

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 4-ГИДРОКСИ – 3,5-ДИТРЕТБУТИЛ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ (АТАСЛ), МЕКСИДОЛА И ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА АНТИТРОМБОТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСТАВА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В.**

*Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, e-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru*

В исследовании отражена сравнительная оценка действия мексидола, тиоктовой кислоты и АТАСЛ на антитромботическую функцию эндотелия и некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных на фоне фокальной ишемии головного мозга. Антитромботическую функцию эндотелия оценивали по способности тромбоцитов к агрегации (определяли степень, скорость и показатель агрегации тромбоцитов), уровню фактора фон Виллебранда, продолжительности свертывания крови. Оценивали гематологические показатели: количество лейкоцитов, лейкоформула, количество эритроцитов, содержание гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцита, концентрация гемоглобина в одном эритроците, содержание тромбоцитов. Полученные в ходе исследования данные показывают, что на фоне фокальной ишемии головного мозга развивается дисфункция эндотелия мозговых сосудов, сопровождаемая повышением степени (в 1,97 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ЛО крысами), скорости и показателя агрегации тромбоцитов, уровня фактора фон Виллебранда (на 42,4% ( $p < 0,001$ )), продолжительности свертывания крови, со снижением содержания гемоглобина и умеренным лейкоцитозом. Применение исследуемых соединений оказало положительное влияние на антитромботическую функцию эндотелия. Так, при применении мексидола, тиоктовой кислоты и АТАСЛ степень агрегации тромбоцитов уменьшилась в 1,6, 1,44, 1,74 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно, таким образом, у исследуемых соединений можно предполагать наличие эндотелиопротекторных свойств. Сопоставляя полученные экспериментальные данные по степени возрастания данного вида фармакологической активности, анализируемые вещества можно расположить в ряд: АТАСЛ > тиоктовая кислота  $\geq$  мексидол.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, антитромботическая функция эндотелия, мексидол, тиоктовая кислота.

## **COMPARATIVE ASSESSMENT OF 4-HYDROXY - 3,5-DI TERT BUTYL CINNAMIC ACID (ATACL), MEXIDOL AND THIOCTIC ACID ON ENDOTHELIAL FUNCTION AND ANTITHROMBOTIC SOME INDICATORS OF THE PERIPHERAL BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS ON THE BACKGROUND OF FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA**

**Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Mamleyev A.V.**

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of Medical University, Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, e-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru*

This study reflects the comparative evaluation of the action mexidol, thioctic acid and ATACL on antithrombotic endothelial function and some indicators of peripheral blood of experimental animals on the background of focal cerebral ischemia. Antithrombotic endothelial function was assessed by the ability of platelet aggregation (measured degree speed and the platelet aggregation), the level of von Willebrand factor, blood coagulation duration. Haematological parameters evaluated: white blood cell count, leykoformula, the number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, hemoglobin concentration in a single red blood cell, platelet count. The findings of the study data show that in the context of focal cerebral ischemia developing endothelial dysfunction of cerebral vessels, accompanied by an increase in the degree (in 1.97 times ( $p < 0,05$ ), in comparison with the A / R rats), speed indicator and aggregation platelet levels of von Willebrand factor (by 42,4% ( $p < 0,001$ )), duration of blood coagulation, with a decrease in hemoglobin and moderate leukocytosis. Application of the test compounds had a positive impact on the antithrombotic endothelial function. So when using mexidol. thioctic acid and ATACL platelet aggregation degree decreased by 1.6; 1,44, 1,74 ( $p < 0,05$ ) fold, respectively, that is. Oh, the test compounds can assume the presence of endotelioprotektornyh properties. Comparing the experimental data on the degree of increase of this type of pharmacological activity of the analytes can be arranged in series: ATACL > thioctic acid > mexidol.

Keywords: cerebral ischemia, antithrombotic function of the endothelium, mexidol, thioctic acid.

