

ПРИМЕНЕНИЕ ВАРФАРИНА В КАЧЕСТВЕ ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ В ОПЫТАХ НА КРЫСАХ

УДК 616-092.9+ 616.15

© Д. Ю. Ивкин, А. В. Бурякина, И. Л. Степанова, А. С. Ивкина

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия МЗ РФ

Ключевые слова:

варфарин; протромбиновое время; зависимость «продолжительность введения — эффект».

Резюме

В статье рассматривается возможность использования у крыс антикоагулянта непрямого действия варфарина в качестве референс-препарата в скрининговых исследованиях. Определена доза варфарина, приводящая к достоверному увеличению протромбинового времени и не вызывающая внутренних кровотечений у животных. Определены оптимальные сроки введения. Выявлена зависимость эффекта варфарина от продолжительности его введения крысам.

ВВЕДЕНИЕ

Изыскание новых антикоагулянтов является актуальной задачей. В качестве референтного препарата в доклинических испытаниях потенциальных лекарственных средств с антикоагуляционной активностью рекомендуется варфарин [1]. Изучение потенциальных антикоагулянтов непрямого действия целесообразно проводить на кроликах, учитывая особенности реакции крыс и мышей на производные кумарина, к которым относится варфарин. Между тем скрининговыми исследованиями, как правило, подвергается достаточно большое количество соединений, что связано с использованием большого количества лабораторных животных. В случае проведения испытаний на кроликах это обстоятельство не только удорожает предварительный этап оценки эффективности потенциального лекарственного средства, но и создает определенные трудности в их размещении и проведении манипуляций.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель настоящей работы заключалась в выявлении возможности использования варфарина в качестве референс-препарата для скрининга не прямых антикоагулянтов в опытах на крысах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 60 белых беспородных крысах самцах массой 180–200 г, полученных из питомника лабораторных животных ПАН «Рап-

полово» (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе со свободным доступом к воде [5].

Эксперимент состоял из 2 этапов: на 1-м определяли эффективную и безопасную для крыс дозу варфарина, на 2-м определяли оптимальную схему введения варфарина крысам.

Варфарин (производство компании «Никомед» (Дания), серия 19016100, срок годности декабрь 2013 г.) вводили животным внутривенно (перорально) с помощью металлического зонда в первой половине дня.

Для проведения опыта по определению эффективной и безопасной дозы варфарина использовали 20 животных, которых разделили на 4 группы. Крысам из 1-й группы вводили варфарин однократно в дозе 0,4 мг/кг (стандартный пересчет с максимальной суточной дозы для человека), крысам из 2-й и 3-й групп однократно — в дозах 0,04 и 0,004 мг/кг соответственно, 4-я группа — получала воду очищенную. Забор крови осуществляли через сутки после введения препаратов. Критерием эффективности считали величину протромбинового времени (ПТВ), общепринятого показателя в опытах *in vivo* [2]. Величину ПТВ определяли на гемокоагулометре TROMB-1 (Ольвекс Диагностикум, Россия) с помощью готовых наборов производства Технология-Стандарт (Россия). Эффективной считали дозу, при которой показатель ПТВ достоверно повышался по сравнению с контролем без сопутствующих внутренних кровоизлияний у животных.

В экспериментах 2-го этапа использовали 40 животных, которые были разделены на 8 групп (7 опытных, получавших варфарин, и 1 контрольная). Животные из контрольной группы получали воду очищенную в дозе 10 мл/кг. Величину ПТВ определяли на 1, 3, 5 и 10 сутки эксперимента. Схема 2-го этапа представлена в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На 1-м этапе исследования определяли дозу варфарина, которая при введении крысам оказывала антикоагуляционный эффект, но не вызывала гибели животных. У крыс из контрольной группы величина ПТВ составила $13,0 \pm 0,3$ с. Максимальный эффект наблюдали у животных, получавших варфарин в дозе 0,4 мг/кг, величина ПТВ составила $30,7 \pm 0,5$ с. При введении варфарина в дозе 0,04 мг/кг ПТВ оказа-

■ Таблица 1. Схема второго этапа опыта

Группа	День эксперимента									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	–	–	–	–	–
2	В	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	–	–	–	–
3	В	В	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	–	–
4	В	В	В	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ
5	В	В	В	В	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ
6	В	В	В	В	В	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ	ПТВ
7	В	В	В	В	В	В	В	ПТВ	ПТВ	ПТВ
8	ПТВ		ПТВ		ПТВ		ПТВ			ПТВ

Примечание: В — введение варфарина; ПТВ — определение протромбинового времени (определение прекращали при достижении этим показателем контрольной величины)

