

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭСТРАДИОЛА И ТАМОКСИФЕНА

А. И. Матюшин, Н. Л. Шимановский, А. В. Чекалов¹

Исследование влияния эстрадиола и тамоксифена на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* показало, что тамоксифен не влияет на агрегацию тромбоцитов человека. Эстрадиол в концентрации 10^{-6} М ингибировал АДФ-, серотонин+адреналин и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека на 14,7, 12,5 и 16,6 % соответственно. В отличие от эстрадиола (диапазон эффективных концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М), тамоксифен оказывал ингибирующее действие на перекисное окисление липидов только в концентрации 10^{-4} М. Установлена корреляционная связь между антиагрегационной активностью и антиоксидантными свойствами эстрадиола.

Ключевые слова: эстрадиол, тамоксифен, антиоксидантная активность, агрегация тромбоцитов

ВВЕДЕНИЕ

Женские половые гормоны — эстрогены и их антагонисты широко применяются для регуляции беременности и коррекции гиперпластических процессов. Из антиэстрогенных препаратов наибольшее значение в клинической практике находит группа производных трифенилэтиленов, особенно, тамоксифен. Его используют как противоопухолевое средство при раке молочной железы и эндометрия, при гормональном бесплодии, дисфункциональных маточных кровотечениях, андрогенной недостаточности у мужчин. Существуют сведения об использовании тамоксифена при лечении рака мозга и печени [5, 7].

О влиянии женских половых гормонов и их синтетических аналогов на кровь свидетельствует тромбоэмболическое действие, отмечаемое у женщин, принимающих пероральные контрацептивы [1].

В экспериментах на животных показано, что комбинация этинилэстрадиола и левоноргестрела вызывает повышение общей свертывающей активности и агрегационной активности тромбоцитов и реакции высвобождения тромбоцитарных факторов [6]. Отсюда видно, что исследование влияния женских половых гормонов и их антагонистов как известных, так и вновь синтезированных, на свертывающую систему крови и, в частности, на агрегационные свойства тромбоцитов представляет значительный интерес.

С учетом роли процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в агрегации тромбоцитов [9, 10] важное значение для понимания механизмов про- или антиагрегационного действия эстрогенов и антиэстрогенов имеет исследование их антиоксидантных свойств.

Целью работы явилось изучение влияния эстрогена — эстрадиола-17 β и антиэстрогена — тамоксифена на агрегацию тромбоцитов человека и перекисное окисление липидов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование влияния эстрогена — эстрадиола (17 β -эстрадиола) (“Sigma”) и антиэстрогена — тамоксифена (“Sigma”) на ПОЛ проводили на модели Fe²⁺-индуцированной хемилуминесценции желточных липопротеидов. Антиоксидантную активность исследуемых веществ оценивали по величине латентного периода, амплитуде быстрой и медленной вспышек хемилуминесценции [3].

Антиагрегационную активность соединений оценивали по методу Борна [2]. Для оценки влияния стероидных соединений на индуцированное изменение светопропускания в ходе агрегации тромбоцитов человека использовали параметры агрегации: 1) максимальную амплитуду — процентное увеличение светопропускания после добавления индуктора; 2) время между иницированием агрегации и достижением максимума светопропускания.

Исследовалось влияние указанных соединений на АДФ-, адреналин-, адреналин + серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Pharmacological Basic Statistics. Расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Для определения наличия взаимосвязи между антиоксидантными свойствами соединений и их ингибирующим влиянием на агрегацию тромбоцитов человека вычисляли коэффициент корреляции. Программа обработки и анализа кривых агрегации тромбоцитов человека была написана на языке высокого уровня Visual Basic for Application, встроенного языка программирования Excel 97/2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было изучено влияние эстрадиола и тамоксифена на АДФ-, адреналин-, адреналин + серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека.

¹ Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии (зав. — акад. РАМН П. В. Сергеев) медико-биологического факультета РГМУ, Москва, 119437, ул. Островитянова, 1.

