегантное действие нового производного бензимидазола может быть связано с прямым влиянием на высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

ВЫВОДЫ

1. Соединение РУ-891 дозозависимо ингибирует агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную кальциевым ионофором (А 23187).

2. Вещество РУ-891 снижает содержание цитоплазматического кальция при активации тромбоцитов тромбином, эффективнее препарата сравнения верапамила.

3. Соединение РУ-891 не влияет на гиперкалиевую контрактуру портальной вены крысы.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Анисимова, А. А. Спасов, И. Е. Толпыгин, А. Ф. Кучерявенко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(9), 9 – 12 (2009).
2. З. А. Габбасов, Е. Г. Попов, И. Ю. Гаврилова и др., *Лаб. дело*, № 10, 15 – 18 (1989).
3. А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, Б. П. Майстренко, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(6), 27 – 29 (2009).
4. А. А. Спасов, В. А. Анисимова, В. И. Петров, А. Ф. Кучерявенко и др., № 2453312 РФ, *Бюлл. Открыт.*, № 17, (2012).
5. T. C. Chou, C. Y. Li, *Thromb. Res.*, № 96, 299 – 307 (1999).
6. W. L. Dean, *World J. Biol. Chem.*, **1**(9), 265 – 270 (2010).
7. K. Golenhofen, N. Hermstein, E. Lammel, *Microvasc. Res.*, **5**(1), 73 – 80 (1973).
8. A. Gonzalez, Mde L. Cabrera, M. Mellado, et al., *Plant Signal Behav.*, **7**(7), 728 – 32 (2012).
9. I. Jardin, J. J. Lopes, J. A. Pariente, et al., *Trends Cardiovasc Med.*, № 2, 57 – 81 (2008).
10. J. Schaeffer, M. P. Blaustein, *Cell Calcium*, **10**(2), 101 – 113 (1989).
11. L. Stefanini, R. C. Roden, W. Bergmeier, *Blood*, **114**(12), 2506 – 14 (2009).
12. D. Varga-Szabo, A. Braun, B. Nieswandt, *Thromb. Haemost.*, № 7, 1057 – 1066 (2009).

Поступила 26.04.13

CALCIUM-DEPENDENT MECHANISM OF THE ANTIPLATELET ACTIVITY OF BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE RU-891

A. A. Spasov¹, A. F. Kucheryavenko¹, and V. A. Anisimova²

¹ Research Institute of Pharmacology, Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131 Russia

² Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, ul. Stachki 194/2, Rostov-on-Don, 344090 Russia

We have studied the effect of the new benzimidazole derivative RU-891, known to exhibit antiaggregant activity *in vitro* and *in vivo*, on the level of intracellular calcium ions in platelets of laboratory rabbits. Compound RU-891 was found to inhibit the thrombin-induced growth of intracellular calcium ion level in thrombocytes. This effect exceeded the action of reference drugs and was not connected with the influence of RU-891 on the potential-dependent calcium channels.

Keywords: antiaggregant activity; intracellular calcium; benzimidazole derivatives