

УДК 615.017:615.22:6167-08-035



АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА, ИМЕЮЩЕГО В СВОЕЙ СТРУКТУРЕ ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЙ ФЕНОЛЬНЫЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬ

Спасов А.А.¹, Кучерявенко А.Ф.¹, Гайдукова К.А.¹, Черников М.В.², Жуковская О.Н.³

¹ Волгоградский государственный медицинский университет
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

² Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России
357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

³ НИИ физической и органической химии Южного федерального университета
344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2

E-mail: aspasov@mail.ru

Получено 10.02.2020

Рецензия (1) 10.04.2020

Рецензия (2) 20.04.2020

Принята к печати 28.04.2020

Цель – изучение антитромбогенных свойств соединения РУ-1144 с ранее выявленной выраженной антиагрегантной и антиоксидантной активностью, на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (III), в сравнении с известными антиагрегантными препаратами – ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, а также антиоксидантным препаратом – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

Материалы и методы. Антитромботическая активность соединения РУ-1144 была изучена на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, вызванного аппликацией 50% хлорида железа (III) и модели Global Thrombosis Test (по Горогу). Оценку данного вида активности производили по удлинению времени образования тромба. Исследования влияния соединения РУ-1144 на параметр времени кровотечения проводили на мышах. В качестве препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту, клопидогрел и ЭМГПС.

Результаты. Выявленное на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа (III), антитромботическое действие субстанции РУ-1144, превосходило таковое как у ацетилсалициловой кислоты, так и у клопидогрела в 3,5 раза, и в 2,9 раза – у ЭМГПС. На модели Global Thrombosis Test (тест Горога) *in vitro* соединение РУ-1144 снижало тромбогенный потенциал крови в равной степени с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом. При оценивании «времени кровотечения» вещество РУ-1144 пролонгировало кровотечение в среднем в 2 раза менее выражено чем АСК и клопидогрел.

Заключение. Проведенные исследования продемонстрировали у соединения РУ-1144 выраженную антитромботическую активность, превышающую таковую у ацетилсалициловой кислоты, клопидогрела и ЭМГПС, при этом способность удлинять время кровотечения была достоверно ниже, чем у препаратов сравнения.

Ключевые слова: антитромботическая активность, тромбоз, бензимидазол, АСК, клопидогрел, этилметилгидроксипиридина сукцинат, тромбоз по Горогу, время кровотечения

Сокращения: ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат; АСК – ацетилсалициловая кислота.

ANTITROMBOTIC ACTIVITY OF A NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE WITH A SPATIALLY DIFFICULT PHENOLIC SUBSTITUTE IN ITS STRUCTURE

Spasov A.A.¹, Kucheryavenko A.F.¹, Gaidukova K.A.¹, Chernikov M.V.², Zhukovskaya O.N.³

¹ Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Square, Volgograd, Russia 400131

² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State
Medical University, 11, Kalinin av., Pyatigorsk, Russia 357532

³ Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University
194, Bldg 2, Stachki Av., Rostov-on-Don, Russia 344090

E-mail: aspasov@mail.ru

Received 10 February 2020

Review (1) 10 April 2020

Review (2) 20 April 2020

Accepted 28 April 2020

Для цитирования: Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., Черников М.В., Жуковская О.Н. Анти тромботическая активность нового производного бензимидазола, имеющего в своей структуре пространственно затрудненный фенольный заместитель. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2):78-85. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-78-85

© Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., Черников М.В., Жуковская О.Н., 2020

For citation: Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gaidukova K.A., Chernikov M.V., Zhukovskaya O.N. Antitrombotic activity of a new benzimidazole derivative with a spatially difficult phenolic substitute in its structure. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):78-85. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-78-85

The aim of the study was to investigate antithrombotic properties of compound RU-1144 with previously identified pronounced antiplatelet and antioxidant activities. The thrombosis induced by *Ferric chloride* (FeCl_3) was carried out in rats' carotid artery, in comparison with the known antiaggregant drugs – acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel, as well as with the antioxidant preparation – ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS).

