

АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1144 НА МОДЕЛИ СИСТЕМНОГО АРТЕРИАЛЬНОГО ТРОМБОЗА

А.А. Спасов¹, А.Ф. Кучерявенко¹, А.В. Смирнов¹, К.А. Гайдукова¹, В.С. Сиротенко¹,
Н.Г. Паньшин¹, О.Н. Жуковская²

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации;

²НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета

В настоящем исследовании была изучена антитромботическая активность нового химического соединения производного бензимидазола, имеющего в своей структуре экранированный фенольный заместитель, под лабораторным шифром РУ-1144, которое проявляет высокую антиагрегантную и антиоксидантную активности в тестах *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что тестируемый образец обладает выраженным антитромботическим эффектом и превосходит по активности препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел на модели клеточного тромбоза, генерированного у мышей.

Ключевые слова: артериальный тромбоз, агрегация тромбоцитов, перекисное окисление липидов, соединение РУ-1144, ацетилсалициловая кислота, клопидогрел.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-111-115

ANTITHROMBOTIC EFFECT OF A COMPOUND RU-1144 ON THE MODEL OF SYSTEMIC ARTERIAL THROMBOSIS

A.A. Spasov¹, A.F. Kucheryavenko¹, A.V. Smirnov¹, K.A. Gaidukova¹, V.S. Sirotenko¹,
N.G. Panshin¹, O.N. Zhukovskaya²

¹FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation;

²Research Institute of physical and organic chemistry, Southern Federal University

In this study, the antithrombotic activity of a new chemical compound of a benzimidazole derivative, which has a shielded phenolic substituent in its structure, under the laboratory code RU-1144 was studied, which exhibits high antiplatelet and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* tests. It was shown that the test sample has a pronounced antithrombotic effect and is superior in activity to the comparison drugs acetylsalicylic acid and clopidogrel in a model of cell thrombosis generated in mice.

Key words: arterial thrombosis, platelet aggregation, lipid peroxidation, compound RU-1144, acetylsalicylic acid, clopidogrel.

Важным фактором, который определяет исход заболеваний сердечно-сосудистой системы, являются артериальные тромбозы. В случае развития атеросклеротического повреждения сосудистой стенки происходит фиксирование скоплений тромбоцитов на поврежденном эндотелии сосудов, происходящее с помощью фибриновых нитей, и, в итоге, образуются белые тромбы [9]. Несмотря на то, что изначально тромбоциты рассматривались лишь как элементы, участвующие в образовании гемостатического тромба в месте повреждения сосудистой стенки, в настоящее время доказано, что они являются ключевыми медиаторами патогенеза артериальных тромбозов и атеросклероза. Кроме того, в последние годы сформировалась концепция о важнейшей роли перекисного окисления липидов в патогенезе повышения тромбогенного потенциала крови, определены источники активных форм кислорода и азота, которые вносят вклад в развитие данной патологии [7, 8]. Все вышеперечисленное является теоретическим обоснованием использования антиагрегантных и антиоксидантных препаратов в качестве средств патогенетической терапии.

Химический класс замещенных гетероциклических азотосодержащих соединений считается перспективным для создания на его основе новых препаратов, о чем свидетельствует широкий спектр проявляемой биологической активности [4, 5]. В ранее проведенных исследованиях была установлена способность химического соединения РУ-1144, содержащего в своей структуре пространственно затрудненный фенол, проявлять выраженную антиагрегантную и антиоксидантную активности.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить антитромботическую активность на модели артериального адреналин-коллагенового тромбоза у мышей *in vivo*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 40 белых беспородных мышках обоего пола массой 20–25 г, содержащихся в условиях вивария (температура 22–24 °С, относительная влажность воздуха 40–50 %) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92) при соблюдении правил

лабораторной практики проведения 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). Эксперименты были одобрены региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (протокол № 2022-2016 от 7 октября 2015 г.).

Данное исследование выполнено в соответствии с требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под ред. Миронова А.Н., 2012 г.) [3].

