ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИКЛОГЕКСИЛАММОНИЕВОЙ СОЛИ 2-[3-МЕТИЛ-1-Н-ПРОПИЛ-7-(1,1- ДИОКСОТИЭТАНИЛ-3)КСАНТИНИЛ-8-ТИО] УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Феликс Хусаинович Камилов, Галия Амировна Тимирханова, Альбина Илдаровна Самородова*,
Феркат Адельзянович Халиуллин, Регина Амуровна Губаева

Бакирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Реферат

Цель. Изучить системную гемостатическую активность впервые синтезированной циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-1-н-пропил-7-(1,1-диоксотиеганил-3)ксантини-8-тио] уксусной кислоты в условиях эксперимента *in vitro* и *in vivo*.

Методы. Экспериментальная работа в условиях *in vitro* выполнена на крови здоровых доноров-мужчин, в условиях *in vivo* — при внутрибрюшинном введении крысам-самцам эквивалентных концентраций изучаемых веществ. Исследование влияния впервые синтезированного производного ксантина и этамзилата на функциональную активность тромбоцитов в условиях *in vitro* и *in vivo* проводили с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «Биола 230 LA» (Россия). В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (Россия). Анализ агрегатограмм проводили с использованием программного обеспечения AGGR. Оценивали общий характер агрегации, значение максимальной агрегации, максимальной скорости агрегации, средний размер тромбоцитарных агрегатов. Экспериментальную оценку специфической системной гемостатической активности в условиях *in vivo* проводили с использованием модели паренхиматозного кровотечения на половозрелых крысах-самцах. Во время вмешательства регистрировали время остановки кровотечения и объем кровопотери.

Результаты. Циклогексиламмониевая соль 2-[3-метил-1-н-пропил-7-(1,1-диоксотиеганил-3)ксантини-8-тио] уксусной кислоты оказывала проагрегантное действие как *in vitro*, так и *in vivo*. Проагрегантный эффект новой циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-1-н-пропил-7-(1,1-диоксотиеганил-3)ксантини-8-тио] уксусной кислоты успешно реализовался в системную гемостатическую активность в условиях паренхиматозного кровотечения, превышая показатели контрольной группы и группы этамзилата.

Вывод. Результаты проведенных исследований раскрывают потенциально высокую системную гемостатическую активность циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-1-н-пропил-7-(1,1-диоксотиеганил-3)ксантини-8-тио] уксусной кислоты, убеждая в необходимости дальнейшего изучения данного соединения и его аналогов для создания на их основе высокоэффективных селективных корректоров системы гемостаза.

Ключевые слова: производные ксантина, система гемостаза, проагрегантная активность, гемостатическая активность.

FEATURES OF HEMOSTATIC ACTIVITY OF 2-[3-METHYL-1-H-PROPYL-7-(1,1-DIOXOTIETHANYL-3) XANTINYL-8-THIO] ACETIC ACID CYCLOHEXILAMMONIUM SALT F.Kh. Kamilov, G.A. Timirkhanova, A.I. Samorodova, F.A. Khaliullin, R.A. Gubaeva. Bashkir State Medical University, Ufa, Russia. **Aim.** To study the systemic hemostatic activity of firstly synthesized 2-[3-methyl-1-h-propyl-7-(1,1-dioxotiethanyl-3) xantiny-8-thio] acetic acid cyclohexilammonium salt *in vitro* and *in vivo*. **Methods.** Experiments *in vitro* using the blood samples from healthy male donors, and *in vivo* on male rats by intraperitoneal injection of the equimolar concentrations of researched substances. The effect of the firstly synthesized xantine and etamsylate derivative on the platelet functional activity *in vitro* and *in vivo* was studied using a platelet aggregation laser analyzer «Biola 230 LA» (Russia). 20 mg/ml of adenosinediphosphate and 5 mg/ml of collagen (produced by «Technologia-Standart» company, Russia) were used as an aggregation inducers. Aggregation was analyzed using the AGGR software. General aggregation parameters, maximal aggregation value, maximal aggregation speed, average size of platelet aggregates were analyzed. Experimental assessment of specific systemic hemostatic activity *in vivo* was made in accordance with the parenchymal hemorrhage model on mature male rats. Coagulation time and blood loss volume were registered. **Results.** 2-[3-Methyl-1-h-propyl-7-(1,1-dioxotiethanyl-3) xantiny-8-thio] acetic acid cyclohexilammonium salt showed a pro-aggregative effect both *in vitro* and *in vivo*. 2-[3-Methyl-1-h-propyl-7-(1,1-dioxotiethanyl-3) xantiny-8-thio] acetic acid cyclohexilammonium salt pro-aggregative effect which was observed both *in vitro* and *in vivo* increased the systemic hemostatic activity, exceeding the results of the control group and etamsylate group. **Conclusion.** The findings reveal potentially high systemic hemostatic activity of 2-[3-methyl-1-h-propyl-7-(1,1-dioxotiethanyl-3) xantiny-8-thio] acetic acid cyclohexilammonium salt and confirm the need for further studies of this compound and its equivalents in order to create highly effective selective hemostasis correctors on their basis. **Keywords:** xantine derivatives, hemostatic system, pro-aggregate activity, hemostatic activity.

