

АНТИТРОМБОГЕННАЯ И АНТИТРОМБОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ИЗОФЛАВОНОИДНОГО ПРЕПАРАТА ПОСЛЕ ОВАРИОЭКТОМИИ У КРЫС

Анна Марковна ПЛОТНИКОВА¹, Марк Борисович ПЛОТНИКОВ¹, Олег Ибрагимович АЛИЕВ¹, Галина Анатольевна ЧЕРНЫШЕВА¹, Вера Ивановна СМОЛЬЯКОВА¹, Александр Сергеевич ВАСИЛЬЕВ¹, Александр Сергеевич ПРОКОПЬЕВ², Светлана Геннадьевна КОРОЛЬ²

¹НИИ фармакологии СО РАМН
634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

²ЗАО «Эвалар», Бийск
659332, г. Бийск, ул. Социалистическая, 23/6

Исследованы антитромбогенные и антитромбоцитарные свойства фитоэстрогенного препарата на основе экстрактов клевера красного и люцерны посевной, содержащего изофлавоноиды, в условиях модели овариоэктомии. Показано, что комплексный изофлавоноидный препарат при курсовом введении (200 мг/кг внутривенно в течение 14 дней) способен предотвращать внутрисосудистое тромбообразование, инициированное аппликацией на сосуд 10% раствора хлорида железа. Препарат ослабляет агрегацию тромбоцитов, повышает антиагрегантную активность сосудистой стенки и потенцирует эндотелийзависимую вазодилатацию у крыс после овариоэктомии.

Ключевые слова: овариоэктомия, изофлавоноиды, агрегация тромбоцитов, эндотелиальная дисфункция.

У женщин в период постменопаузы часто формируется постменопаузальный метаболический синдром и развивается инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, абдоминальное ожирение и атеросклероз, что приводит к повышению частоты возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Эти изменения связаны со снижением концентрации циркулирующих в крови эстрогенов. Для лечения синдрома дефицита эстрогенов, обусловленного искусственной или естественной менопаузой, применяют гормональную заместительную терапию, однако исследования показали неэффективность этого вида терапии в качестве первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний [2].

В связи с этим альтернативой гормональной заместительной терапии для профилактики осложнений постменопаузального синдрома и, прежде всего, сердечно-сосудистых заболеваний, могут быть средства, содержащие в своем составе фитоэстрогены (изофлавоноиды, лигнаны и др.). Показано, в частности, что изофлавоноиды способны предотвращать повреждение эндотелия сосудистой стенки, инициирующее образование тромбов на поврежденной поверхности [3, 4].

Целью данной работы явилось исследование антитромбогенной и антитромбоцитарной активности комплексного изофлавоноидного препарата в условиях модели эстрогенной недостаточности.

Материал и методы

Опыты проводили на 55 крысах-самках Вистар массой 250–280 г. Животные находились в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде и пище. Контрольные и опытные животные находились в аналогичных условиях и имели одинаковую исходную среднюю массу, контролируемую ежедневным взвешиванием для коррекции вводимой дозы экстрактов. Эвтаназию производили, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Министерством Здравоохранения России, путем дислокации шейного отдела позвоночника под эфирным наркозом.

Исследование антитромбогенной, антитромбоцитарной активности и эндотелийпротекторных свойств комплексного изофлавоноидного препарата проводили на крысах после овариоэктомии. Удаление яичников у животных контрольной и опытной групп осуществляли под эфирным наркозом согласно общепринятой методике [5]. Исследования проводили в 4-х сериях опытов;

Плотникова А.М. — н.с. лаб. фармакологии кровообращения, канд.м.н.

Плотников М.Б. — зав. лаб. фармакологии кровообращения, проф.

Алиев О.И. — в.н.с. лаб. фармакологии кровообращения, д.м.н.

Чернышева Г.А. — в.н.с. лаб. фармакологии кровообращения, д.м.н.

Смолякова В.И. — н.с. лаб. фармакологии кровообращения, канд.б.н.

Васильев А.С. — н.с. лаб. фармакологии кровообращения, канд.б.н.

