

ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НООТРОПОВ В УСЛОВИЯХ АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У КРЫС

В. И. Жилюк, А. Э. Левых, В. И. Мамчур¹

Исследовано влияние ноотропных средств — ноопепта, пентоксифиллина, пирацетама, прамирацетама, экстракта Гинкго Билоба, энтропа, цереброкурина и цитиколина на агрегацию тромбоцитов крови крыс с экспериментальным диабетом. Показано, что изученные средства в разной степени оказывают угнетающий эффект по отношению к гиперреактивности тромбоцитов в условиях хронической гипергликемии. При этом наибольшая универсальность антиагрегантного действия характерна для прамирацетама, энтропа и экстракта Гинкго Билоба.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, агрегация тромбоцитов, ноотропы

ВВЕДЕНИЕ

Атеротромботические осложнения являются ведущей причиной инвалидизации и смертности больных сахарным диабетом [8]. Гипергликемия негативно влияет на коагуляционный каскад, функцию эндотелия, адгезию и агрегацию тромбоцитов, активность моноцитов и макрофагов, а также фибринолиз. В тромбоцитах, так же, как и в эндотелиальных клетках, повышенный уровень глюкозы приводит к активации протеинкиназы C, снижению синтеза окиси азота (NO) и повышению образования активных форм кислорода (супероксид-анион, перекись водорода). Кроме того, у больных диабетом наблюдается повышенная экспрессия гликопротеина Ib (GPIb) на поверхности тромбоцитов, определяющего связывание тромбоцитов с фактором Виллебранда (начальный этап адгезии), а также комплекса GPIIb/IIIa, являющегося ключевым рецептором в процессе агрегации тромбоцитов. Эти нарушения могут быть обусловлены снижением эндотелиального синтеза антиагрегантов (окиси азота и простагличина), повышением образования активаторов тромбоцитов, таких как тромбин, фактор Виллебранда, тромбоксан A₂, F₂-изопропан, 8-изо-простагличин F_{2α}. Таким образом, диабетические расстройства запускают естественные механизмы активации тромбоцитов и снижают уровень эндогенных ингибиторов активности тромбоцитов. В то же время дисфункция тромбоцитов играет важную роль в патогенезе диабетической микро- и макрососудистой ангиопатии и может проявляться уже на раннем этапе диабета, а также служить причиной острой и хронической цереброваскулярной недостаточности, которая проявляется инсультами, когнитивным дефицитом и деменцией у данной категории больных [6, 10].

¹ Кафедра фармакологии, клинической фармакологии и фармакоэкономики (зав. — проф. В. И. Мамчур) Днепропетровской государственной медицинской академии, Украина, 49044, Днепропетровск, ул. Дзержинского, 9.

Одним из важных инструментов медикаментозной коррекции когнитивных расстройств являются ноотропы — средства, способные активизировать интегративную функцию мозга, оказывать стимулирующее влияние на процесс обучения, улучшать память и умственные способности, особенно при их нарушениях, а также повышать устойчивость мозга к влиянию негативных факторов [1].

Учитывая роль дисфункции тромбоцитов в развитии цереброваскулярной патологии, представляет интерес вопрос о воздействии ноотропных средств на систему сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ноотропов различных групп на способность тромбоцитов к агрегации в условиях аллоксанового диабета у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 74 белых крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 330 г, содержащихся в стандартных условиях вивария (температура воздуха 22 ± 2 °С, относительная влажность воздуха 40 – 60 %, светлый/темный цикл: 12/12 ч) и распределенных на 10 групп: I — интактные (пассивный контроль), n = 10; II — животные с экспериментальным аллоксановым диабетом (АД, активный контроль), n = 14; III — АД + пирацетам (500 мг/кг), n = 7; IV — АД + прамирацетам (300 мг/кг), n = 7; V — АД + экстракт Гинкго Билоба (EGb 761) в дозе 40 мг/кг, n = 6; VI — АД + цереброкурин (0,05 мл/кг), n = 6; VII — АД + цитиколин (500 мг/кг), n = 6; VIII — АД + пентоксифиллин (100 мг/кг), n = 6; IX — АД + N-фенилацетил-L-пролил глицина (ноопепт) в дозе 10 мг/кг, n = 6; X — АД + N-карбамоил-метил-4-фенил-2-пирролидон (энтроп) в дозе 100 мг/кг, n = 6.

Исследования проведены согласно Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях, от 18.03.1986 г.

Экспериментальный диабет моделировали путем однократного подкожного введения водного раствора аллоксана моногидрата (“Sigma”, США) в дозе 150 мг/кг в виде 5 % раствора в ацетатном буфере (рН 4,5), после предварительной 24-часовой депривации пищи при сохраненном доступе к воде [9, 12]. Для снижения смертности животных вследствие гипогликемического шока после введения аллоксана крысы в течение 24 ч после индукции диабета вместо воды получали 5 % раствор глюкозы.