Из всех критических состояний, возникающих в практической медицине, наиболее грозными и опасными остаются кровотечения [9]. Последствия кровотечения — геморрагический шок, синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания, синдром массивной

гемотрансфузии, ишемия жизненно важных органов и другие — либо бывают фатальными, либо значительно осложняют течение и исход основного заболевания. Одно из направлений поиска новых методов профилактики кровотечения — разработка средств фармакологической коррекции системы гемостаза. Препараты для остановки кровотечений, традиционно применяемые в медицинской практике, недостаточ-

но эффективны и не способны привести к ответственному снижению кровопотери [5, 7, 8].

Результаты предыдущих собственных исследований демонстрируют потенциально высокую активность некоторых новых производных ксантина в отношении системы гемостаза в условиях *in vitro* [1].

Данное исследование посвящено дальнейшему изучению системной гемостатической активности циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-1-н-пропил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио] уксусной кислоты в условиях эксперимента [2].

Вся исследовательская работа, согласно [3], проведена в два этапа:

- изучение фармакологической активности циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-1-н-пропил-7-(1,1-диоксотетанил-3)ксантинил-8-тио] уксусной кислоты (соединение I) в условиях *in vitro*;

- определение эффективности соединения I в контролируемых (модельных) условиях эксперимента *in vivo* при внутрибрюшинном введении крысам.

Экспериментальная работа в условиях *in vitro* выполнена на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет. К исследованию не допускали кровь добровольцев с тяжелой соматической, онкологической патологией, эндокринными, острыми и хроническими инфекционными заболеваниями, курящих, употреблявших накануне исследования алкоголь и лекарственные препараты (в том числе антибиотики, антиагреганты, антикоагулянты и др.). 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.

Исследование влияния на систему гемостаза в условиях *in vivo* проводили при внутрибрюшинном введении крысам данных веществ в эквивалентной концентрации, которая для этамзилата составляла 38,1 мг/кг, для соединения I — 72,1 мг/кг. Между инъекцией исследуемого вещества и забором крови проходил 1 ч. Животных наркотизировали диэтиловым эфиром и фиксировали на препаровальном столике, далее проводили забор крови из яремной вены в пробирки с 3,8% раствором натрия цитрата в соотношении 9:1.

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

Исследование влияния соединения I и этамзилата на функциональную активность тромбоцитов как *in vitro*, так и *in vivo* проводили с помощью лазерного анализатора агрегации

тромбоцитов «Биола 230 LA» (Россия). Интенсивность агрегации оценивали по динамике изменения светопропускания плазмы при добавлении к ней индукторов агрегации по методу G. Born [4] и по динамике изменения размеров образующихся агрегатов [6]. В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (Россия). Анализ агрегатограмм проводили с использованием программного обеспечения AGGR с учетом следующих показателей: общий характер агрегации (одноволновая, двухволновая; полная, неполная обратимая, необратимая), значение максимальной агрегации и максимальной скорости агрегации (tg α), средний размер тромбоцитарных агрегатов в относительных единицах.

Экспериментальную оценку специфической системной гемостатической активности *in vivo* осуществляли на половозрелых крысах-самцах массой от 190 до 220 г. Препараты вводили внутрибрюшинно за 1 ч до моделирования паренхиматозного кровотечения. Затем под эфирным наркозом проводили срединную лапаротомию, выводили в рану переднюю поверхность печени. С использованием специального ограничителя проводили резекцию печени (для получения одинаковых объема, формы и размеров). Образовавшаяся рана представляла собой эллипс площадью 2,5 см², её глубина составляла 0,3 см. Раневую поверхность плотно осушали марлевой салфеткой до наступления окончательного гемостаза. Во время вмешательства отмечали время остановки кровотечения и объем кровопотери. Величину кровопотери определяли гравиметрическим методом (взвешивание пропитанного кровью марлевого материала на электронных весах) и рассчитывали по А.С. Либову [3].

Экспериментальные исследования с участием лабораторных животных проводили согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96, ГОСТР 50258-92) и приказу Минздрава России №708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP — от англ. Good Laboratory Practice).