Прокопьев А.С. — директор по стратегическому развитию

Король С.Г. — начальник отдела перспективных разработок

животные каждой серии опытов были разделены на 3 группы: ложнооперированную, контрольную и опытную. Крысы опытной группы получали комплексный изофлавоноидный препарат ежедневно внутривенно в дозе 200 мг/кг (100 мг/кг экстракта клевера красного и 100 мг/кг экстракта люцерны посевной) в течение 2-х недель, начиная с 8-х суток после моделирования овариоэктомии. Экстракт клевера красного содержал 2,1% дайдзеина, 1,8% генистеина, 1,7% бийоханина, 4,3% формонетина и 1,1% ононина (итого 11,0% изофлавоноидов); экстракт люцерны — 0,2% дайдзеина, 1,4% генистеина, 0,7% бийоханина, 0,9% формонетина 1,7% ононина (итого 4,9% изофлавоноидов). Комплексный изофлавоноидный препарат получали смешиванием отдельных экстрактов в соотношении 1:1 по массе, затем добавляли 1% крахмальную слизь и размешивали до получения однородной суспензии для внутривенного введения. Контрольные животные получали эквивалентное количество 1% крахмальной слизи по той же схеме.

В первой серии опытов исследовали антитромбогенную активность комплексного изофлавоноидного препарата. Для этого через 1 ч после последнего введения препарата животных наркотизировали (уретан 1 г/кг внутривенно), выделяли левую общую сонную артерию и воспроизвели модель внутрисосудистого тромбоза путем аппликации 10% раствора FeCl_2 на сосуд [6]. На отпрепарованную сонную артерию накладывали манжеточный датчик и регистрировали величину кровотока по сосуду с помощью электромагнитного расходомера крови MFV-1100 (Nihon Kohden, Япония). Измерение кровотока проводили непрерывно: до наложения FeCl_2 , во время 15-минутной аппликации FeCl_2 и в течение 90 мин после отмывки сосуда; отмечали время полной остановки кровотока в стенозированной сосуде и уровень снижения кровотока в течение эксперимента. Через сутки проводили эвтаназию животных и изъятие участка сосуда, на который накладывали FeCl_2 . Сосуд вскрывали, тромб выделяли и взвешивали.

Во второй серии опытов исследовали антитромбоцитарный эффект комплексного изофлавоноидного препарата. Агрегацию тромбоцитов определяли нефелометрическим методом по Born [7] в стандартизованной богатой тромбоцитами плазме (БТП) после добавления АДФ в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М. Стандартизованную БТП получали разведением исходной БТП необходимым количеством бедной тромбоцитами плазмы до концентрации 400 ± 30 тыс.

тромбоцитов в 1 мм^3 в пробе. Агрегатограммы регистрировали с помощью прибора АТ-02 (Россия) и самописца Recorder 2210 (Швеция).

В третьей серии опытов исследовали влияние комплексного изофлавоноидного препарата на антитромбоцитарную активность сосудистой стенки по методу В.П. Балуды и И.И. Деянова [8]. У животных под эфирным наркозом проводили забор сегмента брюшной аорты (масса сегмента $3,0 \pm 0,7$ мг). Сосуд отмывали от крови и в течение 3 мин инкубировали в стандартизированной БТП, полученной от крыс-доноров, затем сосуд удаляли и регистрировали амплитуду агрегации тромбоцитов при добавлении к плазме АДФ в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М.

В четвертой серии опытов изучали вазодилатационную активность эндотелия. Под наркозом (тиопентал-натрий, 50 мг/кг) у животных контрольной и опытной групп катетеризовали сонную артерию для регистрации артериального давления после болюсного внутривенного введения веществ, вызывающих эндотелийзависимую (ацетилхолин, 5 мкг/кг) и эндотелийнезависимую (натрия нитропруссид, 30 мкг/кг) вазодилатацию. Коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) оценивали как отношение площади над кривой снижения артериального давления при введении натрия нитропрussaда к величине этого показателя при введении ацетилхолина.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы «Statistica 6.0». Рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку, для выявления межгрупповых различий использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У животных контрольной группы после воздействия на сосудистую стенку FeCl_2 происходила полная остановка кровотока в сонной артерии в среднем через 60 ± 1 мин. В стенозированных сосудах формировались тромбы, и через сутки после окклюзии средняя масса тромба составляла $0,50 \pm 0,07$ мг (табл. 1).

Курсовое внутривенное введение животным комплексного изофлавоноидного препарата предотвращало снижение кровотока после аппликации FeCl_2 и полностью препятствовало тромбообразованию в сонной артерии (табл. 1), что свидетельствует о выраженной антитромбогенной активности исследуемого препарата.