В последнее время в работах как отечественных, так и зарубежных ученых все более пристальное внимание стало уделяться нарушениям мозгового кровообращения (НМК) ишемического генеза. По всей видимости, это связано с высокой частотой развития данных патологий, а также с повышенным риском летального исхода и первичной инвалидизации. Кроме того, ишемические повреждения головного мозга имеют тенденцию к «омоложению» [4-6,16]. Все это делает НМК объектом пристального изучения фармакологов и клиницистов.

Повреждение головного мозга при его ишемии носит, как правило, многофакторный характер. Сюда можно отнести и снижение биоэнергетики головного мозга, развитие ацидоза, нарушение функции эксайтотоксических медиаторов, оксидативный стресс, гиперкоагуляцию, тромбообразование, воспаление и т.д. [12].

Многими авторами выделяется также и эндотелиальная дисфункция как одно из возможных патогенетических звеньев в развитии ишемии головного мозга [10,11]. Известно, что сосудистый эндотелий посредством секреции биологически активных веществ способен регуляторно воздействовать на процессы адгезии и агрегации тромбоцитов, про- и антикоагулянтное равновесие (антитромботическая функция эндотелия). При нарушении нормального функционального состояния сосудистого эндотелия происходит сдвиг в системе анти/проагреганты в сторону последних, что может повысить риск тромбообразования и усугубить течение заболевания [10,11,13]. Напротив, сохранение состояния сосудистого эндотелия в его физиологическом состоянии способно снизить число неблагоприятных последствий как в ишемическом, так и в постишемическом периоде [1]. Таким образом, актуальной становится проблема целенаправленного поиска биологически активных соединений, способных нормализовать функцию эндотелия мозговых сосудов на фоне его ишемии.

**Целью** данного исследования явилась сравнительная оценка действия мексидола, тиоктовой кислоты и АТАСЛ на антитромботическую функцию эндотелия и некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных на фоне фокальной ишемии головного мозга.

**Материалы и методы.** Данное исследование выполнено на 50 крысах-самцах линии Wistar массой 220-240 г, разделенных на 5 равных экспериментальных групп по 10 особей в каждой. Первую экспериментальную группу составили ложнооперированные животные. У четырех оставшихся групп животных воспроизводили ишемическое повреждение головного мозга (ГМ). Ишемию ГМ моделировали правосторонней окклюзией средней мозговой артерии (СМА) путем ее коагуляции под местом пересечения СМА с обонятельным трактом [1]. Исследуемые соединения вводились *per os* непосредственно после оперативного вмешательства и на протяжении 3 дней ишемического периода в дозах: мексидол («Фармасофт», Россия) – 30 мг/кг, тиоктовая кислота (октолипен, «Фармстандарт –

Лексредства», Россия) – 50 мг/кг, АТАСЛ - 100 мг/кг [7,8]. Группа крыс негативного контроля (НК, ОСМА) получала 0,9%-ный раствор хлористого натрия в эквивалентном количестве. По истечении указанного временного периода проводили оценку состояния тромбоцитарного звена гемостаза, регистрацию процесса свертывания и некоторые показатели состава периферической крови.

Влияние исследуемых соединений на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз оценивали регистрацией параметров процесса АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов. При этом определяли степень, скорость и показатель агрегации тромбоцитов. Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации АЛАТ – 2 «БИОЛА» (НПФ «БИОЛА», Россия) методом определения относительного среднего размера агрегатов [2]. Также определяли уровень первичного предиктора нарушения нормального функционирования антитромботического потенциала сосудистого эндотелия - фактора фон Виллебранда, агглютинационным методом, с использованием реактивов НПО «РЕНАМ». Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе Н-334. По полученным коагулограммам определяли продолжительность процесса свертывания крови в секундах. Гематологические показатели (количество лейкоцитов - WBC, лейкоформула (Lymph#, Mon#, Gran#), количество эритроцитов – RBC, содержание гемоглобина – HGB, гематокрит – HCT, средний объем эритроцита – MCH, концентрация гемоглобина в одном эритроците – MCHC, содержание тромбоцитов – PLT) определяли на автоматическом гематологическом анализаторе ветеринарного использования BC 2800vet (Mindray).