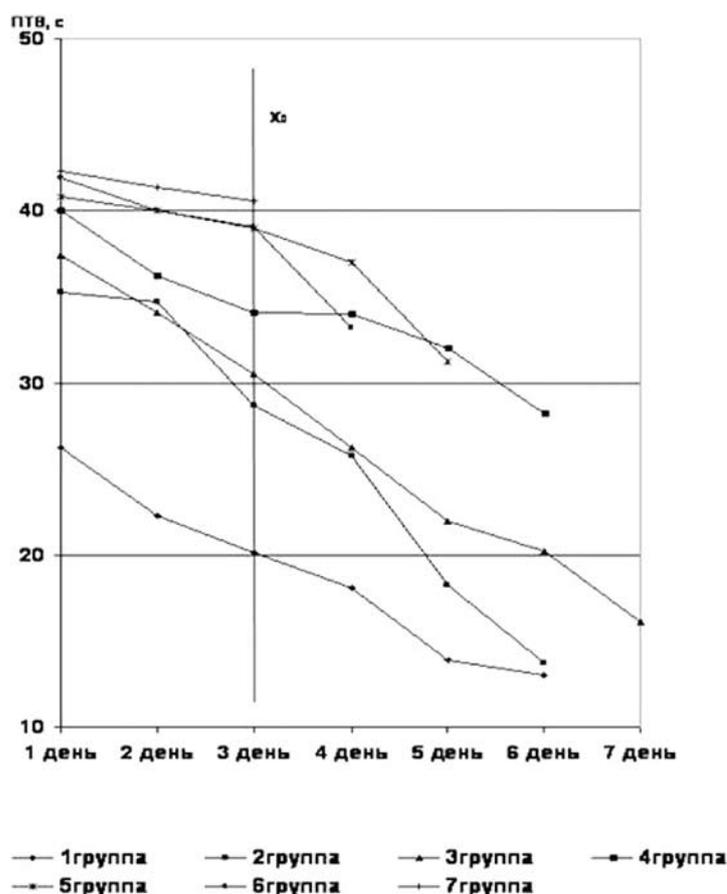
лось равным $26,2 \pm 0,3$ с, что достоверно выше контрольных показателей. Отсутствие эффекта при величине ПТВ $14,3 \pm 0,2$ с) наблюдали у крыс, которым вводили варфарин в дозе $0,004$ мг/кг. При введении крысам варфарина в стандартной дозе $0,4$ мг/кг уже на следующие сутки отмечали носовые кровотечения, а при вскрытии наблюдали многочисленные кровоизлияния в печени, почках, легких и сердце. Влияние на ПТВ варфарина в дозе $0,04$ мг/кг не отличалось достоверно от показателя в контрольной группе, но у животных не выявлено внешних кровотечений, а кровоизлияния во внутренних органах были единичными. Поэтому для дальнейших исследований была выбрана доза варфарина, равная $0,04$ мг/кг.

Результаты 2-го этапа представлены в таблице 2. В ходе 2-го этапа эксперимента ни в одной из групп не как отмечали гибели животных, так и внешних кровотечений на любых сроках введения.

Антикоагуляционные свойства варфарина являются следствием подавления эпоксидредуктазы, необходимой для рециклинга витамина К и деградации К-зависимых факторов свертывания, от скорости которой зависит угнетение коагуляции в кровотоке. Известно, что у человека при увеличении начальной дозы варфарина имеет место ускорение антикоагуляционного действия, а при дальнейшем увеличении дозы полностью исчезает зависимость начала действия от дозы. При этом наблюдается более длительное повышение концентрации препарата в плазме выше уровня, который необходим для подавления синтеза факторов свертывания. Задержка максимального проявления гипопротромбинемического эффекта от одного до трех дней может быть описана моделью, которая основана на соотношении концентрации препарата в плазме к снижению синтеза факторов свертывания [3].

■ Таблица 2. Величина протромбинового времени в секундах при разной продолжительности введения

№№	День после последнего введения						
	1	2	3	4	5	6	7
1	$26,2 \pm 0,2$	$22,3 \pm 0,2$	$20,1 \pm 0,2$	$18,1 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,3$	–
2	$35,3 \pm 0,2$	$34,7 \pm 0,6$	$28,7 \pm 0,3$	$25,8 \pm 0,3$	$18,2 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,2$	–
3	$37,4 \pm 0,3$	$34,1 \pm 0,2$	$30,5 \pm 0,3$	$26,2 \pm 0,2$	$22,0 \pm 0,8$	$20,2 \pm 0,3$	$16,1 \pm 0,1$
4	$40,0 \pm 0,2$	$36,2 \pm 0,2$	$34,1 \pm 0,3$	$34,0 \pm 0,1$	$32,0 \pm 0,2$	$28,2 \pm 0,2$	–
5	$40,8 \pm 0,2$	$40,0 \pm 0,3$	$39,0 \pm 0,1$	$37,0 \pm 0,1$	$31,2 \pm 0,2$	–	–
6	$41,9 \pm 0,2$	$40,0 \pm 0,2$	$39,1 \pm 0,1$	$33,2 \pm 0,1$	–	–	–
7	$42,3 \pm 0,2$	$41,4 \pm 0,2$	$40,6 \pm 0,2$	–	–	–	–
8	$13,0 \pm 0,2$	–	$13,4 \pm 0,5$	–	$13,0 \pm 0,3$	–	$13,2 \pm 0,3$



■ Рисунок 1. Зависимость антикоагуляционного эффекта варфарина от продолжительности введения препарата

В нашем эксперименте мы попытались выяснить зависимость антикоагуляционного эффекта варфарина не от дозы, а от продолжительности введения препарата. На рисунке 1 приведены кривые, отражающие эту зависимость.

