

## АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОЙ ЦИКЛОГЕКСИЛАММОНИЕВОЙ СОЛИ НА ОСНОВЕ 1-ЭТИЛКСАНТИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Феликс Хусаинович Камилев, Галия Амировна Тимирханова, Альбина Илдаровна Самородова, Александр Владимирович Самородов\*, Феркат Адельзянович Халиуллин, Данияр Замирович Муратаев

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

### Реферат

**Цель.** Установить биохимический механизм действия на систему гемостаза впервые синтезированной циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-7-(диоксогетанил-3)-1-этил-ксантинил-8-тио]уксусной кислоты в условиях *in vitro*.

**Методы.** Проводили тромбоэластографию образцов цитратной крови здоровых доноров-мужчин. При анализе тромбоэластограмм определяли общую тенденцию коагуляции, функциональную активность тромбоцитов и фибриногена, активность фибринолиза и физико-механические свойства образовавшихся сгустков. Исследование влияния нового производного ксантина и пентоксифиллина на функциональную активность тромбоцитов проводили с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов. Проводили регистрацию аденозиндифосфат-, коллаген-, адреналин-, ристомининдуцированной агрегации тромбоцитов. Оценивали общий характер агрегации, значения максимальной агрегации, максимальной скорости агрегации, средний размер тромбоцитарных агрегатов, активность фактора 3 тромбоцитов, уровень фактора 4 тромбоцитов. Высвобождение факторов тромбоцитов 3 и 4 в процессе агрегации тромбоцитов оценивали после проведения агрегации аденозиндифосфатом и центрифугирования.

**Результаты.** Циклогексиламмониевая соль 2-[3-метил-7-(диоксогетанил-3)-1-этил-ксантинил-8-тио]уксусной кислоты в условиях *in vitro* проявляет антиагрегационную активность, превышающую показатели пентоксифиллина. Установлено, что в присутствии новой циклогексиламмониевой соли отсутствует вторая волна агрегации тромбоцитов, индуцированной малыми дозами аденозиндифосфата, удлиняется lag-период при коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, а также снижается доступность и высвобождение тромбоцитарных факторов 3 и 4.

**Вывод.** Результаты проведенных исследований раскрывают потенциально высокую антиагрегационную активность циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-7-(диоксогетанил-3)-1-этил-ксантинил-8-тио]уксусной кислоты как ингибитора реакции высвобождения тромбоцитов.

**Ключевые слова:** производные 1-этилксантина, система гемостаза, антиагрегационная активность, реакция высвобождения тромбоцитов.

### ANTIAGGREGATORY ACTIVITY OF NEW 1-ETHYLXANTHINE CYCLOHEXYLAMMONIUM SALT *IN VITRO*

F.Kh. Kamilov, G.A. Timirkhanova, A.I. Samorodova, A.V. Samorodov, F.A. Khaliullin, D.Z. Murataev. Bashkir State Medical University, Ufa, Russia. **Aim.** To study the biochemical effect on hemostasis of a new cyclohexilammonium salt of 2-[1-ethyl-3-methyl-7-(dioxotietanyl-3)xantiny-8thio]acetic acid *in vitro*. **Methods.** Thromboelastography was performed using the citrate blood samples of healthy male donors. Global hemostatic effect, fibrinogen and platelet function, fibrinolysis and clot strength, and stability were analyzed at thromboelastography. The impact of firstly synthesized xantine derivative and pentoxifylline on the functional activity of platelets *in vitro* was studied using a laser analyzer of platelet aggregation. Adenosine diphosphate, collagen, epinephrine and ristocetin induced clotting were registered. General clotting characteristics, maximal aggregation values, maximal aggregation speed, mean platelet aggregate size, activity of platelet-derived factor 3, level of platelet-derived factor 4 were measured. Release of platelet-derived factors 3 and 4 at platelet aggregation were assessed after adenosinediphosphate-induced aggregation and centrifugation. **Results.** Cyclohexilammonium salt of 2-[1-ethyl-3-methyl-7-(dioxotietanyl-3)xantiny-8thio]acetic acid *in vitro* showed antiaggregatory activity that exceeds such of pentoxifylline. It has been revealed that the second platelet aggregation wave, that is induced by small dose of adenosinediphosphate, is absent in the presence of the new cyclohexilammonium salt, lag-period in collagen-induced platelet aggregation elongates, and availability and release of platelet-derived factors 3 and 4 decreases. **Conclusion.** The research findings show potentially high antiaggregatory activity of 2-[1-ethyl-3-methyl-7-(dioxotietanyl-3)xantiny-8thio]acetic acid cyclohexilammonium salt as an inhibitor of platelet release reaction. **Keywords:** 1-ethylxantine derivatives, hemostasis system, antiaggregatory activity, platelet release reaction.

