

В.Й. Мамчур, В.І. Жилюк, А.Е. Лівих

ВПЛИВ ПІРАЦЕТАМУ ТА ПРАМІРАЦЕТАМУ НА АГРЕГАЦІЙНУ АКТИВНІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ ЗА УМОВ АЛОКСАНОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ

Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) є найбільш розповсюдженим ендокринним захворюванням. Незважаючи на значні успіхи у вивченні даної проблеми за останні 20 років, поширення цього захворювання у світі невинно продовжує збільшуватися. За даними експертів ВООЗ, до 2010 р. на нашій планеті буде налічуватися понад 230 млн., а до 2025 р. — 300 млн. хворих на ЦД, з яких близько 90% складатимуть пацієнти з ЦД 2-го типу [1]. Вартий уваги і той факт, що з усіх хвороб саме ЦД зумовлює найбільш ранню інвалідизацію. Підступність ЦД 2-го типу в тому, що він розвивається непомітно і, навіть у країнах із розвинутою системою медичної допомоги, у багатьох хворих діагноз встановлюється вже на стадії розвитку мікро- та макросудинних діабетичних ускладнень [2]. Зокрема, половина випадків встановлення діагнозу ЦД 2-го типу припадає на 5-7-й рік від початку захворювання. Тривалість життя хворих на цю патологію зменшено на 5-10 років. У 20-30% пацієнтів на момент встановлення діагнозу ЦД вже присутні такі ускладнення, як ретинопатія, нефропатія, нейропатія та ангіопатії різної локалізації. У хворих на ЦД у 2-3 рази частіше розвивається інфаркт міокарда та порушення мозкового кровообігу, у 10 разів частіше трапляється сліпота, у 20 разів — гангрена та ампутація нижніх кінцівок [1].

ЦД належить до однієї з основних причин розвитку гострої та хронічної цереброваскулярної недостатності, що виникає внаслідок поєднання чинників ішемічно-гіпоксичного ураження мозку та метаболічних розладів, які чинять виражений негативний вплив на судинне мікроциркуляторне русло. Він є причиною інсультів, когнітивного дефіциту та деменції у даної категорії хворих. Механізми формування мікроциркуляторної патології різноманітні і включають, зокрема, порушення функції тромбоцитів, ендотеліальну дисфункцію, активацію прокоагулянтної системи крові [3]. Внаслідок цього нормальний баланс системи гемостазу зсувається у зону ризику тромбоутворення.

Підвищення здатності тромбоцитів до агрегації та адгезії у пацієнтів із ЦД виникає внаслідок [4]:

- змін проникності мембрани;
- змін Ca^{2+} і Mg^{2+} гомеостазу (підвищення мобілізації внутрішньоклітинного Ca^{2+} та зниження внутрішньоклітинної концентрації Mg^{2+});
- прискорення метаболізму арахідонової кислоти;
- підвищення синтезу TXA_2 ;
- зниження продукції простагліцину;
- зниження рівня антиоксидантів;
- зниження продукції NO;
- підвищення експресії молекул адгезії.

Отже, діабетичні розлади запускають природні механізми активації тромбоцитів і знижують рівні ендогенних інгібіторів активності тромбоцитів.

Вклад гіперреактивності тромбоцитів у розвиток і прогресування судинних ускладнень за ЦД підтверджено результатами низки досліджень [5–7].

У зв'язку з цим досить обґрунтованим є проведення антиагрегантної терапії у хворих на ЦД, спрямованої на попередження розвитку мікро- та макроангіопатій.

Проте відомо, що за ЦД спостерігається підвищення реактивності тромбоцитів і зниження їх чутливості до таких антиагрегантів, як ацетилсаліцилова кислота та клопідогрель. Внаслідок цього зростає ризик тромботичних ускладнень навіть за використання подвійної антиагрегантної терапії. У зв'язку з цим також вивчаються і перспективи використання з цією метою інших антитромбоцитарних препаратів [8, 9].

Відомо, що одним із заходів, спрямованих на усунення або ослаблення когнітивного дефіциту, у тому числі й у лікуванні хворих на ЦД, є призначення засобів із церебропротекторними властивостями, зокрема, ноотропів. Це препарати, які покращують кровообіг і стан метаболічних процесів у мозковій тканині. Дію цих засобів спрямовано на процеси ексайтотоксичності, лактатацидозу, оксидативного стресу, нормалізацію роботи іонних ка-

налів (кальцієвих, натрієвих), стимуляцію репаративних і регенеративних процесів, відновлення дефіциту нейромедіаторів [10].