Materials and methods. The antithrombotic activity of compound RU-1144 was studied on the model of the rats with carotid artery thrombosis, induced by the application of 50% *ferric chloride* (FeCl_3), and the Global Thrombosis Test model (the *Görög Thrombosis Test*). The evaluation of this type of activity was carried out by prolonging the time of a blood clot formation. The studies of the compound RU-1144 effect on the bleeding time parameter were performed in mice. Acetylsalicylic acid, clopidogrel and EMHPS were used as reference drugs.

Results. The antithrombotic effect of the RU-1144 substance revealed in the model of arterial thrombosis induced by the application of *ferric chloride* (FeCl_3), exceeded that of both acetylsalicylic acid and clopidogrel by 3.5 times and that of EMHPS by 2.9 times. In the model of the *in vitro* Global Thrombosis Test (the *Görög Thrombosis Test*), compound RU-1144 reduced the thrombotic potential of the blood equally with acetylsalicylic acid and clopidogrel. The assessment of “the bleeding time”, caused by the RU-1144 substance, showed that the prolongation of bleeding was twice as less pronounced than that caused by ASA and clopidogrel.

Conclusion. The performed studies demonstrated a pronounced antithrombotic activity of compound RU-1144, which exceeded that of acetylsalicylic acid, clopidogrel and EMHPS, while the ability to prolong the bleeding time was reliably lower than that of reference drugs.

Keywords: antithrombotic activity, thrombosis, benzimidazole, ASA, clopidogrel, ethylmethylhydroxypyridine succinate, the *Görög Thrombosis Test*, bleeding time

Abbreviations: EMHPS – ethylmethylhydroxypyridine succinate; ASA – acetylsalicylic acid.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания на данный момент являются ведущей причиной глобальной инвалидизации и смертности во всем мире [1–3]. По данным Всемирной организации здравоохранения к 2030 году будет зарегистрировано более 20 миллионов смертей в год от заболеваний, связанных с повышением тромботического потенциала крови. Среди них - ишемическая болезнь сердца, инсульт, нарушение периферического кровообращения, осложнения сахарного диабета и др., поэтому антиагрегантная терапия является важной составляющей в различных областях клинической практики [4].

Известно, что атеросклеротическая бляшка приводит к неравномерному сужению участка сосуда и, в результате этого, при прохождении потока крови через это место возникают турбулентные ускорения, влияющие в свою очередь на форменные элементы крови, прежде всего эритроциты и тромбоциты, повышая их агрегационную способность. Помимо форменных элементов, воздействию подвергается стенка сосуда, что выражается в повреждении эндотелия, возникновении возможности контакта коллагеновых волокон с тромбоцитами с последующей их адгезией на поврежденной поверхности, активацией, агрегацией и образованием тромба [5].

Таким образом, активация тромбоцитарного звена гемостаза может стать причиной осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, а именно возникновения артериальных тромбозов [1]. Кроме того, важная роль в патогенезе тромбообразования отводится активации процессов перекисного окисления липидов, усиление которой приводит к повышению процессов агрегации тромбоцитов и коагуляционного звена гемостаза [6, 10]. Данная концепция является теоретическим обоснованием использования антиоксидантных средств, в качестве допол-

нительной патогенетической терапии артериальных тромбозов. Таким образом, проведение своевременных и правильных профилактических мероприятий, направленных на ингибирование процессов агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов, может предотвращать преждевременную смерть, увеличивать продолжительность жизни, улучшать ее качество, а также снижать экономические затраты общества на лечение и реабилитацию [7–9].

В ходе ранее проведенных исследований, среди гетероциклических соединений были выявлены вещества, проявляющие антиагрегантные и антиоксидантные свойства [11–13]. Соединение под шифром RU-1144 (1-(2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксиэтил)-фенил-пиримидобензимидазолгидрохлорид), способно ингибировать процессы агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов, превосходя препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту, клопидогрел и этилметилгидроксипиридина сукцинат [31]. Существуют различные методы исследования данных видов активности [15, 16]. Однако наиболее распространенным является изучение антитромботических свойств на моделях артериальных тромбозов.