Результаты предыдущих собственных исследований демонстрируют потенциально высокую биологическую активность новых производных 1-этилксантина в отношении системы гемостаза. Найдены соединения, проявляющие антиагрегационную активность, превосходящую показатели ряда применяемых в клинической практике антиагрегантов [2]. Данное исследование является продолжением поиска потенциальных антиагрегантов среди производных данного класса и посвящено определению биохимического механизма антиагрегационной активности циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-7-(диоксогетанил-3)-1-этил-ксантинил-8-тио]уксусной кислоты (соединение I) в условиях эксперимента [3].

Экспериментальная работа в условиях *in vitro* выполнена на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18–24 лет. Забор крови проводили из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови «BD Vacutainer®» («Dickinson and Company», США). В качестве стабилизатора венозной крови использовали 3,8% раствор натрия цитрата в соотношении 9:1 [4].

Все тесты проводили на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазме. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 100 g в течение 10 мин, бестромбоцитарной плазмы – при 300 g в течение 15 мин. В работе использовали центрифугу «ОПН-3.02» (Россия).

Тромбоэластографию проводили на аппарате

«TEG 5000» («Haemoscope Corporation», США) на образцах цитратной крови. При анализе тромбоэластограмм определяли общую тенденцию коагуляции (индекс тромбодинамического потенциала, время формирования сгустка до максимальной прочности), функциональную активность тромбоцитов и фибриногена (наибольшее расхождение ветвей тромбоэластограммы, угловая константа), активность фибринолиза (индекс лизиса сгустка цельной крови, показатель фибринолиза в течение 30 мин, время лизиса сгустка) и физико-механические свойства образовавшихся сгустков (фактическая мера прочности сгустка, изменение модуля силы упругости) [6].

Исследование влияния соединения I и пентоксифиллина на агрегацию тромбоцитов в условиях *in vitro* на донорской крови человека осуществляли с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «Биола 230 LA» (Москва). Интенсивность агрегации оценивали по динамике изменения светопропускания плазмы при добавлении к ней индукторов агрегации по методу G. Born и по дина-

казателей каолинового времени рекальцификации обогащённой и бестромбоцитарной плазмы характеризует активность фактора P3 в плазме. Высвобождение фактора P3 в процессе агрегации тромбоцитов оценивали тем же методом после проведения агрегации АДФ и центрифугирования [1].

Определение фактора 4 тромбоцитов (P4) осуществляли по действию прогретой бедной тромбоцитами плазмы на тромбин-гепариновое время свёртывания методом Л.А. Матвиенко и М.А. Котовской. Высвобождение фактора P4 в процессе агрегации тромбоцитов оценивали тем же методом после проведения агрегации АДФ и центрифугирования [1].

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета Statistica 8,0 («StatSoft Inc», США). Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для описания групп использованы медиана и межквартильный интервал. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Критический

Таблица 1

Показатели тромбоэластографии пентоксифиллина и соединения I на цитратной крови

Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	p <sub>1</sub>	Соединение I	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
SP, мин	8,7 (5,7–9,6)	8,4 (7,5–9,3)	0,8	13,6 (11,1–15,2)	0,003	0,005
Angle, градус	44,7 (39,8–52,4)	43,9 (40,9–47,8)	0,8	47,4 (43,6–49)	0,6	0,8
MA, мм	57,3 (51,2–63,2)	42,7 (41,6–44,3)	0,0002	26,8 (23,6–28,4)	0,00001	0,001
G, дин/см <sup>2</sup>	6,7 (4,5–8,1)	4,8 (3,9–5,4)	0,04	2,9 (2,3–3,4)	0,0007	0,03
E, дин/см <sup>2</sup>	148,9 (134,4–64,8)	127,1 (120,9–131,6)	0,02	79,4 (77,4–83,2)	0,0001	0,0005
TPI, в секунду	11,7 (8,5–14,6)	7,9 (6,2–8,3)	0,03	5,7 (4,9–6,3)	0,000002	0,1
TMA, мин	27,1 (22,3–32,1)	31,9 (29,8–33,1)	0,001	42,6 (41,2–44,7)	0,0001	0,0004
CLT, мин	38,7 (35,4–42,4)	36,2 (31,2–38,7)	0,6	37,4 (35,7–37,8)	0,7	0,6
LY30, %	3,7 (3,1–4,8)	3,1 (2,7–3,3)	0,9	3,3 (3,1–3,9)	0,8	0,3
CL30, %	96,6 (89,6–101,3)	96,8 (94,2–99,1)	0,4	96,7 (93,4–99,8)	0,2	0,6