Изучение антитромботической активности соединения 1-(2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксиэтил)-фенил-пиримидобензимидазол гидрохлорид (НИИ ФОХ ЮФУ, г. Ростов-на-Дону) *in vivo* проводили на модели клеточного адреналин-коллагенового тромбоза в соответствии с методикой Di Minno G. (1983) [6]. В качестве тромботического агента использовали смесь растворов коллагена и адреналина в дозе 0,5 и 0,06 мг/кг соответственно. Данную смесь в объеме 0,1 мл вводили в хвостовую вену животного в течении 10 с. Соединение РУ-1144 растворяли в дистиллированной воде и вводили перорально при помощи атравматичного металлического зонда за 2 часа до моделирования тромбоза. В качестве препаратов сравнения использовали лекарственные средства с высоким уровнем доказательности – ацетилсалициловую кислоту (Sigma, США) и клопидогрел (Sanofi, Франция). Тестируемые образцы вводили в дозах ED₅₀, полученных при изучении антиагрегантной активности *in vivo* согласно методу [1]. Для соединения РУ-1144 доза составила 18,8 мг/кг, а для ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела – 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно. Животным контрольной группы вводился растворитель в эквивалентном объеме. Для оценки эффективности тестируемых образцов отмечалось количество выживших животных по сравнению с контрольной группой, а также наличие тромбов в сосудах легких. В течение суток устанавливалось наблюдение за выжившими животными. Погибшие и выжившие мыши (для эвтаназии применялся эфирный наркоз) подвергались вскрытию для гистологической оценки легких. У животных контрольной группы была также проведена гистологическая оценка печени, сердца, почек, головного мозга.

После забора материал фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) на 24 часа, обезвоживали и заливали в парафин. Затем из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4–6 мкм и окрашивали их по методу Саркисова (1996) гематоксилином и эозином. Фотографирование гистологических препаратов осуществляли цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива ×10, ×40 и окуляра ×10.

При морфологическом исследовании проводили оценку наличия признаков тромбообразования в стенке артериальных сосудов мышечного типа.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2007 (среднее значение и стандартная ошибка средней величины), а также программы GraphPad Prism 5.0 с использованием критерия one-way ANOVA с поправкой Бонферрони и критерия Фишера.

При исследовании гистологических срезов микропрепаратов оценивали наличие признаков тромбообразования в стенке артериальных сосудов мышечного типа. Статистическую обработку данных гистологических исследований проводили с использованием программы «Видео Тест Морфо-4».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза была продемонстрирована его высокая активность.

После введения тромботических агентов в группе контрольных животных наблюдалось увеличение частоты дыхания, выраженный экзофтальм, парез задних конечностей и характерные тетанические судороги: мыши не были способны отдергивать задние лапы при сильном нажатии и принимали характерную позу, при которой задние лапы были выпрямлены и отведены назад. Через 1–3 минуты после внутривенного введения смеси адреналина и коллагена животные погибали от удушья. В группе контрольных животных наблюдалась гибель 95 % животных.

Введение соединения РУ-1144 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела достоверно повышало выживаемость мышей при создании данной модели тромбоза до 80, 60 и 50 % соответственно (рис. 1).



*Данные, достоверные по отношению к контролю (точный критерий Фишера, $p \leq 0,01$).

Рис. 1. Выживаемость мышей на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза под действием соединения РУ-1144 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела

При этом дыхательная и двигательная активность выживших животных полностью восстанавливались через 1–2 минуты, а у погибших животных смерть наступала только спустя 5–10 минут. При этом у мышей наблюдались менее выраженные симптомы дыхательной недостаточности.

Таким образом, было показано, что соединение РУ-1144 обладает выраженной антитромботической активностью, при этом превосходя препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,3 и 1,6 раз соответственно.