Натомість сьогодні достеменно не відомо, який вплив можуть справляти препарати даної групи на систему гемостазу і, зокрема, на здатність тромбоцитів до агрегації за умов ЦД.

Метою роботи було дослідження впливу ноотропних засобів, а саме пірацетаму та прамірацетаму, на здатність тромбоцитів до агрегації за умов алоксанового діабету у щурів.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на 29 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 250-300 г, які утримувались у стандартних умовах віварію (температура повітря $22 \pm 2^\circ\text{C}$, світлий/темний цикл: 12/12 годин, вільний доступ до води та їжі) і розподілених на 4 групи: I — інтактні щури (пасивний контроль), $n=7$; II — тварини з експериментальним алоксановим цукровим діабетом (активний контроль), $n=8$; III — алоксановий діабет + пірацетам у дозі 500 мг/кг, $n=7$; IV — алоксановий діабет + прамірацетам у дозі 300 мг/кг, $n=7$. Експериментальною моделлю патології підшлункової залози слугував патологічний процес, який розвивається у тварин за умов застосування діабетогенної речовини — алоксану [11]. Після попередньої 24-годинної депривації їжі (зі збереженим доступом до води) тваринам одноразово підшкірно вводили водний розчин алоксану моногідрату (Sigma, США) у дозі 150 мг/кг у вигляді 5% розчину в ацетатному буфері, pH 4,5 [12, 13].

З метою формування повного та стабільного діабету тварин утримували протягом 11 днів на стандартній дієті. Суб'єктивними ознаками розвитку патології слугували полідипсія (спрага), поліурія, втрата маси тіла та астения [14].

Рівень глюкози у крові визначали на 11-у добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для подальших досліджень використовували лише тварин із підвищеним рівнем глюкози (>11 ммоль/л) [12, 13].

Препарати вводили внутрішньошлунково зазначеними дозами 1 раз на добу протягом 20 днів, починаючи з 11-го дня після введення алоксану та встановлення рівня гіперглікемії. Тваринам груп пасивного та активного контролю протягом дослідження у відповідному об'ємі внутрішньошлунково вводили дистильовану воду.

Дослідження здатності тромбоцитів до агрегації проводили за методикою G.V. Born [17] на аналізаторі агрегації тромбоцитів "SOLAR AP 2110",

використовуючи як індуктори агрегації розчини колагену 2 мг/мл (Технологія-стандарт, Росія) і аденозиндифосфату (АДФ) у кінцевих концентраціях 5 і 20 мкмоль/л (Ренам, Росія). Визначали ступінь і швидкість агрегації за 30 сек. Для зіставлення агрегаційної здатності використовували збагачену тромбоцитами плазму, стандартизовану до рівня 250 тис./мкл [18].

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики за допомогою програми статистичного аналізу StatPlus, AnalystSoft, версія 2006 (див. <http://www.analystsoft.com/ru/>) на персональному комп'ютері "Intel Pentium-IV". Математична обробка включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їх похибок ($\pm m$), вірогідність різниці середніх арифметичних (p) за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні [15].

Усі експериментальні процедури здійснювали згідно з "Положенням про використання тварин у біомедичних дослідках" [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів (табл. 1) показав, що моделювання алоксанового діабету у щурів призводить до збільшення агрегаційної здатності тромбоцитів.

Так, наприклад, ступінь і швидкість колаген-індукованої агрегації збільшувалися на 38,5% і 191,5% відповідно порівняно з групою інтактних щурів ($p < 0,05$). Ступінь і швидкість АДФ-індукованої (5 мкмоль/л) агрегації тромбоцитів також підвищувалися на 35,3% і 30,5% відповідно ($p < 0,05$).

Застосування досліджуваних препаратів на тлі цукрового діабету у щурів чинило різну дію на функціональну активність тромбоцитів. Якщо пірацетам (500 мг/кг) практично не справляв впливу на показники індукованої агрегації тромбоцитів, то застосування прамірацетаму (300 мг/кг) приводило до вираженого антиагрегантного ефекту. Так, ступінь і швидкість колаген-індукованої агрегації тромбоцитів у групі прамірацетаму порівняно з активною контрольною групою (експериментальний ЦД) зменшувалися на 73,3% і 75,0% ($p < 0,05$), АДФ-індукованої (5 мкмоль/л) — на 80,7% і 80,4% ($p < 0,05$), АДФ-індукованої (20 мкмоль/л) — на 20,2% і 34,3% відповідно.