Для изучения механизмов антитромбогенного действия комплексного изофлавоноидного препарата были проведены эксперименты по оценке его антитромбоцитарных

Таблица 1

Влияние курсового внутрижелудочного введения комплексного изофлавоноидного препарата на показатели внутрисосудистого тромбообразования ($M \pm t$)

Группы животных	Кровоток по сонной артерии, мл/мин		Масса тромба через сутки, мг
	Исходный кровоток	через 90 мин	
Контроль (n = 5)	$4,9 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,1^*$	$0,50 \pm 0,07$
Комплексный изофлавоноидный препарат (n = 5)	$5,2 \pm 0,9$	$4,6 \pm 0,6^{**}$	0

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с исходными значениями; ** — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

Таблица 2

Влияние комплексного изофлавоноидного препарата на АДФ-индуцированную (4×10^{-5} М) амплитуду агрегации тромбоцитов после инкубации сегмента брюшной аорты в стандартизированной БТП (%) и на коэффициент эндотелиальной дисфункции (отн. ед.) ($M \pm t$)

Группа		Амплитуда агрегации тромбоцитов		Коэффициент эндотелиальной дисфункции
		До инкубации	После инкубации	
Ложнооперированные (n = 5)		41 ± 1	22 ± 1	$2,26 \pm 0,13$
Овариоэктомия	Контроль (n = 5)		$34 \pm 2^*$	$3,12 \pm 0,17^*$
	Комплексный изофлавоноидный препарат (n = 5)		$22 \pm 1^{**}$	$2,50 \pm 0,01^{**}$

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению со значениями в группе ложнооперированных животных; ** — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

свойств, влияния на антитромбоцитарную активность сосудистой стенки и эндотелий-протективного действия.

В группе ложнооперированных животных амплитуда обратимой агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ в конечной концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М, составила $18 \pm 1\%$. В группе овариоэктомированных животных амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов была статистически значимо выше (на 54%), чем у ложнооперированных животных. После введения комплексного изофлавоноидного препарата амплитуда агрегации тромбоцитов достигала уровня, близкого к значению у ложнооперированных крыс (рис.).

Исследования антитромбоцитарной активности сосудистой стенки показали, что амплитуда необратимой агрегации тромбоцитов БТП, индуцированной АДФ в конечной концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М, у крыс-доноров достигла $41 \pm 1\%$ (табл. 2). После инкубации донорской БТП с сегментом брюшной аорты ложнооперированных животных амплитуда агрегации тромбоцитов составила $22 \pm 1\%$ (табл. 2), что было в 2 раза ниже этого показателя у ложнооперированных крыс. После инкубации БТП с сегментом брюшной аорты крыс контрольной группы амплитуда агрегации тромбоцитов повышалась на 54%, что свидетельствует о существенном снижении антитромбоцитарной активности

брюшной аорты у крыс после овариоэктомии (табл. 2). Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов после инкубации сегмента брюшной аорты овариоэктомированных крыс, получавших комплексный изофлавоноидный препарат, достигала нормальных значений (табл. 2), что отражает способность препарата повышать антитромбоцитарную активность эндотелия аорты у крыс после овариоэктомии.

У животных контрольной группы выявлена дисфункция эндотелия: КЭД был на 22% выше, чем у ложнооперированных крыс (табл. 2).

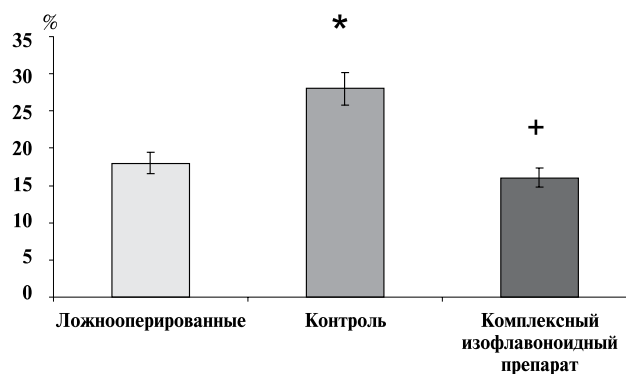


Рис. Влияние комплексного изофлавоноидного препарата на амплитуду АДФ-индуцированной ($4 \cdot 10^{-6}$ М) агрегацию тромбоцитов. * — $p < 0,05$ по сравнению со значениями в группе ложнооперированных животных; + — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Эти результаты подтверждают полученные данные о том, что эстрогенная недостаточность, вызванная овариоэктомией, способствует развитию эндотелиальной дисфункции [9, 10]. КЭД в группе животных, получавших комплексный изофлавоноидный препарат, снижался на 20% по сравнению со значением у контрольной группы, что свидетельствует об устранении препаратом дисфункции эндотелия, поскольку величина этого показателя практически достигала соответствующих значений у ложнооперированных крыс.