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows). Вычисляли среднее значение и стандартную ошибку среднего значения ( $M \pm m$ ). Полученные данные проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро - Уилка. В случае нормального распределения данных для сравнения средних использовали t-критерий Стьюдента. При ненормальном распределении результатов эксперимента дальнейшую статистическую обработку данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

### **Результаты и их обсуждение**

У ложнооперированных животных степень агрегации тромбоцитов составляла  $1,463 \pm 0,127$  у.е. (рис. 1). В результате правосторонней окклюзии средней мозговой артерии у группы НК данный показатель увеличился на 97,9% ( $p < 0,05$ ). Применение мексидола и тиоктовой кислоты привело к снижению степени агрегации, относительно группы крыс негативного контроля, в 1,6 и 1,44 раза, тогда как на фоне введения АТАСЛ данный параметр

процесса агрегации тромбоцитов снизился, по сравнению с группой животных негативного контроля, в 1,74 ( $p < 0,05$ ) раза.

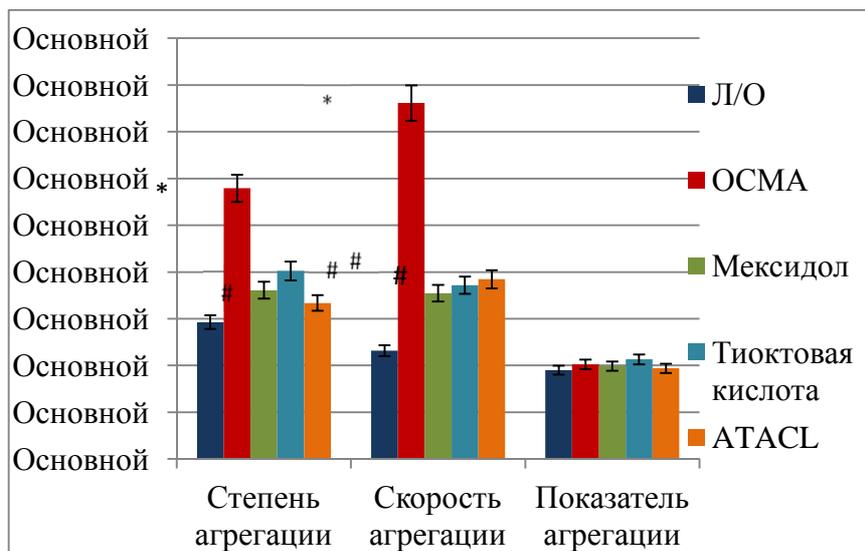


Рис. 1. Влияние исследуемых соединений на параметры процесса агрегации тромбоцитов: \* - достоверно, относительно группы Л/О ( $p < 0,05$ ), # - достоверно, относительно группы НК ( $p < 0,05$ )

Аналогичная тенденция наблюдалась и при анализе скорости агрегации тромбоцитов. У крыс группы негативного контроля данный показатель составлял  $3,806 \pm 0,694$  у.е., в то время как у ложнооперированных животных значение скорости агрегации было  $1,159 \pm 0,236$  у.е. Таким образом, скорость агрегации при фокальной ишемии головного мозга возрастает в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с Л/О крысами. Из изучаемых соединений наиболее выраженное влияние на скорость агрегации тромбоцитов оказал мексидол (относительно группы животных негативного контроля данный показатель уменьшился на 147,9% ( $p < 0,05$ )). Тиоктовая кислота и АТАСЛ также способствовали снижению скорости агрегации, однако изменения (снижение относительно НК группы) данного параметра процесса агрегации были меньше, чем при применении мексидола, и составили 104,7% и 98% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Следует также отметить следующее: у группы НК показатель агрегации тромбоцитов, по сравнению с ложнооперированными крысами, несколько увеличился, а именно на 6,6%, и при применении исследуемых соединений практически не претерпел существенных изменений (рис. 1).

При оценке влияния исследуемых соединений на уровень фактора фон Виллебранда (FW) установлено, что у группы НК данный показатель увеличился, по сравнению с Л/О группой, на 42,4% ( $p < 0,001$ ): с 82,6 до 117,8 у.е. В то же время пероральное введение мексидола и АТАСЛ способствовало снижению уровня FW на 10 и 15% ( $p < 0,02$ )

соответственно. На фоне приема тиоктовой кислоты уровень фактора фон Виллебранда практически не отличался от такового у группы крыс негативного контроля (рис. 2).