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета «Statistica 10,0» (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 уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05.

Результаты исследования проагрегантной активности в условиях *in vitro* представлены в табл. 1.

В результате экспериментальной работы

Таблица 1

Показатели аденозиндифосфат(АДФ)-индуцированной и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов под действием этамзилата и соединения I в условиях *in vitro*

Шифр	Концентрация, моль/л	Спонтанная агрегация тромбоцитов, % к контролю	Усиление АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, % к контролю	Усиление коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, % к контролю
Этамзилат	2×10^{-3}	22,1 (20,7–25,2)	3,7 (1,5–5,9)	4,3 (2,2–6,9)
	10^{-3}	10,2 (7,4–13,5)	4,2 (2,1–6,3)	5,3 (3,1–8,6)
	$0,5 \times 10^{-3}$	2,9 (1,2–5,7)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Соединение I	2×10^{-3}	0,0 (0,0–0,0)	8,5 (6,7–10,5)	9,7 (7,4–11,5)
		p=0,00058	p=0,006	p=0,0045
	10^{-3}	0,0 (0,0–0,0)	5,1 (3,4–7,3)	7,1 (5,2–10,3)
		p=0,0064	p=0,013	p=0,0034
	$0,5 \times 10^{-3}$	0,0 (0,0–0,0)	2,3 (1,4–3,7)	4,2 (2,9–6,3)
		p=0,001	p=0,00002	p=0,0001

Примечание: представлены медиана и межквартильный интервал (n=7); p – уровень статистической значимости различий признаков групп этамзилата и соединения I.

установлено, что введение 2×10^{-3} моль/л соединения I в кювету агрегометра за 5 мин до индукторов приводит к усилению агрегации тромбоцитов в среднем на 8,5%, что в 2 раза превышает показатели этамзилата. При изучении зависимости «доза-эффект» установлено, что при концентрации 5×10^{-4} моль/л соединения I агрегация тромбоцитов усиливалась в среднем на 2,3%. В данной концентрации проагрегантная активность этамзилата не регистрируется. Следует отметить, что предварительная инкубация препарата сравнения (этамзилата) индуцировала спонтанную агрегацию тромбоцитов. Данный эффект отсутствовал при исследовании соединения I.

При определении проагрегантной активности при внутривенном введении этамзилата и соединения I установлено, что полученные результаты в условиях *in vivo* по спектру проагрегантной активности полностью соотносятся с данными, полученными на этапе *in vitro* (табл. 2). Максимальная агрегация тромбоцитов на обоих индукторах в присутствии соединения I превышала показатели этамзилата в среднем на 11,8%. Значительно изменялась скорость агрегации тромбоцитов в присутствии соединения I – увеличивалась на 27,6% относительно контроля и на 25,4% в сравнении с этамзилатом. Следует отметить, что средний радиус тромбоцитарных агрегатов в присутствии соеди-

Таблица 2

Показатели аденозиндифосфат(АДФ)-индуцированной и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов при внутривенном введении этамзилата и соединения I

Показатель	Контроль	Этамзилат	Соединение I	p ₂
Коллаген, мм	55,9 (53,8–58,1)	67,9 (64,2–69,3) p ₁ =0,0003	75,9 (75,3–76,4) p ₁ =0,00007	0,0002
СРТА (коллаген), о.е.	6,5 (6,2–6,7)	9,1 (7,8–11,4) p ₁ =0,0012	11,6 (11,1–11,9) p ₁ =0,0005	0,2
tg α (коллаген), с	36,5 (34,3–38,2)	37,2 (35,7–38,6) p ₁ =0,02	46,6 (45,4–47,3) p ₁ =0,00034	0,0048
АДФ, мм	54,1 (50,6–57,4)	67,1 (64,9–68,6) p ₁ =0,00081	77,5 (76,7–79,4) p ₁ =0,00017	0,0037
СРТА (АДФ), о.е.	6,3 (6,2–7,1)	7,6 (7,2–8,3) p ₁ =0,0002	8,8 (8,5–9,0) p ₁ =0,00075	0,1
tg α (АДФ), с	42,7 (40,2–44,9)	46,4 (45,9–47,1) p ₁ =0,001	54,8 (53,1–55,9) p ₁ =0,0008	0,0061

Примечание: представлены медиана и межквартильный интервал (n=7); СРТА – средний размер тромбоцитарных агрегатов в относительных единицах (о.е.); tg α – максимальная скорость агрегации; p₁ – уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контрольной группой; p₂ – уровень статистической значимости различий признаков групп, получавших этамзилат и соединение I.