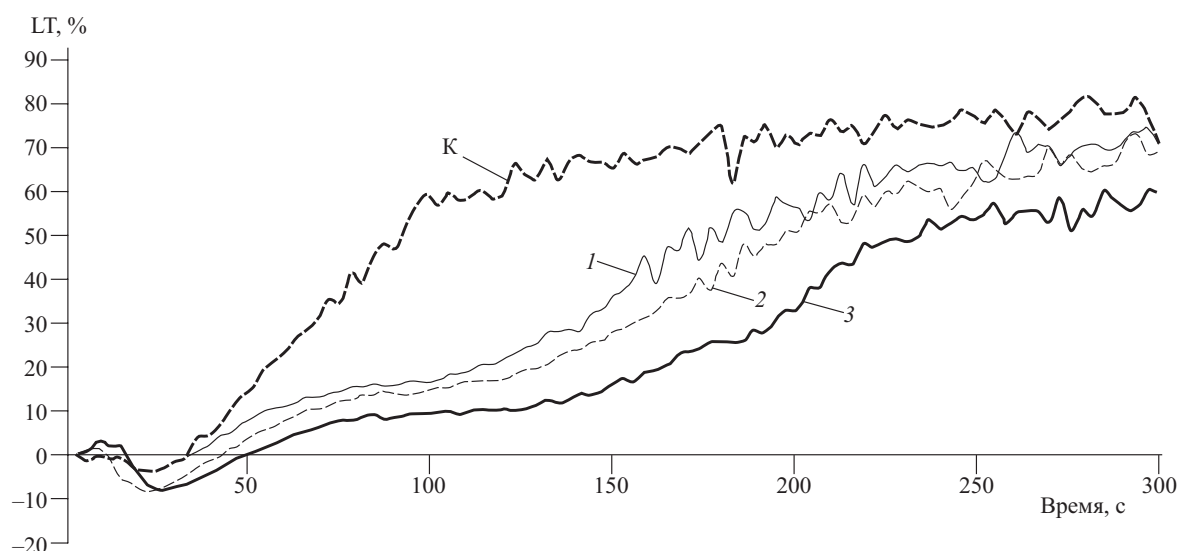


Рис. 1. Влияние эстрадиола на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную комбинацией серотонин + адреналин.

По оси абсцисс — время, с; по оси ординат — изменение светопропускания (LT), %. 1 — эстрадиол в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М; 2 — эстрадиол в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М; 3 — эстрадиол в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М; К — контроль. Условия: концентрация адреналина — $5 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация серотонина — $5 \cdot 10^{-6}$ М. Скорость перемешивания — 800 об/мин, температура 37 °С.

Оценку влияния женских половых гормонов и их антагонистов на агрегацию тромбоцитов человека проводили по следующим показателям: значение максимума светопропускания (LT_{\max}) и время максимума светопропускания ($LT_{t, \max}$). Кроме того, был введен новый параметр — время достижения 30 % светопропускания ($LT_{t, 30}$). Этот параметр позволяет количественно охарактеризовать процесс развития агрегации тромбоцитов на его промежуточных этапах. Увеличение значения этого параметра в ходе наблюдения свидетельствует о замедлении скорости развития агрегационного ответа тромбоцитов, а уменьшение — об его ускорении.

Исследование влияния тамоксифена на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека показало,

что препарат в концентрации 10^{-6} – 10^{-8} М не оказывал достоверного влияния на параметры кривой АДФ-индуцированной агрегации. Эстрадиол стабильно ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека только в концентрации 10^{-6} М, о чем свидетельствует снижение под его влиянием максимума светопропускания (LT_{\max}) на 14,7 % по сравнению с контролем.

В дальнейшем нами исследовалось влияние указанных женских половых гормонов и их антагонистов на адреналин + серотонин и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека. Тамоксифен, в концентрации 10^{-6} – 10^{-8} М не оказывал влияния на параметры кривой адреналин + серотонин и адреналин-индуцированной агрегации. Эстрадиол в концентрации 10^{-7} – 10^{-8} М также не оказывал влияния на параметры кривой (LT_{\max} , $LT_{t, \max}$) адреналин + серотонин-индуцированной агрегации (рис. 1). В концентрации 10^{-6} М эстрадиол снижает максимум светопропускания (LT_{\max}) на 12,5 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

17 β -эстрадиол ингибировал адреналин-индуцированную агрегацию (табл. 1). В концентрации 10^{-6} М 17 β -эстрадиол снижал значение максимума агрегации (LT_{\max}) на 16,6 % и увеличивал значение времени ($LT_{t, 30}$) (на 66,2 %), что говорит об антиагрегационных свойствах эстрадиола.