Согласно литературным данным [2] гибель животных в результате введения тромботических агентов наступает в результате массивной окклюзии микрососудов легких тромбоцитарными агрегатами. Поэтому было выполнено гистологическое исследование легких, а также печени, сердца, почек и головного мозга животных. В результате было показано наличие тромбов только в микрососудах легких. Во всех остальных органах повреждений не обнаружено, что соответствует данным, полученным другими исследователями [2].

При исследовании срезов легких (рис. 2) контрольных животных при помощи электронномикроскопического исследования было выявлено преобладание альвеол средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, адгезированные к сосудистой стенке и находящиеся в просвете сосуда. Отмечалось выраженное расширение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия и отека, обнаружены также явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в просвет некоторых альвеол, явления стаза и очаговые мелкие кровоизлияния. Выявлялась слабо выраженная лимфоидная инфильтрация в периваскулярных отделах и в стенках мелких бронхов. Также в контрольных образцах наблюдалось большое количество тромбов в просветах сосудов. При проведении морфометрического исследования срезов легких контрольных животных выявлено, что относительная площадь тромбов на срезах легкого составила $(4,15 \pm 1,12) \%$, а средняя площадь тромба на срезах составила $(9858,41 \pm 2261,26) \text{ мкм}^2$ (табл.).

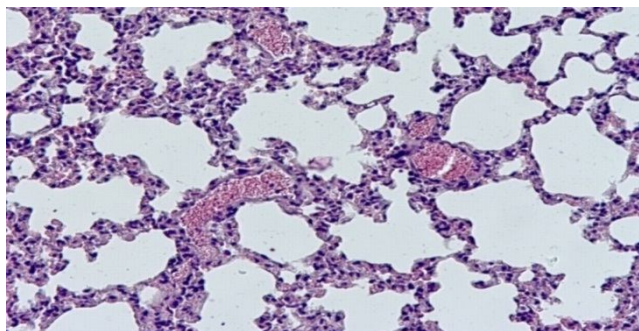


Рис. 2. Тромбообразование в легких под влиянием внутривенного введения смеси коллагена и адреналина. Окраска гематоксилином и эозином Ув. 100

Антитромбогенная активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза в дозах ED₅₀, полученных в тестах *ex vivo*

Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Средняя площадь тромбов, мкм ²	Относительная площадь тромбов, %
Контроль	–	9858,41 ± 2261,26	4,15 ± 1,12
РУ-1144	18,8	3590,17 ± 1097,21*	1,51 ± 0,42*
Ацетилсалициловая кислота	28,5	4372,69 ± 1237,61*	1,83 ± 0,58*
Клопидогрел	13,8	4768,83 ± 1479,71*	1,98 ± 0,67*

*Данные достоверны относительно контроля, one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$).

На срезах легких мышей, получавших соединение РУ-1144, наблюдались единичные тромбы в венах, адгезированные к сосудистой стенке. Кровоизлияния отсутствовали (рис. 3). Относительная площадь тромбов на срезах легкого составила $(1,51 \pm 0,42) \%$, то есть снижалась на 2,64 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, а средняя площадь тромба на срезах составила $(3590,17 \pm 1097,21) \text{ мкм}^2$, то есть снижалась на 63,58 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. табл.).

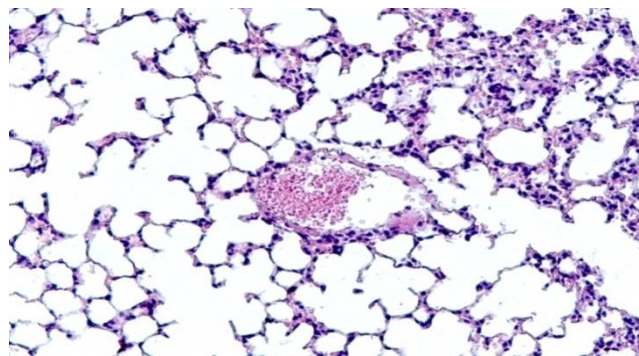


Рис. 3. Влияние соединения РУ-1144 на тромбообразование в легких мышей, вызванное внутривенным введением смеси коллагена и адреналина. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

У животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, наряду с альвеолами средних размеров, встречались эмфизематозно-расширенные альвеолы и альвеолы меньших размеров. Преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Выявлялись небольшие единичные тромбы, преимущественно, в сосудах венозного типа. Отмечалось

утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия (рис. 4).