Уровень глюкозы в крови, полученной из хвостовой вены, определяли с помощью глюкометра Optium Omega (“Abbot Diabetes Care Inc.”, США) на 11-е сутки после введения аллоксана. Для последующих исследований использованы только животные с гипергликемией (> 11 ммоль/л) [9]. Препараты вводили внутривенно в указанных дозах 1 раз в сутки на протяжении 20 дней, начиная с 11 дня эксперимента. Животным I и II групп на протяжении исследования в соответствующем объеме внутривенно вводили дистиллированную воду.

На 30-й день исследования у животных всех групп в условиях тиопенталового наркоза производили внутрисердечный (из правого желудочка) забор крови. Венозную кровь, стабилизированную 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, центрифугировали на малой скорости (15 мин при 100g) для получения плазмы, богатой тромбоцитами (platelet rich plasma — PRP), которую использовали для исследования функциональной активности тромбоцитов. Оставшуюся

кровь повторно центрифугировали на более высокой скорости (15 мин при 2000g), образовавшийся верхний слой, представляющий собой бестромбоцитарную плазму (platelet poor plasma — PPP), применяли для калибровки шкалы оптической плотности прибора.

Исследование способности тромбоцитов к агрегации проводили по методу G. V. Born на анализаторе агрегации тромбоцитов SOLAR AP 2110, используя в качестве индукторов растворы коллагена — 2 мг/мл (Технология-стандарт, Российская Федерация) и аденозиндифосфата (АДФ) — 5 и 20 мкмоль/л (Ренам, Российская Федерация) [2]. Определяли максимальную степень и скорость агрегации.

Обработку результатов производили с помощью программы статистического анализа StatPlus, AnalystSoft, версия 2006 (см. <http://www.analystsoft.com/ru/>). Достоверность отличий средних арифметических (p) определяли с помощью непараметрического U -критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов (таблица) показал, что формирование аллоксанового диабета у крыс сопровождается гиперреактивностью тромбоцитов. Так, степень и скорость коллаген-индуцированной агрегации в сопоставлении с группой животных пассивного контроля увеличивались на 35,4 ($p < 0,001$) и 24,9 % ($p < 0,05$) соответственно. Степень и скорость АДФ (5 мкмоль/л)-индуцированной агрегации тромбоцитов также повышались на 52,3 ($p < 0,01$) и 39,5 %

Показатели максимальной степени и скорости агрегации у крыс с аллоксановым диабетом на фоне применения ноотропных средств ($M \pm m$)

Группа животных	Степень агрегации, %			Скорость агрегации, %/мин		
	Коллаген	АДФ-5	АДФ-20	Коллаген	АДФ-5	АДФ-20
Пассивный контроль ($n = 10$)	57,4 \pm 2,86***	34,4 \pm 2,24**	54,3 \pm 2,43**	49,8 \pm 3,69*	41,3 \pm 3,79**	44,1 \pm 3,42*
Активный контроль ($n = 14$)	77,7 \pm 3,01	52,4 \pm 2,79	70,5 \pm 3,88	62,2 \pm 3,04	57,6 \pm 2,99	58,9 \pm 3,79
Ноопепт, 10 мг/кг ($n = 6$)	78,6 \pm 1,83	43,7 \pm 2,34*	56,6 \pm 2,18*	49,0 \pm 2,70*	45,7 \pm 2,30*	69,8 \pm 3,62
Пентоксифиллин, 100 мг/кг ($n = 6$)	67,8 \pm 4,15	39,9 \pm 2,79*	53,6 \pm 4,69*	26,3 \pm 4,24***	52,7 \pm 3,26	40,3 \pm 0,91*
Пирацетам, 500 мг/кг ($n = 7$)	72,6 \pm 5,41	42,3 \pm 4,33	54,7 \pm 5,60*	27,5 \pm 2,56***	55,6 \pm 4,66	45,6 \pm 4,36
Прамирацетам, 300 мг/кг ($n = 7$)	19,9 \pm 4,78***	8,8 \pm 1,44***	47,1 \pm 3,06***	9,5 \pm 2,00***	11,1 \pm 2,53***	36,0 \pm 0,10*
Цереброкурин, 0,05 мл/кг ($n = 6$)	61,4 \pm 4,49*	44,7 \pm 5,06	50,3 \pm 3,83	29,9 \pm 6,16***	45,5 \pm 4,96	39,4 \pm 3,17**
Цитиколин, 500 мг/кг ($n = 6$)	84,2 \pm 2,89	49,6 \pm 4,58	62,0 \pm 4,18	48,3 \pm 4,44*	56,3 \pm 4,49	55,5 \pm 4,18
Экстракт Гинкго Билоба, 40 мг/кг ($n = 6$)	61,5 \pm 3,52*	35,6 \pm 1,30**	53,9 \pm 2,77*	23,3 \pm 3,64***	39,7 \pm 1,77**	37,5 \pm 2,43**
Энтроп, 100 мг/кг ($n = 6$)	31,9 \pm 6,54***	28,1 \pm 4,97**	34,3 \pm 2,22***	23,6 \pm 2,10***	33,2 \pm 3,64**	37,5 \pm 5,62*