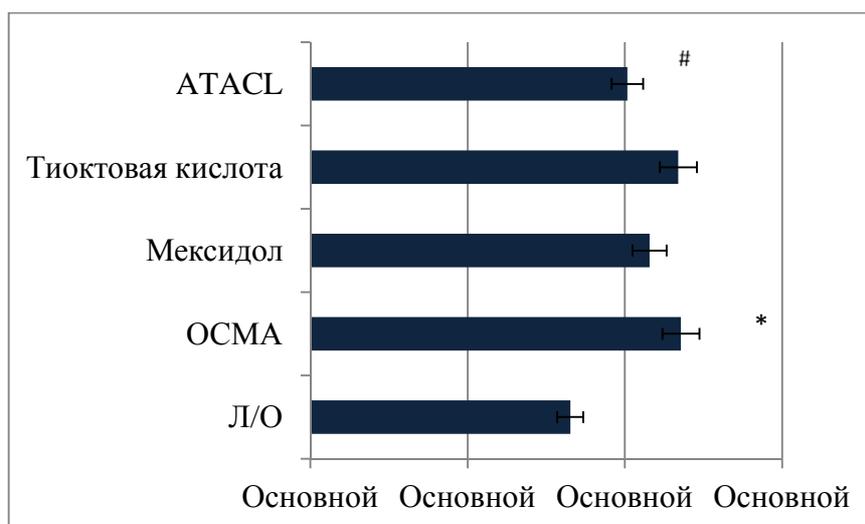


Рис. 2. Влияние исследуемых соединений на уровень фактора фон Виллебранда:

\* - достоверно, относительно группы Л/О ( $p < 0,001$ ),

# - достоверно, относительно группы НК ( $p < 0,02$ )

В результате анализа продолжительности свертывания крови установлено, что у группы Л/О она составляла  $109,7 \pm 9,195$  сек. У группы ОСМА данный показатель уменьшился в 1,52 ( $p < 0,02$ ) раза. Применение мексидола и тиоктовой кислоты значимого влияния на процесс свертывания крови не оказало, и как результат данный показатель практически не отличался от значения группы НК. Пероральное введение АТАСЛ оказало положительное влияние на продолжительность свертывания крови, что отразилось в увеличении данного показателя на 32,9 сек (относительно группы НК) до значения  $105 \pm 12,349$  сек, т.о., при приеме 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты продолжительность свертывания крови практически достигла значения ложнооперированной группы крыс.

Рассматривая некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных, следует отметить повышение содержания лейкоцитов у группы крыс негативного контроля на 35,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с Л/О группой животных. При этом наблюдалось значительное увеличение отдельных фракций лейкоцитов: содержание лимфоцитов - на 32,6% ( $p < 0,05$ ), гранулоцитов – на 41,7%, моноцитов – на 23,1% (таблица). Также у группы НК относительно ложнооперированных крыс отмечено снижение гемоглобина на 8,5% ( $p < 0,05$ ) [3]. Остальные анализируемые показатели состава периферической крови экспериментальных животных существенных изменений не претерпели.

На фоне приема исследуемых соединений как общий уровень лейкоцитов, так и уровень их отдельных фракций существенно снизился (по сравнению с НК группой). При

введении мексидола и тиоктовой кислоты содержание лейкоцитов снизилось на 62,2% и 35,4%, по сравнению с группой крыс негативного контроля, в то время как введение АТАСЛ способствовало снижению данного показателя на 61,3%. Кроме того, применение АТАСЛ нормализовало содержание гемоглобина (статистически значимых отличий между группами животных, получавших АТАСЛ, и ложнооперированными крысами не наблюдалось), в то время как при применении мексидола и тиоктовой кислоты, относительно Л/О животных, данный показатель существенно снизился (таблица). Также необходимо отметить снижение количества тромбоцитов при пероральном введении мексидола и тиоктовой кислоты на 15,9 и 16% соответственно (относительно Л/О группы крыс), чего не наблюдалось при применении 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты.