Примечание. Представлены медиана и межквартильный интервал, n=7. Уровень статистической значимости различий: p<sub>1</sub> – группы пентоксифиллина в сравнении с контролем, p<sub>2</sub> – группы соединения I в сравнении с контролем, p<sub>3</sub> – группы пентоксифиллина в сравнении с группой соединения I. SP – скорость образования тромбопластина; Angle – угловая константа, то есть угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка; MA – наибольшее расхождение ветвей тромбоэластограммы; G – изменение модуля силы упругости; E – фактическая мера прочности сгустка; TPI – индекс тромбодинамического потенциала; TMA – время формирования сгустка до максимальной прочности; CLT – время лизиса сгустка; LY30 – показатель фибринолиза в течение 30 мин; CL30 – индекс лизиса сгустка цельной крови.

мике изменения размеров образующихся агрегатов [5, 7]. В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 и 5 мкг/мл, коллаген в концентрации 5 мг/мл, эпинефрин (адреналин) в концентрации 5 мкг/мл и ристомидин в концентрации 10 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (Россия, Барнаул). Анализ агрегатограмм проводили с использованием программного обеспечения AGGR с учётом следующих показателей: общий характер агрегации (одноволновая, двухволновая; полная, неполная обратимая, необратимая), значения максимальной агрегации, максимальной скорости агрегации (tg α), средний размер тромбоцитарных агрегатов в относительных единицах.

Определение активности фактора 3 тромбоцитов (P3) проводили по методу V. Rabiner. Разница по-

уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05.

Результаты исследования влияния соединения I и пентоксифиллина на систему гемостаза методом тромбоэластографии представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что показатель максимальной агрегации, характеризующий функциональную активность тромбоцитов, в группе соединения I в 2,1 и 1,6 раза меньше, чем в группах контроля и пентоксифиллина соответственно. Показатели прочности сгустка (изменение модуля силы упругости и фактическая мера прочности сгустка) снижены в группе соединения I в 1,5 раза и 1,6 раза в сравнении с пентоксифиллином. На показатели активности плазменного звена гемостаза и фибринолиза действие соединения I и пентоксифиллина не регистрировалось.

Таблица 2

**Показатели антиагрегационной активности пентоксифиллина и соединения I при индуктор-индуцированной агрегации тромбоцитов**

Вещество	Подавление агрегации тромбоцитов, % к контролю					
	Соединение I			Пентоксифиллин		
Концентрация, М/л	4×10 <sup>-3</sup>	2×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>	4×10 <sup>-3</sup>	2×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>
АДФ, 20 мкг/мл	100,0 (100,0–100,0), p <sub>1</sub> <0,0001, p <sub>2</sub> <0,001	80,7 (36,2–100,0), p <sub>1</sub> =0,002, p <sub>2</sub> =0,0001	29,8 (25,6–31,2), p <sub>1</sub> =0,0003, p <sub>2</sub> <0,001	63,7 (58,9–9,2), p <sub>1</sub> <0,0001	48,4 (42,7–56,5), p <sub>1</sub> <0,00005	12,7 (10,5–15,6), p <sub>1</sub> <0,006
Вторая волна агрегации тромбоцитов при действии АДФ, 5 мкг/мл	–	–	–	+	+	+
Коллаген, 5 мг/мл	100,0 (100,0–100,0), p <sub>1</sub> <0,00001, p <sub>2</sub> <0,00001	100,0 (100,0–100,0), p <sub>1</sub> <0,00001, p <sub>2</sub> <0,00001	20,4 (16,7–24,1), p <sub>1</sub> =0,001, p <sub>2</sub> =0,0007	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Эпинефрин (адреналин), 5 мкг/мл	30,8 (27,4–33,5), p <sub>1</sub> <0,001, p <sub>2</sub> <0,0001	23,7 (19,6–26,5), p <sub>1</sub> <0,0001, p <sub>2</sub> <0,0001	12,1 (9,8–14,5), p <sub>1</sub> =0,002, p <sub>2</sub> =0,003	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Ристомицин, 10 мг/мл	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание. Представлены медиана и межквартильный интервал, n=7. АДФ – аденозиндифосфат; p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контрольной группой; p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости различий признаков групп пентоксифиллина и соединения I.