($p < 0,01$) соответственно. Сопоставимые данные получены при использовании в качестве индуктора агрегации АДФ в концентрации 20 мкмоль/л, когда изученные параметры на 29,8 ($p < 0,01$) и 33,6 % ($p < 0,05$) превышали показатели группы интактных животных.

Исследование влияния ноотропных препаратов на максимальную степень коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов выявило, что наибольшее снижение этого показателя — на 74,4 ($p < 0,001$) и 58,9 % ($p < 0,001$) — наблюдалось при введении животным прамирацетама и энтропа соответственно (таблица). Подобная динамика в изменениях этого показателя наблюдалась также под действием цереброкурина и EGb 761, которые практически в равной степени — на 21 % ($p < 0,05$) — снижали данный показатель. Введение животным пирацетама, пентоксифиллина и ноопепта не оказывало значимого влияния на максимальную степень коллаген-индуцированной агрегации. Подобная картина наблюдалась при использовании в качестве индуктора АДФ в концентрации 5 мкмоль/л. Так, по уровню влияния на максимальную степень агрегации исследуемые средства расположились следующим образом: прамирацетам (10 мг/кг) снижал исследуемый показатель на 83,2 % ($p < 0,001$), энтроп — на 46,4 % ($p < 0,01$), EGb 761 — на 32,1 % ($p < 0,01$), пентоксифиллин — на 23,8 % ($p < 0,05$), ноопепт — на 16,6 % ($p < 0,05$). Достаточно выраженная тенденция к уменьшению этого значения отмечалась и при введении пирацетама, который снижал его на 19,3 % ($p = 0,068$). Цереброкурин в данных условиях эксперимента не оказывал воздействия на изучаемый параметр. Применение в качестве индуктора АДФ в концентрации 20 мкмоль/л характеризовалось значительным снижением степени агрегации при использовании большинства исследуемых средств (таблица). Единственным из изученных нейропротекторов, который не оказывал влияния на максимальную степень коллаген- и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, был цитиколин.

Кроме того, анализ данных агрегатограмм показал, что по влиянию на скорость агрегации изученные ноотропы также отличаются между собой. Однако исследование показало и то, что изменение этого параметра в большинстве наблюдений соответствовало динамике результатов, полученных при изучении максимальной степени агрегации (таблица). Отличительным моментом при исследовании этого критерия служило то, что все без исключения препараты значимо тормозили скорость коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Согласно представленным данным, большинство изученных нами ноотропных средств оказывает положительное влияние на повышенную агрегационную способность тромбоцитов в условиях экспериментального аллоксанового диабета. Тем самым указанные лекарственные средства могут препятствовать развитию

тромботических осложнений. Механизмы данных эффектов во многом остаются неясными и требуют проведения дальнейших исследований. Однако для ряда ноотропов можно предположить связь их механизмов действия с влиянием на агрегацию тромбоцитов. Так, для гинкголидов (основных БАВ экстракта Гинкго Билоба) показана способность блокировать рецепторы фактора активации тромбоцитов (ФАТ), который является одним из основных проагрегантов [11]. Гинкголид В оказывает также активирующее влияние на матриксную металлопротеиназу-9 (ММП-9), которая в активном состоянии дозозависимо подавляет агрегацию тромбоцитов, мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} и продукцию тромбоксана A_2 [3]. ММП-9 значительно повышает в тромбоцитах образование циклических нуклеотидов (цАМФ, цГМФ) — главных внутриклеточных медиаторов эндогенных антиагрегантов (простациклина и окиси азота). Уменьшение агрегации тромбоцитов под влиянием пирацетама, вероятно, связано с его положительным влиянием на деформируемость эритроцитов и, как следствие, снижением высвобождения АДФ из поврежденных клеток [15]. Кроме того, пирацетам способен уменьшать уровни фактора Виллебранда и фибриногена в плазме крови, а также усиливать синтез простациклина эндотелием [13]. Эффект прамирацетама может быть обусловлен увеличением активности NO-синтазы с последующим увеличением продукции мощного ингибитора агрегации тромбоцитов — окиси азота [4]. Пентоксифиллин способствует накоплению цАМФ вследствие ингибирования фосфодиэстеразы в тромбоцитах [7]. Кроме того, этот препарат усиливает образование простациклина сосудистым эндотелием и повышает фибринолитическую активность крови [14]. Важным моментом является и то, что пентоксифиллин не оказывает влияния на проагрегантный статус путем уменьшения вязкости плазмы / цельной крови и увеличения деформируемости эритроцитов (т.е. не влияет на реологические свойства крови), как это было принято считать ранее [5].