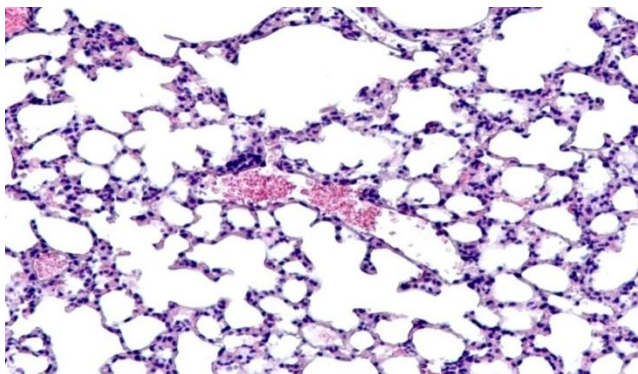


Рис. 4. Влияние ацетилсалициловой кислоты на тромбообразование в легких мышей, вызванное смесью коллагена и адреналина. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, выявлено, что относительная площадь тромбов на срезах легкого составила $(1,83 \pm 0,58) \%$, то есть снижалась на 2,32 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, а средняя площадь тромба на срезах составила $(4372,69 \pm 1237,61) \text{ мкм}^2$, то есть снижалась на 55,65 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

У животных, получавших клопидогрел, преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Были выявлены небольшие единичные тромбы. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия. Мелкочаговые кровоизлияния в стенку капилляров и просвет альвеол (рис. 5).

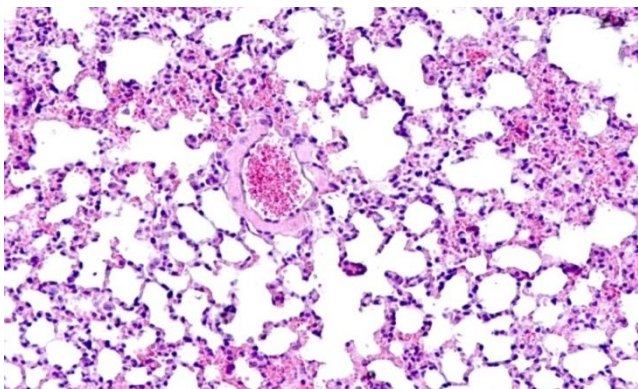


Рис. 5. Влияние клопидогрела на тромбообразование в легких мышей, вызванное смесью коллагена и адреналина. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.100

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших

клопидогрел, выявлено, что относительная площадь тромбов на срезах легкого составила $(1,98 \pm 0,67) \%$, то есть снижалась на 2,17 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, а средняя площадь тромба на срезах составила $(4768,83 \pm 1479,71) \text{ мкм}^2$, то есть снижалась на 51,63 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что в результате изучения влияния соединения РУ-1144 на процессы тромбообразования, вызванные повреждением стенки артерий введением тромботических агентов, установлена его высокая способность увеличивать выживаемость животных в эксперименте при однократном внутривенном введении, превосходящая ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2 и 1,6 раза соответственно. В инициации данной модели тромбоза ключевую роль играют именно тромбоциты, в мембранах которых при их активации происходит усиление ПОЛ. Следовательно, полученные данные подтверждают, что способность соединения РУ-1144 угнетать процессы агрегации тромбоцитов и ПОЛ приводит к предотвращению тромбообразования. Это подтверждают и данные морфологического исследования срезов легких мышей. Так, соединение РУ-1144 снижает среднюю и относительную площадь тромбов на срезе легкого в 3,8 и 2,7 раза соответственно по отношению к контролю, при этом превосходя по данным показателям препараты сравнения – ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1989. – № 10. – С. 437–439.
2. Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Смирнов А.В. Антитромботическая активность нового гипогликемического соединения лимиглидола на модели клеточного тромбоза у мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 1. – С. 49–51.
3. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б. и др. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России. – М., 2012. – С. 453–479.
4. 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.
5. Спасов А.А., Сиротенко В.С., Гайдукова К.А. и др. Антитромботическая активность нового производного тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]-бензимидазола соединения ДАБ-15 на модели артериального тромбоза // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 1 (57). – С. 56–58.

