

5. *Медведева Л. М.* Памяти З. В. Ермольевой посвящается // Вестник Волгоградского государственного университета. — 2014. — № 4. — С. 131—133.

6. *Перепечеев Б. П.* Солдаты жизни. Волгоград. 1977 // Музей ВолгГМУ. № 720 н/в.

7. *Петрова И. А., Комиссарова Е. В.* Медики в Сталинградской битве // История в подробностях. — 2012. — № 8 (26). — С. 68—77.

8. *Тыдман С. Л.* Воспоминания. 5 марта 1981 // Музей ВолгГМУ. КП № 553.

9. *Юров В. С.* Капельное переливание крови в полевом подвижном госпитале // Доклады на конференциях хирургов. 1941—1945 гг. — Музей ВолгГМУ. КП № 222.

10. *Юров В. С.* Проникающие ранения брюшной полости // Доклады на конференциях хирургов. 1941—1945 гг. — Музей Волгоградского государственного медицинского университета. КП № 222.

Контактная информация

Белова Любовь Ивановна — к. ист. н., доцент кафедры истории и культурологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: belovalubov@gmail.com

УДК 547.785.5

АНТИАГРЕГАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ *IN VITRO* НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

**А. Ф. Кучерявенко, В. С. Сиротенко, К. А. Гайдукова, Д. Г. Матохин,
А. А. Спасов, Л. Н. Диваева, А. С. Морковник, Т. А. Кузьменко, В. А. Анисимова**

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии,*

НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону

На экспериментальной модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов *in vitro* была изучена антиагрегантная активность 16 новых конденсированных производных бензимидазола. В качестве препарата сравнения были выбраны антиагрегантные препараты — ацетилсалициловая кислота и тиклид. Соединения под шифром ДАБ-13, ДАБ-14 и ДАБ-15 проявили дозозависимое ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, превосходя в несколько раз по активности ацетилсалициловую кислоту, однако при этом незначительно уступали тиклиду. Определена острая токсичность LD₅₀ веществ под шифрами ДАБ-14 и ДАБ-15.

Ключевые слова: антиагрегантное действие, агрегация тромбоцитов, ацетилсалициловая кислота, тиклид.

IN VITRO ANTIAGGREGATION ACTIVITY OF NOVEL BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES

**A. F. Kucheryavenko, V. S. Sirotenko, K. A. Gaydukova, D. G. Matokhin,
A. A. Spasov, L. N. Divaeva, A. S. Morkovnik, T. A. Kuzmenko, V. A. Anisimova**

In vitro antiaggregation activity of 16 novel condensed derivatives of benzimidazole was studied in the experimental model of ADP-induced platelet aggregation in rabbit plasma. Acetylsalicylic acid (ASA) and ticlid were used as comparator drugs. DAB-13, DAB-14 and DAB-15 compounds showed a dose-dependent inhibitory effect on platelet aggregation in rabbit plasma *in vitro*. Anti-platelet aggregation activity of DAB-13, DAB-14 and DAB-15 compounds was found to be several times higher than that of ASA, and was slightly superior to anti-platelet aggregation activity of ticlid. The acute toxicity of LD₅₀ DAB-13, DAB-14 and DAB-15 compounds was measured.

Key words: antiaggregation activity, platelet aggregation, acetylsalicylic acid, ticlid.

Ключевая роль активации тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в патогенезе ишемических нарушений в различных органах определяет целесообразность использования антиагрегантных средств и других методов для их лечения и профилактики [5, 7, 11]. В настоящее время эффективность антитромбоцитарной терапии доказана в хорошо спланированных клинических исследованиях, продемонстрировавших, что длительный прием антитромбогенных средств снижает риск сосудистых эпизодов [9]. Наиболее широкое применение в клинической практике нашли антиагрегантные препараты, относящиеся к ингибиторам циклооксигеназы

тромбоцитов — ацетилсалициловая кислота и блокаторы P2Y₁₂-рецепторов — тиклопидин, клопидогрель, прасугрель, тикангрелор, кангрелор [8, 10]. Эти препараты проявляют различные механизмы действия, однако основной точкой приложения для данных лекарственных средств является стадия необратимой агрегации. Необходимо отметить также, что эти препараты обладают недостатками, к которым относится позднее наступление основного терапевтического эффекта, повышение риска кровотечений различного генеза, тромбоцитопения, нейтропения, аллергические реакции, а также развитие резистентности при длительных курсах

лечения [4]. Это объясняет актуальность выявления и изучения новых соединений с антиагрегантной активностью. Как показали ранее проведенные исследования биологической активности производных бензимидазола в Волгоградском государственном медицинском университете, отдельные производные данного класса проявляют выраженную антиагрегантную активность [1, 2]. Поэтому нам представилось интересным изучить способность новых производных этой трициклической системы, оказывать влияние на тромбогенный потенциал крови.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить антиагрегантную активность новых производных бензимидазола на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе проведено экспериментальное исследование влияния 16 новых производных бензимидазола под шифром ДАБ [НИИ ФОХ ЮФУ] на процессы агрегации тромбоцитов *in vitro*.