Полученные результаты свидетельствуют о способности эстрадиола в высокой концентрации в экспериментах *in vitro* оказывать защитное антиагрегационное действие в отношении широкого спектра индукторов агрегации: АДФ, адреналина и серотонина.

Как известно, адреналин индуцирует процесс агрегации за счет влияния на α_2 -адренорецепторы тромбо-

Таблица 1. Влияние эстрадиола и тамоксифена на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную адреналином ($M \pm m$)

Показатель	LT_{\max} , %	$LT_{t, \max}$, с	$LT_{t, 30}$, с
Контроль	$75,29 \pm 1,94$	$284,63 \pm 5,79$	$124,13 \pm 7,92$
Эстрадиол, 10^{-6}	$62,78 \pm 3,18^{**}$	$286,67 \pm 3,18$	$206,33 \pm 14,09^{**}$
10^{-7}	$71,12 \pm 3,43$	$283,00 \pm 14,09$	$163,00 \pm 9,60^{**}$
10^{-8}	$67,97 \pm 7,20$	$271,50 \pm 7,17$	$139,50 \pm 4,50^*$
Тамоксифен, 10^{-6}	$71,86 \pm 5,07$	$273,00 \pm 8,50$	$118,07 \pm 13,50$

Примечание. LT_{\max} — значение максимума светопропускания, %, $LT_{t, \max}$ — время наступления LT_{\max} , с, $LT_{t, 30}$ — время наступления 30 % светопропускания, с.

Концентрация эстрадиола и тамоксифена приведена в М; концентрация адреналина — $5 \cdot 10^{-6}$ М; отличия с контролем достоверны: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$. Скорость перемешивания — 800 об/мин, температура 37 °С.

цитов, вызывая при этом угнетение аденилатциклазы и снижение уровня цАМФ с последующим изменением содержания внутриклеточного Ca^{2+} и K^+ [2, 12]. Наблюдаемое нами угнетение процесса адреналин-индуцированной агрегации под влиянием эстрадиола может быть следствием его влияния на вход ионов кальция внутрь клетки и/или изменения активности кальциевых каналов [10]. Известно, что эстрадиол влияет на транспорт кальция в клетках. Так, в микромолярных концентрациях стероид уменьшает ток кальция в изолированных миоцитах на 80 %. Данный негеномный быстрый эффект эстрадиола (именно такой может реализовываться и в наших экспериментах) обратим, не зависит от уровня NO и характеризуется специфичностью; он воспроизводится синтетическим эстрогеном диэтилстильбэстролом, но не тестостероном или прогестероном [8].

Ранее нами и другими авторами на различных моделях было отмечено наличие у эстрадиола выраженной антиоксидантной активности [4]. В данной работе на модели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции желточных липопротеидов показано, что ингибирующее действие эстрадиола на ПОЛ начинает достоверно проявляться в концентрации 10^{-8} М (табл. 2). Наблюдалось уменьшение скорости нарастания медленной вспышки, снижение амплитуды медленной вспышки и увеличение латентного периода, что говорит о выраженных антиоксидантных свойствах этого соединения. Ингибирующий эффект 17β -эстрадиола определялся во всем исследованном диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-8} М. В концентрации 10^{-4} М эстрадиол ингибирует развитие медленной вспышки на 100 %.

В отличие от 17β -эстрадиола его антагонист тамоксифен в концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} М не влиял на параметры кривой Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции (табл. 3). В концентрации 10^{-4} М тамоксифен уменьшал амплитуду (параметр H) на 7,35 % и скорость нарастания медленной вспышки ($tg \alpha$) на 16,9 % хемилюминесценции. Таким образом, тамоксифен

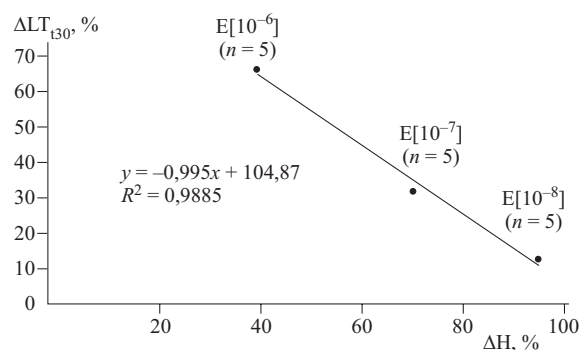


Рис. 2. Корреляционная связь между антиагрегационной активностью эстрадиола и его антиоксидантными свойствами.