### **Изменение состава периферической крови на фоне фокальной ишемии ГМ и при применении исследуемых соединений**

Группа		WBC, 10 <sup>9</sup> кл/л	Lymph#	Mon#	Gran#	RBC 10 <sup>12</sup> кл/л	HGB, г/л	HCT	MCV, fl	MCH, pg	MCHC, г/л	PLT, 10 <sup>9</sup> кл/л
Л/О	М	<b>8,26</b>	<b>5,46</b>	<b>0,26</b>	<b>2,54</b>	<b>5,9472</b>	<b>151,8</b>	<b>32,02</b>	<b>53,94</b>	<b>26,08</b>	<b>486</b>	<b>496,6</b>
	м	1,325	1,192	0,05	0,284	0,416	7,453	2,29	0,482	2,563	51,355	25,88
НК	М	<b>11,16*</b>	<b>7,24*</b>	<b>0,32</b>	<b>3,6</b>	<b>6,136</b>	<b>139,8*</b>	<b>34,14</b>	<b>55,76</b>	<b>23,1</b>	<b>415,8</b>	<b>498,8</b>
	м	1,178	1,104	0,06	0,197	0,522	4,8	2,859	0,631	1,154	20,519	55,06
АТАСЛ	М	<b>6,92</b>	<b>3,98</b>	<b>0,22</b>	<b>2,72</b>	<b>6,134</b>	<b>157,6</b>	<b>33,74</b>	<b>55,06</b>	<b>25,86</b>	<b>471,4</b>	<b>503,8</b>
	м	0,817	0,719	0,037	0,315	0,281	2,135	1,671	0,444	1,272	25,927	22,35
Мексидол	М	<b>6,88</b>	<b>4,7</b>	<b>0,18</b>	<b>2</b>	<b>5,528</b>	<b>139,6</b>	<b>29,66</b>	<b>53,8</b>	<b>25,74</b>	<b>479,8</b>	<b>428,2</b>
	м	0,959	0,641	0,049	0,318	0,376	4,925	2,026	0,593	2,255	41,015	44,99
Тиоктовая кислота	М	<b>8,24</b>	<b>4,7</b>	<b>0,32</b>	<b>3,22</b>	<b>4,872</b>	<b>139,2</b>	<b>27,04</b>	<b>55,8</b>	<b>28,84</b>	<b>516,6</b>	<b>428</b>
	м	0,928	0,652	0,06	0,38	0,32	5,601	1,442	1,241	1,611	18,338	35,012

*Примечание: \* - достоверно относительно группы Л/О (p<0,05).*

Подобные изменения, наблюдаемые при фокальной ишемии головного мозга, вероятно, связаны со сниженной продукцией сосудистым эндотелием антиагрегантных факторов, в частности простациклина, снижением биодоступности эндогенного оксида азота, повышенным выбросом тромбоксана А<sub>2</sub> и тканевого тромбопластина, повышается также уровень FW, в результате чего происходит активация тромбоцитов, что влечет за собой повышение тромбогенного потенциала крови и, как следствие, может привести к развитию синдрома гиперкоагуляции. Повышение количества лейкоцитов в периферической крови, по всей видимости, связано с развитием воспалительной реакции с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8) [9,12].

Исследуемые соединения: мексидол, тиоктовая кислота и АТАСЛ, по всей видимости, способны в условиях ишемии ГМ снижать биодegradацию оксида азота и повышать

экспрессию эндотелиальной изоформы NO-синтазы; также, вероятно, имеет место снижение неблагоприятных отсроченных эффектов iNOS за счет инактивации образующегося пероксонитрита [7,8,14,15]. В результате может происходить нормализация функционального состояния эндотелиоцитов мозговых сосудов с восстановлением продукции эндотелиальных антитромбогенных факторов и снижением выброса проагрегантных соединений, что предполагает наличие у изучаемых веществ эндотелиопротекторной активности.