Поэтому, целью нашего исследования явилось сравнительное изучение антитромботической активности соединения RU-1144 и антиагрегантных препаратов с высокой доказательной базой ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, а также антиоксидантного средства ЭМГПС на модели артериального тромбоза сонной артерии крысы, а также на модели Global Thrombosis Test (по Грогу) и влияние на параметр «время кровотечения».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Эксперименты выполнены на 108 белых нелинейных крысах-самцах массой 250–300 г и 24 белых беспо-

родных мышах-самцах, массой 20–22 г, содержащихся в условиях вивария (температура 22–24°C, относительная влажность воздуха 40–50%) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92). Все животные получены из питомника ООО «НИЦБМТ». Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Все животные подвергались карантину в течение 14 дней (крысы и мыши) в условиях отдельных боксов вивария ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. В течение карантина, не менее чем 2 раза (1 и 14 день у крыс и мышей) проводилось измерение массы тела животных. Ежедневно проводили контроль клинического состояния путем визуального осмотра в группах. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями были исключены из экспериментальных групп. Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Все процедуры с животными проводились в соответствии со стандартами, изложенными в восьмом издании руководства по уходу и использованию лабораторных животных и ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). Экспериментальное исследование одобрено Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области протокол № 2083-2016 от 18.11.2016 г. Данное исследование выполнено в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [15].

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное исследование антитромботической активности производного бензимидазола под шифром РУ-1144 (1-(2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксиэтил)-фенил-пиримидобензимидазол гидрохлорид) (НИИ ФОХ ЮФУ), имеющего в своей структуре пространственно затрудненный фенольный заместитель. В качестве препаратов сравнения были выбраны известные антиагрегантные средства с высокой доказательной активностью—ацетилсалициловая кислота («Sigma», США) и клопидогрел («Sapofl», Франция), а также антиоксидантное средство — этилметилгидроксипиридина сукцинат («ЭМГПС», ООО «Фармасофт», Россия) [16]. Соединение РУ-1144 и препараты сравнения вводились внутривенно с помощью интрагастрального зонда.

В качестве растворителя веществ использовали очищенную дистиллированную воду. Антитромботическую активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения изучали на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III). Исследуемые вещества вводили крысам однократно внутривенно за 2 часа до нанесения тромботического агента на сонную артерию животных [17]. За 30 минут до начала воспроизведения экспериментального артериального тромбоза крыс внутривенно наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). После наступления наркоза послойно вскрывали кожу и ткани, выделяя сонную артерию. На небольшой участок сонной артерии укладывали ватный диск, смоченный 50% раствором хлорида железа (III) (0,025 мл). При помощи специальной пленки «Parafilm» изолировали окружающие ткани. Для регистрации изменений кровотока использовали ультразвуковой доплерограф «Минимакс-Допплер-К» («Минимакс», Санкт-Петербург). Ультразвуковой датчик аппарата устанавливали на небольшом расстоянии от ватного диска, наложенного на сонную артерию. Регистрацию кровотока проводили до полной окклюзии сосуда.

Соединение РУ-1144 и препараты сравнения были изучены в дозах эквимоларных дозе 19 мг/кг ацетилсалициловой кислоты (фармакологически активная доза, полученная на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс в тесте *in vivo*). Для исследуемого вещества РУ-1144 эта доза составила 48 мг/кг, а для препаратов сравнения клопидогрел и ЭМГПС — 32 и 28 мг/кг соответственно). В зависимости от проявленного антитромботического эффекта с целью определения ED₅₀ (доза, в которой изученные соединения увеличивают время наступления полной окклюзии сосуда тромбом по отношению к контролю на 50%), исследуемые дозы веществ и препаратов сравнения либо увеличивались, либо уменьшались. Соединение РУ-1144 было также изучено в дозах 24 и 12 мг/кг, АСК — 100 и 150 мг/кг, клопидогрел — 60; 120 и 180 мг/кг, а препарат сравнения ЭМГПС исследовался в дозах, которые составили 150 и 100 мг/кг, соответственно.