Отже, експериментальний ЦД у щурів супроводжується підвищенням агрегаційної здатності тромбоцитів. Ці проагрегантні зміни призводять до зсуву нормального гемостатичного балансу у бік активації процесів тромбоутворення, що може бути додатковим чинником ризику розвитку тромботичних ускладнень.

Показники агрегатограм (максимального ступеня швидкості агрегації) у тварин досліджуваних груп із використанням як індуктори розчинів колагену (2 мг/мл) та АДФ (5 і 20 мкмоль/л)

Група тварин	Максимальний ступінь агрегації, %		
	Колаген	АДФ-5	АДФ-20
Інтактні	53,8 ± 3,04	33,7 ± 2,25	57,6 ± 4,40
Цукровий діабет	74,5 ± 3,03°	45,6 ± 3,45°	58,9 ± 5,55
Пірацетам	72,6 ± 5,41	42,3 ± 4,33	54,7 ± 5,60
Прамірацетам	19,9 ± 4,78*#	8,8 ± 1,44*#	47,1 ± 3,06

Група тварин	Швидкість агрегації, %/хв.		
	Колаген	АДФ-5	АДФ-20
Інтактні	13,0 ± 2,85	43,3 ± 5,22	44,4 ± 4,90
Цукровий діабет	37,9 ± 4,17°	56,5 ± 4,80°	54,8 ± 5,80
Пірацетам	27,5 ± 2,56	55,6 ± 4,66	45,6 ± 4,36
Прамірацетам	9,5 ± 2,00*#	11,1 ± 2,53*#	36,0 ± 0,10

Пригнічення прамірацетамом колаген-індукованої агрегації тромбоцитів може бути свідченням того, що він порушує процеси вивільнення тромбоцитарних гранул відповідно до того, як це було показано у роботі [19] для ацетилсаліцилової кислоти. За цих умов пригнічується виділення з тромбоцитів власних активаторів агрегації (серотоніну, аденозиндифосфату тощо). Вплив прамірацетаму на АДФ-індуковану (5 мкмоль/л) агрегацію тромбоцитів та її відсутність за більшої концентрації індуктора (20 мкмоль/л) може свідчити про те, що прамірацетам є помірним конкурентним антагоністом пуринових P2Y₁₂ рецепторів, які є головними тромбоцитарними рецепторами, що відповідають за АДФ-індуковану агрегацію.

Цей факт є передумовою для подальшого вивчення цього питання у клінічних умовах. Використання прамірацетаму з метою нормалізації когнітивних функцій у пацієнтів із цукровим діабетом може мати додаткові переваги порівняно з пірацетамом.

ВИСНОВКИ

1. Розвиток алоксанового цукрового діабету у щурів призводить до підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів.

2. Застосування прамірацетаму (300 мг/кг, щоденно, внутрішньошлунково, 15 діб), на відміну від пірацетаму (500 мг/кг, щоденно, внутрішньошлунково, 15 діб) щурам з алоксановим ЦД справляє суттєву антиагрегантну дію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аметов А.С. Место Актовегина в лечении и профилактике сахарного диабета 2 типа / А.С. Аметов, Т.Н.

Солюянова // Русский медицинский журнал. — 2007. — Т. 15, № 11. — С. 911-915.