Эксперименты выполнены на 9 кроликах, весом 3,0—3,5 кг. Острая токсичность определялась на 75 белых нелинейных мышах-самцах массой 20—22 г при внутрибрюшинном введении. Исследования проводили согласно методическим руководствам и нормативным документам (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96; правилам и Международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); правилам лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, утвержденным приказом Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. № 267). Животные содержались в условиях вивария (температура 22—24 °С, относительная влажность воздуха 40—50 %) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92), с соблюдением правил качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 1000.4-96), а также правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). В течение 24 ч до экспериментов животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. На момент проведения исследований все животные были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

Для исследования была выбрана модель АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по методу G. Vogt, в модификации В. А. Габбасова, воспроизведенная на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «Биола» 220 LA (Россия) [13]. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно цент-

рифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами. В качестве индуктора агрегации использовали аденозин-5-дифосфорную кислоту (АДФ) («Serva», Венгрия), в конечной концентрации 5 мкМ. Соединения и препараты сравнения ацетилсалициловая кислота («Sigma», США) и тиклид («Sanofi-syntelabo», Франция) *in vitro* изучались в концентрации 100 мкМ. Уровень агрегации оценивался по значению степени агрегации, определяемой как максимальное приращение светопропускания после добавления индуктора. Для оценки активности соединений определяли $\Delta\%$ ингибирования функциональной активности тромбоцитов. Для расчета индекса EC_{50} (эффективная концентрация, подавляющая процесс агрегации тромбоцитов на 50 %), который проводили с использованием метода регрессионного анализа, вещества изучались в концентрации 100, 10 и 1 мкМ.

Исследование токсичности наиболее активных соединений выполнялось в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития [6]. Острая токсичность определялась на 65 белых нелинейных мышах-самцах массой 20—22 г при внутрибрюшинном введении. Гибель животных регистрировалась в течение двух недель. Величину токсикологического показателя — LD_{50} рассчитывали по методу Личфилда-Вилкоксона.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием критерия Манна-Уитни при помощи пакета статистических программ программного обеспечения Microsoft Excell 2006.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования было показано, что новые производные бензимидазола оказывают антиагрегантный эффект *in vitro* в различной степени выраженности.

При исследовании соединений в концентрации 100 мкМ было установлено выраженное антиагрегационное действия у соединений под шифрами ДАБ-4, ДАБ-7, ДАБ-9, ДАБ-12, ДАБ-13, ДАБ-14, ДАБ-15, ДАБ-25 и ДАБ-26. Ингибирование агрегации тромбоцитов под влиянием этих соединений превышало 50 %. При этом вещества ДАБ-13, ДАБ-14 и ДАБ-15 по своей активности достоверно превосходили препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и оказывали эффект, сравнимый с эффектом тиклида. По антиагрегантной активности соединения ДАБ-7, ДАБ-12, ДАБ-20, ДАБ-21 ДАБ-22 и ДАБ-24 были сопоставимы друг с другом и с ацетилсалициловой кислотой, однако уступали тиклиду. Соединения ДАБ-5, ДАБ-8 и ДАБ-23 оказали самую низкую антиагрегантную активность, ингибируя агрегацию тромбоцитов в концентрации 100 мкМ на 32,00, 40,29 и 40,99 % соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Влияние новых производных бензимидазола в концентрации 100 мкМ, ацетилсалициловой кислоты (АСК) и тиклида на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$)