Антитромботическую активность соединения РУ-1144 исследовали на модели Global Thrombosis Test *in vitro* с исследованием биологического материала *ex vivo* после однократного внутривенного введения в дозе 18,8 мг/кг (фармакологически активная доза, полученная на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс в тесте *in vivo*) [18]. Препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел исследовали в дозах 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно. Через 2 часа после введения исследуемых соединений осуществляли забор крови из брюшной аорты шприцем в объеме 5 мл, содержащим 20 мкМ индуктора агрегации тромбоцитов АДФ.

Животных предварительно наркотизировали хлоралгидратом (внутрибрюшинно – 400 мг/кг). Полученную кровь немедленно помещали в специальную пробирку Горога без добавления стабилизаторов и консервантов. Основными критериями оценки антитромботического действия тестируемого соединения и препаратов сравнения служили показатели времени окклюзии и времени лизиса, анализ которых осуществляли при помощи программного обеспечения GTT Draw 2.3.

С целью определения нежелательного эффекта антиагрегантных препаратов была использована модель «время кровотечения на мышах» [19]. Для воспроизведения данной модели предварительно проводили наркотизацию животных, используя хлоралгидрат в дозировке 400 мг/кг, после чего отсекали 5 мм кончика хвоста, который помещали в пробирку с физиологическим раствором, находящейся на водяной бане (37°C). Для оценки эффекта регистрировали время, выраженное в секундах, от момента отсека кончика хвоста до момента полной остановки кровотечения. По действию на данный параметр соединение РУ-1144 было изучено в дозе 18,8 мг/кг, а препараты сравнения АСК и клопидогрел в дозах 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно. Введение исследуемых соединений осуществляли за 2 часа до начала эксперимента.

Группы контрольных животных получали очищенную дистиллированную воду внутрижелудочно однократно в эквивалентном объеме.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием критерия Манна-Уитни, критерия one-way ANOVA с поправкой Бонферрони при помощи пакета статистических программ GraphPad Prism5.0. («GraphPad», США) и Microsoft Excel 2007 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования на модели артериального тромбоза, были получены данные, свидетельствующие о наличии антитромботических свойств исследуемого вещества и препаратов сравнения.

Среднее время окклюзии сонной артерии животных контрольной группы составило $19,4 \pm 1,5$ мин. (табл. 1), что согласуется с литературными данными [23, 26].

Соединение РУ-1144, в дозе равной 48 мг/кг достоверно пролонгировало время полной окклюзии сонной артерии до 31,4 мин., что на 61,1% достоверно превосходило данный показатель контрольной группы животных. При дальнейшем снижении дозы тестируемого соединения до 24 мг/кг время образования тромба также достоверно уменьшалось и составляло 27 мин. Дальнейшее уменьшение дозы до 12 мг/кг достоверно пролонгировало насту-

пление полной окклюзии сонной артерии на 14,1% (табл. 1).

АСК в дозе 19 мг/кг недостоверно по отношению к контролю пролонгировала время образования тромба на 6,4%. Поэтому в дальнейшем исследовании дозы ацетилсалициловой кислоты были повышены до 100 и 150 мг/кг. При этом, в дозе 100 мг/кг препарат сравнения увеличивал время наступления полной окклюзии сонной артерии на 29,5%, а в дозе 150 мг/кг – на 58,5%. Таким образом, повышение дозы ацетилсалициловой кислоты увеличивало исследуемый показатель на 58,5% (табл. 1).

Клопидогрел в дозе 32 мг/кг достоверно удлинял время тромбообразования на 9,0% по сравнению с группой контрольных животных. Дальнейшее увеличение дозы до 60 мг/кг, а затем до 120 и 180 мг/кг, приводило к увеличению времени до полной окклюзии сонной артерии на 21,8, 34,6 и 65,4%, соответственно (табл. 1).

ЭМГПС в дозе 28 мг/кг увеличивал время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс на 8,11%. Повышение дозы препарата до 100 и 150 мг/кг приводило к удлинению данного показателя на 41,03 и 75,21% соответственно.

Исходя из полученных данных, были рассчитаны ED_{50} антитромботической активности соединения РУ-1144 и препаратов сравнения. Так, для тестируемого образца РУ-1144 данная величина составила 37,8 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты – 133,0 мг/кг, а для клопидогрела и ЭМГПС – 132,0 и 108,4 мг/кг, соответственно. Таким образом, по показателю ED_{50} антитромботической активности соединение РУ-1144 превосходило антиагрегантные препараты ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 3,52 и 3,49 раза соответственно, а антиоксидантное средство ЭМГПС – в 2,87 раза.