- Geiss L. National Diabetes Data Group. Diabetes in America. Bethesda. National Institutes of Health / L. Geiss, W. Herman, P. Smith. — 1995. — P. 233-257.
- Jokl R. Arterial thrombosis and atherosclerosis in diabetes / R. Jokl, J.A. Colwell // Diabetes Metab. Rev. — 1997. №5. — P. 1-15.
- Дупляков Д.В. Антитромбоцитарная терапия у больных сахарным диабетом / Д.В. Дупляков // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2004, №5. — С. 126-133.
- Carr M.E. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state / M.E. Carr // J. Diabetes Complications. — 2001. — 15. — P. 44-54.
- Colwell J.A. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events / J.A. Colwell, R.W. Nesto // Diabetes Care. — 2003. — № 6. — P. 2181-2188.
- Comparative study of platelet activation markers in diabetes mellitus patients complicated by cerebrovascular disease / Z.Y. Wang, J.M. Shi, Y. Han [et al.] // Blood Coagul. Fibrinolysis. — 2001. P. 531-537.
- Functional effects of high clopidogrel maintenance dosing in patients with inadequate platelet inhibition on standard dose treatment / D.J. Angiolillo, M.A. Costa, S.B. Shoemaker [et al.] // Am. J. Cardiol. — 2008. — V.101, №4. — P. 440-445.
- Angiolillo D.J. Aspirin and clopidogrel: efficacy and resistance in diabetes mellitus / D.J. Angiolillo, S. Suryadevara // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. — 2009. — V.23, №3. — P. 375-388.
- Камчатнов П.П. Хронические расстройства мозгового кровообращения у больных сахарным диабетом 2 типа / П.П. Камчатнов // Здоров'я України. — 2006, №20. — <http://www.health-ua.com/articles/1429.html>.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // Diabetologia. — 2008. — № 51. — С. 216-226.

12. *Dave K.R.* Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat / K.R. Dave, S.S. Katyare // *Journal of Endocrinology*. — 2002. — V. 175, №1. — P. 241-250.
13. *Diabetes-induced changes in the 5-hydroxytryptamine inhibitory receptors involved in the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat* / M. Garcia, A. Moran, E. Calama [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. — 2005. — V.145, №5. — P. 593-601.
14. *Influence of the semisynthetic bile acid (MKC) on the ileal permeation of gliclazide in healthy and diabetic rats* / H. Al-Salami, B. Grant, I. Tucker, M. Mikov // *Pharmacological reports*. — 2008. — V.60, №3. — P. 532-541.
15. *Лапач С.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабиц. — К.: Морисон, 2001. — 408 с.
16. *Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках* // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. — 2003. — №2. — С. 108-109.
17. *Born G.V.R.* Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V.R. Born // *Nature*. — 1962. — № 194. — P. 927-929.
18. *Zhou Lan.* Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma: Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field / Lan Zhou, A.H. Schmaier // *Coagulation and Transfusion Medicine*. — 2005. — №123. — P. 172-183.
19. *The effect of acetylsalicylic acid on platelet function* / G. Evans, M.A. Packham, E.E. Nishizawa [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. — 1968. — V.128, №5. — P. 877-894.

РЕЗЮМЕ

Влияние пирacetамa и прамирацетамa на агрегационную активность тромбоцитов в условиях аллоксанового диабета у крыс
В.И. Мамчур, В.И. Жилюк, А.Э. Левых

Проведено исследование влияния ноотропных средств — пирacetамa и прамирацетамa на агрегационную способность тромбоцитов в условиях аллоксанового диабета. Анализ полученных результатов показал, что моделирование эндокринной патологии поджелудочной железы приводит к увеличению агрегационной способности тромбоцитов. Применение исследуемых препаратов на фоне сахарного диабета оказывало различное действие на функциональную активность тромбоцитов. Если пирacetам практически не влиял на показатели индуцированной агрегации тромбоцитов, то применение прамирацетамa приводило к выраженному антиагрегантному эффекту. Данный факт является предпосылкой для дальнейшего изучения этого вопроса в клинических условиях. Использование прамирацетамa с целью нормализации когнитивных функций у пациентов с сахарным диабетом может иметь дополнительные преимущества по сравнению с пирacetамом.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, агрегация тромбоцитов, пирacetам, прамирацетам.

SUMMARY

Influence of piracetam and pramiracetam on platelets aggregative activity in conditions of alloxan diabetes in rats

V. Mamchur, V. Zhylyuk, A. Levykh

Research of influence of nootropic drugs piracetam and pramiracetam on platelets aggregative ability in conditions of rat alloxan diabetes was carried out. The analysis of received results has shown that modeling of alloxan diabetes in rats leads to platelets' aggregative ability augmentation. Administration of investigated drugs in diabetic rats had different effects on platelets functional activity. Piracetam practically had no influence on induced platelet aggregation indicators, while pramiracetam administration led to expressed antiaggregative effect in diabetic rats. This fact is the prerequisite for the further studying of this question in clinical conditions. Administration of pramiracetam with the purpose of cognitive functions normalization of patients with diabetes can have additional benefits comparing with piracetam.

Key words: alloxan diabetes, platelets aggregation, piracetam, pramiracetam.

Дата надходження до редакції 17.07.2009 р.