В литературе нами не обнаружены данные о способности ноотропных средств изменять уровни гликемии и гликозилированного гемоглобина у больных сахарным диабетом. Нераскрытыми, но весьма интересными являются вопросы фармакодинамического взаимодействия препаратов этой группы с сахароснижающими средствами в условиях диабетической патологии. Данный аспект служит объектом наших дальнейших исследований.

Таким образом, проведенные исследования указывают на снижение гиперреактивности тромбоцитов под влиянием изученных ноотропных средств в условиях хронической гипергликемии. Наибольшая универсальность антиагрегантного действия характерна для прамирацетама, энтропа и экстракта Гинкго Билоба. Эти данные могут служить предпосылкой для дальнейшего изучения механизмов антиагрегантной ак-

тивности этих средств, а также изучения этого вопроса в условиях клиники.

ВЫВОДЫ

1. Формирование аллоксанового диабета у крыс сопровождается повышением способности тромбоцитов к агрегации.

2. Использование ноотропных средств способствует снижению гиперреактивности тромбоцитов при этом состоянии.

3. По степени антиагрегантной активности в условиях хронической аллоксан-индуцированной гипергликемии исследованные препараты размещаются следующим образом: прамирацетам \geq энтроп > экстракт Гинкго Билоба > цереброкурин > пентоксифиллин \geq ноопепт > пирацетам > цитиколин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(4), 44 – 58 (2007).
2. G. V. R. Born, *Nature*, **194**, 927 – 929 (1962).
3. H. J. Cho, Y. H. Shon, K. S. Nam, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(12), 2340 – 2344 (2007).
4. M. T. Corasaniti, A. M. Paoletti, E. Palma, et al., *Funct. Neurol.*, **10**(3), 151 – 155 (1995).
5. D. L. Dawson, Q. Zheng, S. A. Worthy, et al., *Angiology*, **53**(5), 509 – 520 (2002).
6. E. van Duinkerken, M. Klein, N. S. M. Schoonenboom, et al., *Diabetes*, **58**, 2335 – 343 (2009).
7. D. M. Essayan, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**(5), 671 – 680 (2001).
8. J. L. Ferreira, J. A. Gómez-Hospital, D. J. Angiolillo, *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **7**(4), 251 – 259 (2010).
9. M. Garcia, A. Moran, E. Calama, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **145**(5), 593 – 601 (2005).
10. R. Jokl, *Diabetes Metab. Rev.*, **5**, 1 – 15 (1997).
11. E. Koch, *Phytomedicine*, **12**(1 – 2), 10 – 16 (2005).
12. S. Lenzen, *Diabetologia*, **51**, 216 – 226 (2008).
13. M. Moriau, L. Crasborn, E. Lavenne-Pardonge, et al., *Arzneimittelforschung*, **43**(2), 110 – 118 (1993).
14. R. H. Schröer, *Angiology*, **36**(6), 387 – 398 (1985).
15. F. Stockmans, W. Deberdt, A. Nyström, et al., *Thromb. Haemost.*, **79**(1), 222 – 227 (1998).

Поступила 06.04.11

PLATELET HYPERREACTIVITY AND ANTIAGGREGATORY PROPERTIES OF NOOTROPIC DRUGS UNDER CONDITIONS OF ALLOXAN-INDUCED DIABETES IN RATS

V. I. Zhylyuk, A. E. Levykh, and V. I. Mamchur

Dnepropetrovsk State Medical Academy, ul. Dzerzhinskogo 9, 49044 Dnepropetrovsk, Ukraine

*e-mail: pharma@dsm.a.dp.ua

The effects of nootropic drugs (noopept, pentoxifylline, piracetam, pramiracetam, Ginkgo biloba extract, entrop, cerebrocurin and citicoline) on platelet aggregation in rats with experimental diabetes have been studied. It is established that all these drugs exhibit an inhibitory action of various degrees against platelet hyperreactivity under conditions of chronic hyperglycemia. The maximum universality of the antiaggregatory action is characteristic of pramiracetam, entrop and Ginkgo biloba extract.

Key words: Alloxan-induced diabetes, platelet aggregation, nootropic drugs