На следующем этапе была исследована антитромботическая активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения АСК и клопидогрела на модели Global Thrombosis Test (по Горогу). При выполнении данного эксперимента в контрольной группе животных время наступления полной окклюзии в тест системе составило 95,2 с. (табл. 2). Исследование биологического материала животных, которым внутрижелудочно вводили соединение РУ-1144, показало статистически достоверное увеличение времени наступления полной окклюзии на 37% по сравнению со значениями, полученными в контрольной группе и составило 130,5 с. При этом исследуемое соединение недостоверно увеличивало время лизиса относительной контроля (табл. 2).

Референсный препарат – АСК, изученная в дозе 28,5 мг/кг, также достоверно приводила к пролонгированию времени наступления полной окклюзии в тест системе, при этом данный показатель в 1,2 раза превышал показатель контрольной группы животных, при этом не влияла на время лизиса сгустка.

Таблица 1 – Влияние соединения РУ-1144, АСК, клопидогрела и ЭМГПС на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа (III) ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин.	Δ% пролонгирования времени образования тромба	ED ₅₀ , мг/кг
1	Контроль		19,4±1,5		
2	РУ-1144	12	22,3±0,7*	14,1±3,6*	37,8
		24	27,0±0,6*	38,5±2,8*	
		48	31,4±1,0*	61,1±5,4*	
3	АСК	19	20,8±0,3*	6,4±1,6*	133,0
		100	25,3±0,5*	29,5±2,5*	
		150	30,9±0,3*	58,5±1,4*	
4	Клопидогрел	32	21,3±0,3*	9,0±1,3*	132,0
		60	23,8±0,3*	21,8±1,6*	
		120	25,8±0,4*	34,6±1,3*	
5	ЭМГПС	180	32,3±0,4*	65,4±2,2*	108,4
		28	21,1±0,3*	8,1±1,6*	
		100	27,5±0,6*	41,0±2,9*	
		150	34,2±0,8*	75,2±4,3*	

Примечания:

n – число животных в группе

* – данные достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни, p<0,05)

Таблица 2 – Антитромботическая активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения АСК и клопидогрела на модели Global Thrombosis Test (по Горю) *ex vivo* ($M \pm m$, n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время окклюзии, с	Время лизиса, с
1	Контроль	–	95,2±1,4	635,2±29,0
2	РУ-1144	18,8	130,5±7,8*	711,2±39,4
3	Ацетилсалициловая кислота	28,5	117,5±4,1*	629,3±15,7
4	Клопидогрел	13,8	150,0±4,0*	631,5±17,1

Примечания:

n – число животных в группе

* – данные достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Таблица 3 – Влияние соединения РУ-1144, АСК и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей, в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время кровотечения, с	Δ% пролонгирования времени кровотечения
1	Контроль		349,3±7,2	
2	РУ-1144	18,8	445,5±10,5*#	27,5±3,0*#
3	АСК	28,5	583,9±9,1*	67,2±2,6*
4	Клопидогрел	13,8	566,0±10,0*	62,0±2,9*

Примечания:

n – число животных в группе

* – данные достоверны по отношению к контролю, критерий one-wayANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

– данные достоверны по отношению к препаратам сравнения, критерий one-wayANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Таблица 4 – Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения в исследованиях *in vitro* (IC₅₀) и *in vivo* (ED₅₀)

№ п/п	Тестируемые образцы	IC ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мг/кг
1	РУ-1144	5,5	18,8
2	АСК	120,0	28,5
3	Клопидогрел	–*	13,8

Примечания:

* – в виду того, что клопидогрел является пролекарством, он не может использоваться в *in vitro* тестах.

В группе животных, получавших клопидогрел, время окклюзии было на 57,6% выше показателей контрольной группы исследования, но при этом время лизиса было сравнимо со значениями, полученными в группе исследования контрольных животных (табл. 2).