#### **Выводы:**

1. Правосторонняя окклюзия средней мозговой артерии приводит к нарушению антитромботической функции эндотелия мозговых сосудов, сопровождаемому повышением степени (в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с Л/О крысами), скорости и показателя агрегации тромбоцитов, уровня фактора фон Виллебранда (на 42,4% ( $p < 0,001$ )), продолжительности свертывания крови, содержанием гемоглобина и умеренным лейкоцитозом.
2. Применение исследуемых соединений способствовало нормализации антитромботической функции эндотелия и состава периферической крови. При этом наиболее выраженный эффект наблюдается на фоне введения 4-гидрокси-3,5-дитретбутилкоричной кислоты.

#### **Список литературы**

1. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В. Изучение вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия мозговых сосудов на различных моделях его ишемического повреждения // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. - URL: <http://www.science-education.ru/128-22406>.
2. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лабораторное дело. – 1989. - № 10. - С. 15-18.
3. Галиновская Н.В., Усова Н.Н., Лышенко О.В. и др. Лабораторные показатели воспалительного ответа у лиц с преходящими нарушениями мозгового кровообращения // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. - 2011. - № 2. - С. 53-58.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мартынов М.Ю. Церебральный инсульт: проблемы и решения // Вестник РАМН. - 2003. - № 11. - С. 44–48.
5. Ефимова О.С., Слободенюк А.В., Белкин А.А. и др. Эпидемиология инсультов: ведущие факторы риска и направления профилактики // Гигиена и эпидемиология. - 2008. - Т. 48, № 8. - С. 43-46.
6. Информационный бюллетень Всемирной организации здравоохранения. - 2014. - № 310. Окт. - С. 1-2.

7. Корокин М.В., Пашин Е.Н., Бобраков К.Е. и др. Изучение эндотелиопротективного и коронарного действия производных 3-оксопиридина // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009. - Т. 109, № 4. - С. 104–109.
8. Кочкаров В.И., Молчанова О.В., Покровская Т.Г. и др. Эндотелиопротективное действие комбинации тиоктовой кислоты с розувастатином при L-NAME-индуцированном дефиците оксида азота // Научные ведомости. Сер.: Медицина. Фармация. - 2014. – Т. 182, № 11. - С. 192-193.
9. Супрун Э.В. Влияние ронколейкина на активность системы оксида азота в головном мозге крыс с экспериментальным геморрагическим инсультом // Украинский журнал экстремальной медицины имени Г.О. Можаяева. - 2010. - Т. 11, № 4. - С. 117-120.
10. Суслина З.А., Танащян М.М., Домашенко М.А. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения // Неврология. - 2008. - Т. 1, № 2. - С. 4-11.
11. Черток В.М., Коцюба А.Е. Эндотелиальный (интимальный) механизм регуляции мозговой гемодинамики: трансформация взглядов // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2012. - № 2. - С. 17-26.
12. Шмырев В.И., Васильев А.С., Рудас М.С. Дисциркуляторная энцефалопатия – вопросы патогенеза, диагностики, дифференциальной диагностики и лечения на современном этапе // Кремлевская медицина. - 2009. - № 4. - С. 31-36.
13. Щербак Н.С., Галагудза М.М. Экспериментальные модели ишемического инсульта // Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. – 2011. - Июнь. - С. 39-46.
14. Chen H., Li G., Zhan P., Liu X. Ligustrazine derivatives. Part 5: design, synthesis and biological evaluation of novel ligustrazinyloxy-cinnamic acid derivatives as potent cardiovascular agents // Eur J Med Chem. - 2011. - Vol. 46 (11). - P. 5609-15.
15. Kim S.Y., Koo Y.K., Koo Jy et al. Platelet anti-aggregation activities of compounds from Cinnamomum cassia // J Med Food. – 2010. - Oct; 13 (5). - 1069-74.
16. Olsen F.J., Jørgensen P.G., Møgelvang R. Predicting Paroxysmal Atrial Fibrillation in Cerebrovascular Ischemia Using Tissue Doppler Imaging and Speckle Tracking Echocardiography // J Stroke Cerebrovasc Dis. – 2015. - Nov 2.