Таблица 3

**Влияние пентоксифиллина и соединения I в концентрации 2×10<sup>-3</sup> М/л на показатели реакции высвобождения тромбоцитов**

Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	p	Соединение I	p
Тромбоцитарный фактор 3, %	81,7 (77,4–86,2)	79,8 (76,4–83,5)	p1=0,3	67,9 (64,5–73,2)	p <sub>1</sub> =0,004, p <sub>2</sub> =0,005
Тромбоцитарный фактор 3 после АДФ, %	91,7 (87,3–96,2), p <sub>3</sub> =0,01	87,8 (83,5–92,3) p <sub>3</sub> =0,02	p <sub>1</sub> =0,4	68,1 (65,4–70,2) p <sub>3</sub> =0,3	p <sub>1</sub> =0,001, p <sub>2</sub> =0,002
Тромбоцитарный фактор 4, с	3,2 (2,9–3,1)	3,6 (2,8–3,9)	p1=0,7	1,7 (1,1–2,4)	p <sub>1</sub> =0,0002, p <sub>2</sub> =0,0001
Тромбоцитарный фактор 4 после АДФ, с	2,4 (2,2–3,4), p <sub>3</sub> =0,06	2,6 (2,3–3,1), p <sub>3</sub> =0,07	p1=0,7	1,6 (1,1–2,0), p <sub>3</sub> =0,4	p <sub>1</sub> =0,01, p <sub>2</sub> =0,002
Lag-период при коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, с	61,3 (59,7–64,1)	62,8 (61,4–66,7)	0,3	86,3 (77,4–91,5)	p <sub>1</sub> <0,01, p <sub>2</sub> <0,001

Примечание. Представлены медиана и межквартильный интервал, n=7; p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контрольной группой; p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости различий признаков групп пентоксифиллина и соединения I, p<sub>3</sub> – уровень статистической значимости различий признаков групп при действии аденозиндифосфата (АДФ).

Результаты исследования влияния соединения I и пентоксифиллина на индуктор-индуцированную агрегацию тромбоцитов представлены в табл. 2. Установлено, что соединение I превосходит препарат сравнения (пентоксифиллин) как по уровню, так и по спектру антиагрегационной активности. При этом в присутствии соединения I в концентрации 4×10<sup>-3</sup> М/л полностью подавляется агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ. В концентрациях 2×10<sup>-3</sup> и 10<sup>-3</sup> М/л отсутствует вторая волна агрегации тромбоцитов.

При коллаген-индуцированной агрегации

тромбоцитов, регистрируемой в присутствии соединения I (табл. 3), отмечено выраженное удлинение lag-фазы. В присутствии пентоксифиллина эффект удлинения lag-фазы не зарегистрирован.

Следующим этапом определили активность факторов P3 и P4 в присутствии соединения I и препарата сравнения – пентоксифиллина (см. табл. 3).

Из данных табл. 3 видно, что в присутствии пентоксифиллина в концентрации 2×10<sup>-3</sup> М/л показатели активности P3 и P4 тромбоцитов остаются на уровне контрольных значений. Полученные экспериментальные данные полностью соотносятся с ме-

ханизмом действия и биологической активностью пентоксифиллина. В присутствии соединения I активность тромбоцитарных факторов P3 и P4 статистически значимо снижается. При действии агониста агрегации тромбоцитов АДФ активность P3 и P4 остаётся на уровне исходных значений. Это свидетельствует о нарушении доступности (высвобождения) P3 и P4 в процессе агрегации тромбоцитов.