При построении графика был осуществлен линейный сдвиг («центровка») вертикальной оси, где откладывалась величина ПТВ в секундах. Таким образом, график отражает ту ситуацию, когда точки, лежащие на самой вертикальной оси соответствуют первому дню максимального эффекта препарата (1-й день снятия данных). В новой системе координат можно достоверно оценить характер зависимости «эффект-продолжительность введения». Обозначив нумерацию кривых в соответствии с номером дня снятия данных, получаем кривую (1), соответствующую слишком быстрому снижению показателя вертикальной оси («грубое» убывание функции). Кривые (2) и (3) по 5 фиксированным значениям (5 дней наблюдения) дают идентичные результаты (обе экспериментальные кривые могут быть аппроксимированы аналогичными зависимостями: квадратичной ($y = ax^2 + bx + c$) со старшим отрицательным коэффициентом или экспоненциальной вида ($y = Ae^{-kx}$ ($k > 0$)) [4]. Кривая (4) соответствует кумуляции препарата и пролонгированию эффекта. Как видно из графика, эта кривая представляется уже «сшивной» функцией

в точке X_0 , где стыкуются обе зависимости. Все кривые, лежащие на графике выше (4), после X_0 резко убывают и пересекают кривую (4), что соответствует окончанию эксперимента.

Таким образом, на основании приведенных экспериментов установлено, что варфарин в дозе 0,04 мг/кг при 4 кратном введении может использоваться в скрининговых исследованиях потенциальных антикоагулянтов непрямого действия в опытах на крысах в качестве референтного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по изучению фармакологических веществ, влияющих на гемостаз // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2-е изд., перераб. и доп. / Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005. — С. 461–476.
2. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Дамов В.В. Лабораторная гематология. — М.: Триада, 2006. — 224 с.
3. Бертрам Г. Катцунг Б. Базисная и клиническая фармакология, Т. 2. — СПб.: Бином, 2007. — 612 с.
4. Фильчаков П.Ф. Численные и графические методы прикладной математики. — Киев: Наукова думка, 1970. — 791 с.
5. Лоскутова З.Ф. Виварий. — М.: Медицина, 1980. — С. 1–93.

**USAGE OF WARFARIN AS A REFERENCE DRUG
IN EXPERIMENTS ON RATS**

Ivkin D. Yu., Buryakina A. V., Stepanova I. L., Ivkina A. S.

◆ **Summary:** The possibility of using indirect anticoagulant warfarin as a reference drug in screening researches on rats was considered in the article. The dose of warfarin leading to true increase of prothrombine time without any internal gemorrhagias in animals has been defined. The optimal terms of administration for warfarin were defined. The dose-dependent regularity of warfarin effect from its duration of administration to rats was revealed.

◆ **Key words:** warfarin; prothrombine time; dose-effect regularity.

◆ Информация об авторах

Ивкин Дмитрий Юрьевич — аспирант кафедры фармакологии. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия МЗ РФ. 199406, Санкт-Петербург, Профессора Попова ул., д. 14. E-mail: ivkin.mail.ru@mail.ru.

Бурякина Анна Вениаминовна — заведующая лабораторией фармакологических исследований. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия МЗ РФ. 199406, Санкт-Петербург, Профессора Попова ул., д. 14. E-mail: bav103@yandex.ru.

Степанова Ирина Леонидовна — Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия МЗ РФ. 199406, Санкт-Петербург, Профессора Попова ул., д. 14.

Ивкина А. С. — Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия МЗ РФ. 199406, Санкт-Петербург, Профессора Попова ул., д. 14.

Ivkin Dmitriy Yuryevich — post-graduate, Department of Pharmacology. Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy. 199406, Saint-Petersburg, Professor Popov St., 14. E-mail: ivkin.mail.ru@mail.ru.

Buryakina Anna Veniaminovna — Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy. 199406, Saint-Petersburg, Professor Popov St., 14. E-mail: bav103@yandex.ru.

Stepanova Irina Leonidovna — Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy. 199406, Saint-Petersburg, Professor Popov St., 14. E-mail: bav103@yandex.ru.

Ivkina A. S. — Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy. 199406, Saint-Petersburg, Professor Popov St., 14. E-mail: bav103@yandex.ru.