Таким образом, как видно из полученных результатов исследования на данной модели наибольшее антитромботическое действие продемонстрировал препарат сравнения клопидогрел, который в исследуемой дозе увеличивал время окклюзии тест-системы в 1,7 раза, недостоверно превосходя соединение РУ-1144 и достоверно превосходя ацетилсалициловую кислоту в 1,3 раза. Также показано, что исследованные соединения не оказывают влияния на показатель времени лизиса.

При исследовании влияния соединения РУ-1144 и препаратов сравнения на время кровотечения из хвостовой вены мышей было показано, что в контрольной группе животных данный параметр составил 349,3 с, что совпадает с данными полученными другими исследователями [26]. В таблице 3 отображены результаты изучения влияния тестируемого образца РУ-1144, АСК и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей.

Так, соединение РУ-1144 приводило к достоверному относительно группы контрольных мышей увеличению времени кровотечения на 27,5%, в то время как АСК и клопидогрел пролонгировали время кровотечения в два раза активнее – на 67,2 и 62,0%, соответственно (табл. 3.). Таким образом, соединение РУ-1144 в меньшей степени оказывало влияние на данный показатель, чем референсные препараты.

ОБСУЖДЕНИЕ

В инициации процессов развития артериального тромбоза значительную роль играют сложные медиаторные взаимодействия между тромбоцитами с вовлечением различных факторов агрегации. Предварительные исследования антиагрегантной активности соединения РУ-1144 в сопоставлении с клопидогрелом и ацетилсалициловой кислотой, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, позволили определить ингибирующие концентрации (IC_{50}) и эффективные дозы (ED_{50}) данных соединений (табл. 4).

Как показано в табл. 4, при исследовании *in vitro*, соединение РУ-1144 в 21,8 раза превосходит по активности АСК, а в условиях *in vivo* – в 1,5 раза, при этом уступая в 1,3 раза клопидогрелу. По литературным данным, при тромботическом поражении сосудистой стенки аппликацией 50%-м хлоридом железа (III) происходит непосредственное взаимодействие железа с перекисью водорода, образование гидроксил-анионов и изменение фосфолипидного состава мембран тромбоцитов. Вышеуказанные процессы повышают функциональную активность тромбоцитов [21–23, 29]. Кроме того, в крови накапливается

окисленный фибриноген, который активизирует процесс тромбообразования. Пероксидация липидов в мембранах эндотелиоцитов приводит к системным нарушениям функций эндотелия и повышает его проницаемость. Данная модель тромбоза позволяет изучать влияние соединений на скорость формирования артериального (белого) тромба, состоящего в основном из тромбоцитов. Именно, поэтому данная модель была выбрана для изучения соединения РУ-1144, сочетающего два вида активности: антиагрегантную и антиоксидантную.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что соединение РУ-1144 проявляет выраженную антитромботическую активность, превышающую таковую у препаратов сравнения что обусловлено его способностью ингибировать процессы агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов и тем самым препятствовать возникновению артериального тромбоза в сонной артерии крыс.

Метод «Global Thrombosis Test», позволяет проводить исследования не только антитромботической, но и тромболитической активности соединений. В условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога соединение РУ-1144 показало способность увеличивать время образования тромба по сравнению со значениями в группе контрольных животных и недостоверное превосходство активности по сравнению с ацетилсалициловой кислотой, однако при этом недостоверно уступая клопидогрелу. Время лизиса под действием тестируемого образца не изменялось, что позволяет сделать вывод об отсутствии у соединения РУ-1144 фибринолитической активности.

Известно, что при проведении длительной терапии антиагрегантными препаратами наблюдается развитие такого побочного эффекта, как кровотечения. Наиболее часто развиваются кровотечения, которые наблюдаются в системе желудочно-кишечного тракта, а также не редки проявления внутричерепных кровоизлияний, вследствие чего происходит увеличение риска ишемических событий [25–28].