Таким образом, установлены отсутствие второй волны агрегации тромбоцитов, индуцированной малыми дозами АДФ, удлинение lag-периода при коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, а также снижение доступности и высвобождения P3 и P4.

### ВЫВОД

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о действии соединения I как потенциального ингибитора реакции высвобождения тромбоцитов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза. – Минск: Беларусь, 1983. – 267 с.

2. Камиллов Ф.Х., Тимирханова Г.А., Самородова А.И. и др. Поиск активных соединений среди производных 2-[3-метил-1-этил-7-(диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты, влияющих на систему гемостаза // *Фундаментал. исслед.* – 2011. – Т. 9, №2. – С. 254–256.

3. Камиллов Ф.Х., Тимирханова Г.А., Самородов А.В. и др. Поиск активных соединений среди производных азотсодержащих гетероциклов, влияющих на систему гемостаза // *Фундаментал. исслед.* – 2011. – №3. – С. 61–66.

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 327 с.

5. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature.* – 1962. – Vol. 194. – P. 927–929.

6. Cotton B.A., Faz G., Hatch Q.M. Rapid thrombelastography delivers real-time results that predict transfusion within 1 hour of admission // *J. Trauma.* – 2011. – Vol. 71, N 2. – P. 407–414.

7. Gabbasov Z.A. The use of optical density fluctuations for determination of platelet concentration in stirred suspension // *Platelets.* – 1992. – Vol. 3. – P. 281–282.

УДК 612.821.44: 612.084: 615.214.2: 615.9: 616.8-009.831: 616.153

НО13

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМЕ У КРЫС

Вадим Анатольевич Кашуро<sup>1</sup>, Екатерина Геннадьевна Батоцыренова<sup>1\*</sup>,  
Наталья Львовна Елаева<sup>1</sup>, Юлия Николаевна Савенко<sup>2</sup>, Наталья Вадимовна Лапина<sup>1</sup>,  
Владимир Владимирович Аксёнов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт токсикологии, г. Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург,

<sup>3</sup>Военно-медицинская академия, г. Санкт-Петербург

### Реферат

**Цель.** Экспериментальное изучение изменения содержания нейротрофических факторов в зависимости от стадии интоксикации веществами депримирующего действия (этанолом или натрия оксибутиратом).

**Методы.** Экспериментальные исследования выполнены на белых беспородных крысах-самцах. В контрольной и каждой из экспериментальных групп было по 10 животных. Введение депримирующего агента (этанола или натрия оксибутирата) производили внутривенно в полудозной дозе за 3, 6, 12, 24 и 72 ч до взятия крови. В плазме крови животных определяли концентрацию нейронспецифической енолазы, белка S-100, нейротрофического фактора головного мозга, пигментного фактора эпителиального происхождения, глиального фибриллярного кислого протеина методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** При однократном воздействии натрия оксибутирата в среднелегальной дозе через 6 ч после введения препарата концентрация белка S-100 в плазме крови достоверно увеличивалась по сравнению с контролем и держалась на высоком уровне до окончания первых суток действия препарата. Через 3 и 6 ч после действия препарата достоверно повышался уровень нейротрофического и нейропротективного фактора. При введении крысам этанола в токсической дозе через 3 ч происходило достоверное увеличение концентрации белка S-100 более чем в 1,8 раза по сравнению с контролем. Максимальное увеличение содержания белка S-100 более чем в 2,6 раза отмечено через 12 ч после введения токсиканта. Через 3 ч после введения этанола содержание глиального фибриллярного кислого протеина по сравнению с контролем было повышено в 2,9 раза, а через 6 ч – в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ). Концентрация нейротрофического фактора также возрастала в период с 3 до 12 ч после введения токсиканта: с 2,1 до 2,4 раза по сравнению со значениями у интактных животных.

**Вывод.** Развитие гипоксии, сопровождающей коматозное состояние, приводит к повышению содержания в плазме белка S-100, нейротрофического фактора головного мозга и глиального фибриллярного кислого протеина; повышение концентрации глиального фибриллярного кислого протеина в опытах с этанолом может свидетельствовать о более тяжёлом поражении тканей головного мозга по сравнению с этанолом и натрия оксибутиратом.

**Ключевые слова:** нейротрофические факторы, натрия оксибутират, этанол.

Адрес для переписки: VKATERINA2009@yandex.ru