По оси абсцисс — ингибирование эстрадиолом амплитуды медленной вспышки кривой Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции желточных липопротеидов по отношению к контролю % (ΔH , %); по оси ординат — увеличение эстрадиолом параметра LT_{30} кривой адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов человека по отношению к контролю в % (ΔLT_{30} , %). Обозначения: $E[10^{-6}]$, $E[10^{-7}]$, $E[10^{-8}]$ — эстрадиол в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М, $1 \cdot 10^{-7}$ М, $1 \cdot 10^{-8}$ М соответственно, n — число экспериментов. $y = -0,995x + 104,87$ — уравнение линейной регрессии вида $y = ax + b$, где $y = \Delta LT_{30}$, $x = \Delta H$, $a = -0,995$ — коэффициент регрессии у по x , $b = 104,87$. R^2 — величина достоверности аппроксимации.

проявляет слабые антиоксидантные свойства только в высокой концентрации (10^{-4} М).

Учитывая важную роль процессов ПОЛ в развитии агрегации тромбоцитов можно высказать предположение, что одним из механизмов антиагрегационного действия эстрадиола может быть его ингибирующее действие на процессы ПОЛ.

Для проверки данного предположения нами посчитан коэффициент корреляции между антиоксидантными свойствами эстрадиола и его антиагрегационной активностью. Коэффициент корреляции между ΔH (ингибирование эстрадиолом амплитуды медленной вспышки кривой Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции желточных липопротеидов по отношению к контролю в %) и ΔLT_{30} (увеличение эстрадиолом па-

Таблица 2. Влияние эстрадиола на параметры кривой Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции ($M \pm m$)

Показатель	h	H	τ	$tg \alpha$
Контроль	$93,7 \pm 1,65$	$101,3 \pm 8,83$	$7,3 \pm 0,33$	$1,59 \pm 0,05$
10^{-4}	$90,4 \pm 7,43$		ингибирование на 100%	
Контроль	$97,4 \pm 4,75$	$112,4 \pm 0,51$	$8,6 \pm 0,51$	$1,19 \pm 0,01$
10^{-5}	$8,04 \pm 1,67$	$12,05 \pm 1,23^{**}$	$25,6 \pm 0,4^{**}$	$0,16 \pm 0,04^{**}$
Контроль	$99,8 \pm 1,39$	$104,2 \pm 3,36$	$9,1 \pm 0,32$	$1,48 \pm 0,03$
10^{-6}	$97,2 \pm 3,36$	$42,04 \pm 1,67^{**}$	$17,2 \pm 4,9^{**}$	$0,47 \pm 0,03^{**}$
Контроль	$102,56 \pm 1,75$	$118,4 \pm 1,89$	$7,4 \pm 0,24$	$1,27 \pm 0,07$
10^{-7}	$87,0 \pm 1,0^{**}$	$83,5 \pm 3,5^{**}$	$12,0 \pm 0,5^{**}$	$0,83 \pm 0,03^{**}$
Контроль	$97,00 \pm 5,29$	$103,5 \pm 1,5$	$8,2 \pm 1,01$	$1,21 \pm 0,02$
10^{-8}	$77,67 \pm 3,84^*$	$97,67 \pm 5,4$	$7,67 \pm 0,33$	$1,11 \pm 0,04^*$

Примечание. Здесь и в табл. 3: h — амплитуда быстрой вспышки, мм, H — амплитуда медленной вспышки, мм, τ — значение латентного периода, мм, $tg \alpha$ — тангенс угла наклона медленной вспышки. Концентрация эстрадиола дана в М. Отличия достоверны: * — при $p < 0,05$, ** — при $p < 0,001$.

Таблица 3. Влияние тамоксифена на параметры кривой Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции ($M \pm m$)

Показатель	h	H	τ	tg α
Контроль	63,4 ± 6,48	127,8 ± 6,42	7,4 ± 0,24	2,59 ± 0,07
10 ⁻⁴	75 ± 6,21	118,4 ± 1,89*	7,8 ± 0,37	2,15 ± 0,04**
Контроль	68 ± 1,87	127,6 ± 2,54	7,4 ± 0,24	3,08 ± 0,06
10 ⁻⁵	67,6 ± 1,47	127,6 ± 1,96	8,2 ± 0,37	2,97 ± 0,06
Контроль	94 ± 1,14	132,4 ± 4,35	8,8 ± 0,37	2,55 ± 0,13
10 ⁻⁶	102,6 ± 1,86**	134,8 ± 1,96	8,39 ± 0,4	2,7 ± 0,09

Примечание. Отличия достоверны: * — при $p < 0,01$, ** — при $p < 0,001$.