Исследование показало, что соединение РУ-1144 увеличивает время кровотечения из хвостовой вены мышей, однако в отличие от АСК и клопидогрела данный эффект выражен в меньшей степени, что позволяет сделать предположение о низкой вероятности возникновения побочного эффекта в виде кровотечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором хлоридом железа (III) соединение под лабораторным шифром РУ-1144 оказывает выраженное антитромботическое действие, превосходя антиагрегантные препараты – ацетилсалициловую кислоту и клопи-

догрел в 3,52 и 3,49 раза соответственно, а антиоксидантное средство ЭМГПС в 2,87 раза. В условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога тестируемый образец РУ-1144 показал способность увеличивать время образования тромба, сравнимое с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, при этом не оказывая влияние на время

его лизиса. При исследовании соединения РУ-1144 в тесте «время кровотечения» была показана способность тестируемого образца пролонгировать данный показатель, что характерно для группы антиагрегантов, но при этом, в сравнении с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, в меньшей степени удлинять данное время.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Papapanagiotou A., Siasos G., Gargalionis A., Papavassiliou A.G. et al. The Role of Platelets in Cardiovascular Disease: Molecular Mechanisms // *Curr Pharm Des.* – 2016. – V. 22, N 29. – P. 4493–4505. DOI: 10.2174/1381612822666160607064118
2. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J., et al. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association) // *Circulation.* – 2016. – N 133. – P. 38–60. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000485
3. Reed G.W., Rossi J.E., Cannon C.P. Acute myocardial infarction in women // *Lancet.* – 2017. – V. 14, N 389. – P. 197–210. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00267-1
4. Grove E.L., Würtz M., Thomas M.R., Kristensen S.D. Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2015. – V. 16, N 14. – P. 2133–2147. DOI: 10.1517/14656566.2015.1079619
5. Shaturnyĭ V.I., Shakhidzhanov S.S., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Activators, receptors and signal transduction pathways of blood platelets. *Biomed Khim.* – 2014. – V. 60, N 2. – P. 182–200. DOI: 10.18097/pbmc20146002182
6. Ambrosio D., Tritto I., Golino P. Reactive oxygen metabolites and arterial thrombosis. *Cardiovascular Research.* – 1998. – V. 34. – P. 4445–4524. DOI: 10.1016/s0008-6363(97)00101-6
7. Aboonabia A., Singh I. The effectiveness of antioxidant therapy in aspirin resistance, diabetes population for prevention of thrombosis // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2016. V. 83. – P. 277–282. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.06.044
8. Чещевик В.Т., Жерносеков Д.Д. Тромбоцитарная агрегация. Механизм участия адгезивных молекул и митохондрий // *Вестник Полесского государственного университета.* – 2017. – № 2. – С. 51–61
9. Roka-Moya Y.M. et al. Novel aspects of platelet aggregation // *Biopolym. cell.* – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 10–15. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000874>
10. Гордеев И.Г., Бекчиу Е.А., Люсов В.А., Волов Н.А., Ильина Е.Е., и др. Оценка влияния миокардиальных цитопротекторов на процессы перекисного окисления липидов у больных стабильной стенокардией до и после хирургической реваскуляризации миокарда // *Российский кардиологический журнал.* – 2005. – №3 (53). – С. 41–46.
11. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Сиротенко В.С., Гайдуркова К.А., Морковник А.С., Анисимова В.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А. Антитромботическая активность нового производного диазепинобензимидазола соединения ДАБ-15 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2016. – Т. 162, № 11. – С. 585–588.
12. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Косолапов В.А., Анисимова В.А. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2013. – Т. 155, № 6. – С. 740–742.
13. Kosolapov V.A., Spasov A.A., Anisimova V.A., Zhukovskaya O.N. Condensed Benzimidazoles Are a Novel Scaffold for Antioxidant Agents' Search and Development // *Antioxidants.* – 2019. – P. 245–253. DOI: 10.5772/intechopen.82817
14. Spasov A.A., Nedogoda V.V., Konan K., Kucheryavenko A.F. Mechanism of reduction of platelet sensitivity to medicines in response to low-energy laser radiation of blood // *Hematology and transfusiology.* – 2001. – Т. 46, N 2. С. 36–39.
15. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотноков М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М. и др. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз. В кн: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России.* – Москва, 2012. – С. 453–479.
16. Житникова Л.М. АСК в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний: клинические рекомендации для практикующих врачей // *РМЖ. Кардиология.* – 2012. – №14. – С. 708–713.
17. Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride // *Thromb. Res.* – 1990. – N 15. – P. 269–280. DOI: 10.1016/0049-3848(90)90106-m
18. Yamamoto J., Inoue N. et al. Global Thrombosis Test (GTT) can detect major determinants of haemostasis including platelet reactivity, endogenous fibrinolytic and thrombin generating potential // *Thrombosis Research.* – 2014. – V. 133. – P. 919–926. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.02.018
19. Greene T.K., Schiviz A. et al. Towards a standardization of the murine tail bleeding model // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – V. 8, N 12. – P. 2820–2822. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04084.x