Показатели гемостатической активности этамзилата и соединения I при внутрибрюшинном введении крысам

Препарат	Контроль	Этамзилат	Соединение I
Время кровотечения, с	97,9 (91,2–99,1)	71,9 (70,6–73,4) $p_1=0,0016$	64,2 (62,7–65,4) $p_1=0,000073$ $p_2=0,0104$
Разница в массе салфеток, г	7,6 (7,4–8,1)	6,9 (5,5–7,1) $p_1=0,23$	4,1 (3,8–4,3) $p_1=0,00002$ $p_2=0,0001$

Примечание: представлены медиана и межквартильный интервал ($n=7$); p_1 – уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контрольной группой; p_2 – уровень статистической значимости различий признаков групп, получавших этамзилат и соединение I.

нения I превышал контроль в среднем на 35%, группу этамзилата – на 25%. Таким образом, по всем показателям, измеряемым анализатором агрегации тромбоцитов, соединение I статистически значимо превосходило препарат сравнения (этамзилат).

Результаты исследования системной гемостатической активности на модели паренхиматозного кровотечения у крыс представлены в табл. 3. Этамзилат при внутрибрюшинном введении крысам в сравнении с контрольной группой достаточно эффективно снижал время остановки кровотечения, не оказывая существенного влияния на общий объём кровопотери. Соединение I проявляло выраженную гемостатическую активность, превышающую показатели контрольной группы и группы этамзилата.

Таким образом, соединение I проявляет исключительно проагрегантную активность в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*, превышающую показатели препарата сравнения (этамзилата). При этом спонтанная агрегация тромбоцитов в присутствии этамзилата достигала в среднем 22,1% относительно контроля, а индуктор-индуцированная агрегация независимо от вида индуктора увеличивалась не более чем на 5% относительно контроля. Это позволяет сделать вывод, что в момент индуцированной агрегации соединение I оказывает более избирательное действие на активированные тромбоциты в отличие от препарата сравнения, основной эффект которого приходится на интактные тромбоциты, тем самым потенциально повышая риск тромбообразования, с одной стороны, и оставаясь неэффективным в момент кровотечения, с другой [5, 7, 8]. Результаты исследования гемостатической активности этамзилата и соединения I с применением модели паренхиматозного кровотечения подтверждают эти данные: этамзилат статистически значимо укорачивает время кровотечения, не оказывая влияния на объём кровопотери. Соединение I выигрышно снижает оба определяемых показателя, демонстрируя выраженный системный гемостатический эффект.

ВЫВОД

Результаты проведённых исследований раскрывают потенциально высокую системную гемостатическую активность циклогексиламмониевой соли 2-[3-метил-1-*n*-пропил-7-(1,1-диоксотетил-3)ксантинил-8-тио] уксусной кислоты и убеждают в необходимости дальнейшего изучения данного соединения и его аналогов для создания на их основе высокоэффективных селективных корректоров системы гемостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камилев Ф.Х., Тимирханова Г.А., Самородова А.И. и др. Поиск активных соединений среди производных 2-[3-метил-1-этил-7-(диоксотетил-3)ксантинил-8-тио] уксусной кислоты, влияющих на систему гемостаза // *Фундамент. исслед.* – 2011. – №9. – С. 254–256.
2. Камилев Ф.Х., Тимирханова Г.А., Самородов А.В. и др. Соли [3-метил-1-*n*-пропил-7-(1,1-диоксотетил-3)ксантинил-8-тио] уксусной кислоты, проявляющие проагрегантную активность. Патент на изобретение №2459825. Бюлл. №24 от 27.08.2012.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 327 с.
4. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature*. – 1962. – Vol. 194. – P. 927–929.
5. Elbourne D.S. Randomised controlled trial of prophylactic etamsylate: follow up at 2 years of age // *NY Acad. Sci.* – 1987. – Vol. 205. – P. 9–13.
6. Gabbasov Z.A. The use of optical density fluctuations for determination of platelet concentration in stirred suspension // *Platelets*. – 1992. – Vol. 3. – P. 281–282.
7. Keith I. Ethamsylate and blood loss in total hip replacement // *Anaesthesia*. – 1979. – Vol. 34, N 7. – P. 666–670.
8. Schulte J., Osborne J., Benson J.W. et al. Developmental outcome of the use of etamsylate for prevention of periventricular haemorrhage in a randomised controlled trial // *Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal. Ed.* – 2005. – Vol. 90, N 1. – P. 31–35.
9. Spahn D.R. Severe bleeding in surgical and trauma patients: the role of fibrinogen replacement therapy // *Thromb. Res.* – 2012. – Vol. 130, N 2. – P. 15–19.