параметра $\Delta LT_{t,30}$ кривой адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов человека по отношению к контролю в %) составил — 0,91 при $p < 0,05$, что говорит о тесной отрицательной корреляционной связи между данными параметрами (рис. 2). Таким образом, предположение о связи антиоксидантных свойств эстрадиола с его антиагрегационной активностью не лишено основания.

При введении эстрогенов в организм (при заместительной терапии, в составе контрацептивных средств, для лечения опухолей) могут наблюдаться тромбоэмболические осложнения [13], что не противоречит полученным нами *in vitro* данным о прямом антиагрегационном эффекте эстрадиола, так как известно, что в условиях целостного организма эстрадиол может увеличивать образование ряда факторов коагуляционного гемостаза (фибриногена, VII фактора и др.).

ВЫВОДЫ

1. Исследование влияния эстрадиола и тамоксифена на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* показало, что тамоксифен в концентрациях 10^{-6} – 10^{-8} М достоверно не влияет на агрегацию тромбоцитов человека. Эстрадиол в концентрации 10^{-6} ингибировал АДФ-, серотонин+адреналин и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека на 14,7; 12,5 и 16,6 % соответственно.

2. В отличие от эстрадиола (диапазон эффективных концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М), тамоксифен оказывал ингибирующее действие на ПОЛ только в концентрации 10^{-4} М.

3. Установлена корреляционная связь между антиоксидантными свойствами эстрадиола и его антиагрегационной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Балуда, М. В. Балуда, И. И. Деянов, И. К. Глепшуков, *Гематол. и трансфузиол.*, № 10, 25 – 29 (1990).
2. А. Л. Берковский, С. А. Васильев, Л. В. Жердева и др., *Пособие по изучению адгезивно-агрегационной активности тромбоцитов*, Москва (2001).
3. Г. И. Клебанов, О. Б. Любичкий, О. В. Васильева и др., *Вопр. мед. хим.*, **47**, 288 – 300 (2001).
4. А. И. Матюшин, В. М. Гукасов, В. М. Ржезников и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(3), 25 – 27 (2002).
5. П. В. Сергеев, П. А. Галенко-Ярошевский, Н. Л. Шимановский, *Очерки биохимической фармакологии*, РЦ “ФАРМЕДИНФО”, Москва (1996).
6. П. Я. Шаповалов, Э. А. Шабанов, *Научн. вестн. ТМА*, № 2, 93 – 94 (1999).
7. R. Clarke, F. Leonessa, J. Welch, and T. Skaar, *Pharmacology Reviews*, **53**, 25 – 71 (2001).
8. M. Kelly and E. Levin, *Trends in endocrinology and metabolism*, **12**(4), 152 – 156 (2001).
9. R. Leo, D. Pratico, F. Pulcinelli, et al., *Circulation*, **95**, 787 – 789 (1997).
10. Y. Nakano, T. Oshima, H. Matsuura, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc.*, **18**(6), 961 – 967 (1998).
11. D. Pratico, M. Pasin, O. Barry, et al., *Circulation*, **99**, 3118 – 3124 (1999).
12. G. Rao, *Indian J. Physiol Pharmacol.*, **37**, 263 – 275 (1993).
13. A. Thijs, W. van Baal, M. van der Mooren, et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, **32**(8), 613 – 618 (2002).

Поступила 22.10.03

ANTIAGGREGANT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESTRADIOL AND TAMOXIFEN

A. I. Matyushin, N. L. Shimanovskii, and A. V. Chekalov

Molecular Pharmacology and Radiobiology Department, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117437 Russia

Tamoxifen did not influence the human platelet aggregation *in vitro*, while estradiol at a concentration of 10^{-6} M inhibited the aggregation of human thrombocytes induced by ADP, serotonin + adrenaline, and adrenaline (epinephrine) by 14.7, 12.5, and 16.6%, respectively. Estradiol introduced in the range of effective concentrations from 10^{-8} to 10^{-4} M inhibited lipid peroxidation, while tamoxifen produced this effect only at a concentration of 10^{-4} M. There was a correlation between the antiaggregant activity and antioxidant properties of estradiol.