Заключение

Комплексный изофлавоноидный препарат обладает выраженным влиянием на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз. Наши исследования продемонстрировали наличие у препарата выраженной антитромбогенной активности у крыс после овариоэктомии, что может быть обусловлено, как антитромбоцитарными, так и эндотелиипротекторными свойствами.

Литература

1. Вихляева Е.М. Руководство по гинекологической эндокринологии. М., 1997. 232 с.
2. Vikhliayeva E.M. Handbook on Gynecological Endocrinology. M. 1977. 232 p.
3. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risk and benefit of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial // JAMA. 2002. 288. (3). 321–333.
4. Brandt M. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases // Calcif. Tissue Int. 1997. 61. (Suppl. 1). 56–85.
5. Potter S. Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy // Nutr. Rev. 1998. 56. (8). 231–235.
6. Киришенблат Я.Д. Общая эндокринология. М., 1965. 316 с.
7. Kirshenblat Ya.D. General Endocrinology. M., 1965. 316 p.
8. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. Антиоксидантная биотерапия для защиты сосудистой стенки производными супероксиддисмутазы и каталазы // Цитология. 1999. 41. (9). 81–82.
9. Maksimenko A.V., Tischenko E.G. Antioxidant biotherapy for protection of blood vessel with superoxide dismutase and catalase derivatives // Cytology. 1999. 41. (9). 81–82.
10. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // Nature. 1962. 194. (4832). 927–929.
11. Балуда В.П., Деянов И.И. Значение определения антитромбогенных свойств стенки сосудов в профилактике тромбозов // Кардиология. 1988. 28. (5). 103–105.
12. Baluda V.P., Deianov I.I. Significance of determining the antithrombotic properties of the vascular wall in the prevention of thromboses // Kardiologiya. 1988. 28. (5). 103–105.
13. Попков С.А., Гуревич К.Г., Булгаков Р.В., Шимановский Н.Л. Нарушение антитромбогенной активности стенок сосудов и их фармакологическая коррекция при климактерическом синдроме // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2004. 2. (2). 21–24.
14. Popkov S.A., Gurevich K.G., Bulgakov R.V., Shimanovsky N.L. Impaired antithrombotic activity of the vascular walls and their pharmacological correction in the menopausal syndrome // Vopr. biol., med. i farmatsevt. khimii. 2004. 2. (2). 21–24.
15. Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L. et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women // Hypertension. 1996. 28. (4). 576–582.

ANTITHROMBOGENIC AND ANTIPLATELET ACTIVITIES OF THE COMPLEX ISOFLAVONOID MEDICINE

Anna Markovna PLOTNIKOVA¹, Mark Borisovich PLOTNIKOV¹, Oleg Ibragimovich ALIEV¹, Galina Anatol'evna CHERNYSHEVA¹, Vera Ivanovna SMOL'JAKOVA¹, Aleksander Sergeevich VASIL'EV¹, Aleksander Sergeevich PROKOP'EV², Svetlana Gennad'evna KOROL'²

¹Institute of Pharmacology SB RAMS
3, Lenin prospect, Tomsk, 634028

²Closed joint-stock society «Evalar», Biysk
23/6, Sotsialisticheskaya str., Biysk, 659332

Antithrombotic and anti-platelet properties of new drug containing isoflavonoids, complex isoflavonoid medicine were investigated. The course administration complex isoflavonoid medicine (200 mg/kg intragastrically for 14 days) prevented the formation of intravascular thrombosis which initiated by application of 10% FeCl₂ solution on carotid artery. In rats after ovariectomy the course administration of complex isoflavonoid medicine increased the antiplatelet activity of the vascular wall (abdominal aorta) and potentiated the endothelium-mediated vasodilatation.

Keywords: ovariectomy, isoflavonoids, platelet aggregation, endothelium dysfunction.

Plotnikova A.M. — Scientist of Head of Laboratory of Circulatory Pharmacology, Ph.D.
Plotnikov M.B. — Head of Laboratory of Circulatory Pharmacology, D.Sci., Professor, e-mail: mbp2001@mail.ru
Aliev O.I. — Senior Scientist of Laboratory of Circulatory Pharmacology, D.Sci.
Chernysheva G.A. — Senior Scientist of Laboratory of Circulatory Pharmacology, D.Sci.
Smol'jakova V.I. — Scientist of Head of Laboratory of Circulatory Pharmacology, Ph.D.
Vasil'ev A.S. — Scientist of Head of Laboratory of Circulatory Pharmacology, Ph.D.
Prokop'ev A.S. — Director on Strategic Development
Korol' S.G. — Head of R&D, Closed joint