20. Haber F., Weiss J. On the catalysis of hydroperoxide // *Naturwissenschaften*. – 1932. – V. 20. – P. 948–950.
21. Freedman J. E. Oxidative Stress and Platelets // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2008. – N 28. – P. 11–16. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.159178. Epub 2008 Jan 3.
22. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // *Redox Biol*. – 2015. – N 4. – P. 180–183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002
23. Dogne J.M., Hanson J., Leval X. et al. Pharmacological characterization of N-tert-Butyl-N-[2-(4-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-5730, a novel Thromboxane A2 receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time // *J. of Pharmacol. And Exp. Therap.* – 2004. – N 309. – P. 498–505. DOI: 10.1124/jpet.103.063610
24. Buccheri S., Capodanno D., James S., Angiolillo D.J. Bleeding after antiplatelet therapy for the treatment of acute coronary syndromes: a review of the evidence and evolving paradigms // *Expert Opin Drug Saf.* – 2019. – N 25. – P. 1–19. DOI: 10.1080/14740338.2019.1680637
25. Qiu L., Han J.X., See A.A.Q., King N.K.K. Effects of anticoagulant and antiplatelet agents in severe traumatic brain injury in an asian population – A matched case-control study // *J Clin Neurosci.* – 2019. – P. 61–66. DOI: 10.1016/j.jocn.2019.08.087.
26. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Тянь М., Анисимова В.А. Антитромботическая активность соединения РУ-891 // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т. 76. – № 6. – С. 25–26. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2013-76-6-25-26>
27. Spronk H. M. H., Padro T., Siland J. E. Atherothrombosis and Thromboembolism: Position Paper from the Second Maastricht Consensus Conference on Thrombosis // *Thromb Haemost.* – 2018. – V. 118, N 2. – P. 229–250. DOI: 10.1160/TH17-07-0492
28. Dadjou Y., Safavi S., Javad K. Risks and Benefits of Dual Antiplatelet Therapy Beyond 12 Months After Coronary Stenting // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – V. 95, N 22. – P. 1–7. DOI: 10.1097/MD.0000000000003663
29. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Селецкая В.В., Зеленская А.В. и др. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине // *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. – 2016. – N 3. – С. 4–12.
30. Bath P.M., May J., Heptinstall S. Clinical utility of remote platelet function measurement using P-selectin: assessment of aspirin, clopidogrel, and prasugrel and bleeding disorders // *Platelets*. – 2018. – N 29(5). – P. 425–430. DOI: 10.1080/09537104.2018.1445839
31. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gaidukova K.A., Kosolapov V.A., Zhukovskaya O.N. Antiplatelet activity of new derivatives of benzimidazole containing sterically hindered phenolic group in their structure // *Research Results in Pharmacology*. – V. 6, N 1. – P. 1–9. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.50373

АВТОРЫ

Спасов Александр Алексеевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0002-7185-4826. E-mail: aspasov@mail.ru

Кучерявенко Аида Фатиховна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0003-1406-6919. E-mail: aidakuchryavenko@yandex.ru

Гайдукова Ксения Андреевна – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики

ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0003-4376-6332. E-mail: ksenijagajjukva@rambler.ru

Черников Максим Валентинович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биологии и физиологии ПМФИ. ORCID ID: 0000-0001-8340-1296. E-mail: pharmax@list.ru

Жуковская Ольга Николаевна – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. ORCID ID: 0000-0003-0865-6656. E-mail: zhukowskaia.ol@yandex.ru