№ п/п	Шифр соединения	Ингибирование агрегации тромбоцитов Δ % ($M \pm m$) в концентрации 100 мкМ
1	ДАБ-4	72,16 \pm 6,40* [#]
2	ДАБ-5	32,8 \pm 3,20*
3	ДАБ-7	54,33 \pm 3,70*
4	ДАБ-8	40,29 \pm 4,30*
5	ДАБ-9	69,84 \pm 3,10* [#]
6	ДАБ-12	50,83 \pm 5,30*
7	ДАБ-13	81,57 \pm 7,40* [#]
8	ДАБ-14	87,33 \pm 8,30* [#]
9	ДАБ-15	81,21 \pm 4,10* [#]
10	ДАБ-20	44,52 \pm 3,80*
11	ДАБ-21	47,66 \pm 7,10*
12	ДАБ-22	49,27 \pm 5,90*
13	ДАБ-23	40,99 \pm 4,40*
14	ДАБ-24	46,58 \pm 4,10*
15	ДАБ-25	59,54 \pm 8,50*
16	ДАБ-26	50,96 \pm 5,30*
17	АСК	52,06 \pm 4,20*
18	Тиклид	80,9 \pm 2,70*

* $p < 0,05$ — изменения статистически достоверны по сравнению с исходными показателями;

[#]изменения статистически достоверны по сравнению с АСК.

Исследование влияния наиболее активных веществ на агрегацию тромбоцитов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ выявило дозозависимый эффект, в результате которого 8 из 16 изученных соединений по эффективной концентрации (IC_{50}) превосходили препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. При этом вещества

под шифрами ДАБ-13, ДАБ-14 и ДАБ-15 проявили наибольшую антиагрегантную активность *in vitro*, превосходя ацетилсалициловую кислоту в 57, 58 и 65 раз соответственно. Однако при этом данные соединения уступали другому препарату сравнения тиклопидину в 1,8, 1,7 и 1,5 раза соответственно (табл. 2).

Далее была изучена острая токсичность трех наиболее активных соединений под шифрами ДАБ-13, ДАБ-14 и ДАБ-15. Соединение ДАБ-13 в дозировке 100 мг/кг вызывало летальный исход у 100 % подопытных животных. LD_{50} веществ под шифрами ДАБ-14 и ДАБ-15 составила 113 и 115 мг/кг соответственно, и для них был рассчитан условный терапевтический индекс (УТИ) (табл. 3).

Таким образом, соединения ДАБ-14 и ДАБ-15 по УТИ превосходят ацетилсалициловую кислоту в 2,4 и 3,4 раза соответственно, однако в 6,2 и 4,4 раза уступают тиклиду.

Далее была изучена зависимость антиагрегантного действия новых производных бензимидазола от их химической структуры. Так как в целом все изученные вещества ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* и отличались лишь по степени выраженности эффекта, можно предположить, что в антиагрегантную активность данного класса вносит положительное влияние базовая структура.

Анализ влияния заместителей на высокий уровень антиагрегантной активности новых производных бензимидазола производился для заместителей в положении 1. В группе веществ, относящихся к данному ряду соединений, значимый вклад в антиагрегантную активность, по-видимому, вносят метоксифеноксипропиловый и фторбензильный заместители.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения 16 новых производных бензимидазола на предмет ингибирования агрегации тром-

Таблица 2

Эффективная концентрация ($ЭК_{50}$) производных бензимидазола ($M \pm m$)

№ п/п	Шифр соединения	Δ % ингибирования агрегации тромбоцитов (по трем опытам) в концентрациях:			EC_{50} , М
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	ДАБ-4	72,16 \pm 6,4* [#]	39,5 \pm 3,1* [#]	30,9 \pm 4,9* [#]	1,3 \times 10 ⁻⁵
2	ДАБ-7	54,33 \pm 3,7*	31,55*	21,25* [#]	7,3 \times 10 ⁻⁵
3	ДАБ-9	69,84 \pm 3,1* [#]	33,18 \pm 6,2*	24,26 \pm 3,1* [#]	2,14 \times 10 ⁻⁵
4	ДАБ-12	50,83 \pm 5,3*	30,42 \pm 4,3*	20,5 \pm 2,9* [#]	1,15 \times 10 ⁻⁵
5	ДАБ-13	81,57 \pm 7,4* [#]	41,72 \pm 2,1* [#]	37,13 \pm 4,6* [#]	7,0 \times 10 ⁻⁶
6	ДАБ-14	87,33 \pm 8,3* [#]	44,3 \pm 5,1* [#]	32,18 \pm 4,2* [#]	6,8 \times 10 ⁻⁶
7	ДАБ-15	81,21 \pm 4,1* [#]	48,06 \pm 3,6* [#]	35,43 \pm 5,3* [#]	6,1 \times 10 ⁻⁶
8	ДАБ-25	59,54 \pm 8,5*	46,74 \pm 3,1* [#]	32,25 \pm 4,8* [#]	1,9 \times 10 ⁻⁵
9	ДАБ-26	50,96 \pm 5,3*	38,35 \pm 2,9* [#]	34,75 \pm 3,6* [#]	1,2 \times 10 ⁻⁴
10	АСК	52,06 \pm 4,2*	20,8 \pm 3,5*	4,6 \pm 1,7	1,04 \times 10 ⁻⁴
11	Тиклид	80,9 \pm 2,7*	55,7 \pm 1,2*	39,04 \pm 1,2*	3,9 \times 10 ⁻⁶