6. DiMinno G., Silver M.J. Mouse antithrombotic assay simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1983. – № 225. – P. 57–60.

7. Kudriashova M.V., Dovgaliuk U.V., Mishina I.E., et al. Possibilities of correction of rheological properties of the blood and free radical processes in patients with acute myocardial infarction combined with type 2 diabetes mellitus // Kardiologiya. – 2010. – № 50 (5). – P. 9–12.

8. 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. – № 133. – P. 38–60.

9. Suzuki-Inoue K. Activation and inhibitory mechanisms of blood platelets // Nihon Rinsho. – 2014. – № 72 (7). – P. 1212.

REFERENCES

1. Gabbasov Z.A., Popov E.G., Gavrilov I.Ju., Pozin E.Ja., Markosjan R.A. Novyj metodicheskij podhod k issledovaniju agregacii trombocitov *in vitro* [A new methodological approach to the study of platelet aggregation *in vitro*]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of experimental biology and medicine], 1989, no. 10, pp. 437–439. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Kucherjavenko A.F., Spasov A.A., Smirnov A.V. Antitromboticheskaja aktivnost' novogo gipoglikemicheskogo soedinenija limiglidola na modeli kletochnogo tromboza u myshej [Antithrombotic activity of a new hypoglycemic compound of limiglidol in a model of cell thrombosis in mice]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of experimental biology and medicine], 2015, Vol. 159, no. 1, pp. 49–51. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Makarov V.A., Spasov A.A., Plotnikov M.B. i dr. Metodicheskie rekomendacii po izucheniju lekarstvennyh sredstv, vlijajushih na gemostaz [Guidelines for the study of drugs that affect hemostasis]. In Rukovodstvo po

provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv FGBU «NCJeSMP» Minzdravsocrazvitija Rossii [Guidelines for preclinical studies of drugs FSBI «NTSESMP» Ministry of Health and Social Development of Russia]. Moscow, 2012. P. 453–479.

4. Spasov A.A., Kucherjavenko A.F., Kosolapov V.A., Anisimova V.A. Antitrombogennaja aktivnost' antioksidantnyh soedinenij [Antithrombogenic activity of antioxidant compounds]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of experimental biology and medicine], 2013, Vol. 155, no. 6, pp. 740–742. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Spasov A.A., Sirotenko V.S., Gajdukova K.A. i dr. Antitromboticheskaja aktivnost' novogo proizvodnogo tetragidro[1,3]diazepino[1,2-a]-benzimidazola soedinenija DAB-15 na modeli arterial'nogo tromboza [Antithrombotic activity of a new derivative of tetrahydro [1,3] diazepino [1,2-a] benzimidazole compound DAB-15 in a model of arterial thrombosis]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Volgograd State Medical University], 2016, no. 1 (57), pp. 56–58. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. DiMinno G., Silver M.J. Mouse antithrombotic assay simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. J. Pharmacol. Exp. Ther, 1983, no. 225, pp. 57–60.

7. Kudriashova M.V., Dovgaliuk U.V., Mishina I.E., et al. Possibilities of correction of rheological properties of the blood and free radical processes in patients with acute myocardial infarction combined with type 2 diabetes mellitus. *Kardiologiya*, 2010, no. 50 (5), pp. 9–12.

8. 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, no. 133, pp. 38–60.

9. Suzuki-Inoue K. Activation and inhibitory mechanisms of blood platelets. *Nihon Rinsho*, 2014, no. 72 (7), p. 1212.

Контактная информация

Гайдукова Ксения Андреевна – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: ksenijagajjukva@rambler.ru