* $p \leq 0,05$, изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни;

[#] $p < 0,05$, изменения статистически значимы по отношению к эффекту препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты.

**Антиагрегантная активность ($ЭК_{50}$), величина острой суточной токсичности (LD_{50}),
и терапевтический индекс (УТИ) соединений ДАБ-14, ДАБ-15,
ацетилсалициловой кислоты (АСК) и тиклида**

№ п/п	Шифр соединения	EC_{50} , М	LD_{50} , мг/кг	УТИ LD_{50}/EC_{50}
1	ДАБ-14	$6,8 \times 10^{-6}$	113	39,78
2	ДАБ-15	$6,1 \times 10^{-6}$	115	56,9
3	АСК	$1,04 \times 10^{-4}$	310	16,9
4	Тиклид	$3,9 \times 10^{-6}$	300	250,0

боцитов *in vitro* показано, что данный подкласс является перспективным для изучения данного вида активности.

Были найдены высокоактивные соединения под шифрами ДАБ-14 и ДАБ-15, которые по условному терапевтическому индексу превосходят препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2,4 и 3,4 раза соответственно, что свидетельствует о целесообразности дальнейшего более углубленного фармакологического изучения данных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимова В.А., Сласов А.А., Островский О.В. и др. Синтез и фармакологическая активность 3-(арил) и 3-(гетароил)имидазо[1,2-а]бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. — 2002. — Т. 36. — № 12. — С. 3—8.
2. Анисимова В. А., Сласов А. А., Толпыгин И. Е. и др. Синтез и фармакологическая активность солей 3-ацетил-2-*R*-9 диалкиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. — 2010. — Т. 44. — № 3. — С. 8—13.
3. Габбасов З. А., Попов Е. Г., Гаврилова И. Ю. и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лабораторное дело. — 1989. — № 10. — С. 15—18.
4. Грицан Г. В. Резистентность к аспирину у больных с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу / Г. В. Грицан, И. А. Ольховский, М. А. Столяр, Ю. В. Косницкая // Сибирское медицинское обозрение. — 2013. — № 4. — С. 19—23.
5. Мельникова Е., Кадинская М., Герасименко Д. и др. Патология гемостаза и системная воспалительная реакция у пациентов с ишемическим инсультом // Врач. — 2011. — № 14. — С. 15—18.

6. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // Под общ. ред. д. м. н. А. Н. Миронова. — М., 2012. — С. 939.

7. Сласов А.А., Недогода В.В., Конан К. и др. Механизм снижения чувствительности тромбоцитов к лекарственным средствам под влиянием низкоэнергетического лазерного облучения крови // Гематология и трансфузиология. — 2001. — № 2. — С. 36—39.

8. Толпыгина С. Н. Применение ацетилсалициловой кислоты с целью первичной и вторичной профилактики у пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений / С. Н. Толпыгина, С. Ю. Марцевич, Н. В. Киселева, Е. Н. Хосева // Сердце: журнал для практикующих врачей. — 2011. — № 6. — С. 358—365.

9. Angiolillo D. J., Capodanno D., Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis // Eur Heart J. — 2010. — № 31 (1). — P. 17—28.

10. Fiedler K. A. Randomised, double-blind trial on the value of tapered discontinuation of clopidogrel maintenance therapy after drug-eluting stent implantation. Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: CAUTION in Discontinuing Clopidogrel Therapy — ISAR-CAUTION / K. A. Fiedler, J. Mehilli, S. Kufner, A. Schlichting, et al. // Thromb. Haemost. — 2014. — № 111 (6). — P. 1041—1049.

11. Jennings L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis // Thromb. Haemost. — 2009. — № 102 (2). — P. 248—257.

Контактная информация

Кучерявенко Аида Фатиховна — д. м. н.,
доцент кафедры фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail:
aidakucheryavenko@yandex.ru