УДК 547.857.4:615.273.52

АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ СОЛЕЙ ПРОИЗВОДНЫХ 7-ТИЕТАНИЛКСАНТИНА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Самородов А.В.[1], Камилов Ф.Х.[1], Халимов А.Р.[1], Тимирханова Г.А.[1], Халиуллин Ф.А.[1]

[1] *ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: avsamorodov@gmail.com*

Исследовано влияние 10 впервые синтезированных производных 7-тиетанилксантина и применяемых в медицине лекарственных препаратов на систему гемостаза в условиях in vitro на донорской крови человека. Установлено различное влияние изученных соединений на функциональную активность тромбоцитов. Соединение под лабораторным шифром X проявляет антиагрегационную активность, превосходящую по уровню ряд лекарственных препаратов, что свидетельствует о его потенциально высоком антитромботическим эффекте. Методом тромбоэластографией изучен антитромботический эффект соединения под лабораторным шифром X. Выявлены изменения показателей, характеризующих функциональную активность тромбоцитов и механико-физические свойства сгустка. Показатели, ответственные за систему фибринолиза, изменений не претерпевали. Полученные результаты убеждают в необходимости и актуальности дальнейших исследований влияния производных ряда 7-тиетанилксантина на систему гемостаза, как потенциальных антиагрегантов.

Ключевые слова: система гемостаза, тиетансодержащие ксантины, антиагрегационная активность.

ANTIAGGREGATORY ACTIVITY OF SALTS OF 7-THIETANILXANTHINE DERIVATIVES UNDER CONDITIONS IN VITRO

Samorodov A.V.[1], Kamilov F.Kh.[1], Khalimov A.R.[1], Timirkhanova G.A.[1], Khaliullin F.A.[1]

[1] *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Bashkir State Medical University of Russian Ministry of Healthcare, Ufa, e-mail: avsamorodov@gmail.com*

We have studied the influence of 10 firstly sythesized derivatives of 7-thietanilxanthine and medically applied therapeutic agents on the hemostasis system under conditions in vitro with donated human blood. The impact of firstly synthesized derivatives of 7-thietanilxanthile on the functional activity of platelets under conditions in vitro was studied with the help of a laser analyzer of platelet aggregation Biola 230 LA (Russia) and thromboelastography (TEG 5000, Haemoscope Corporation, USA). We have difined different influence of the studied compounds on functional activity of platelets. The compounds under lab X-code shows antiaggregation activity, which exceeds levelwise a number of therapeutical agents and that proves its potentially high antithrombotic impact. The findings prove that it is neccessary and up-to-date to continue research of this number of derivatives influencing the hemostasis system as potential antiplatelets.

Keywords: hemostasis sistem, thietan-containing xanthine derivative, antiaggregation activity.

Нарушения в системе гемостаза являются ключевым звеном патогенеза многих заболеваний и критических состояний, характеризующихся повреждением эндотелия, нарушениями реологии крови, взаимодействия эндотелия с плазменными ферментными системами и клетками крови, тромбоцитами в первую очередь [1]. В связи с тем что именно тромбоциты играют ключевую роль в инициации тромбообразования, ингибирование их активности представляет собой один из наиболее перспективных способов профилактики и терапии тромбозов. В исследованиях, проведенных за последние десятилетия, показана необходимость и эффективность снижения угрозы тромбообразования с помощью специфических воздействий, в частности применения антиагрегантов [7]. Результаты ранее проведенных исследований, направленных на поиск потенциальных антиагрегантов в ряду впервые синтезированных тиетансодержащих солей производных ксантина, мотивируют на

дальнейший поиск потенциальных корректоров системы гемостаза среди производных данного ряда [3; 8]. В настоящей работе представлены результаты скрининга и изучение антиагрегационного эффекта наиболее активного из синтезированных тиетансодержащих производных ксантина.

Цель: оценить влияние 10 синтезированных тиетансодержащих производных ксантина [4] на систему гемостаза in vitro и сравнить с применяемыми в медицине лекарственными препаратами.

Материалы и методы

Вся экспериментальная работа выполнена на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет в условиях in vitro в соответствии с рекомендациями «Руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ» [2]. Исследование было одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (№ 2 от 17.10.2012). Информированное согласие было получено у всех участников исследования до забора крови.

1. Взятие крови и центрифугирование

Взятие 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%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 9:1.

Все тесты проводили на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 100g в течение 10 минут, бестромбоцитарной плазмы - при 300g в течение 15 минут. В работе использовалась центрифуга ОПН-3.02 (Россия).

2. Агрегация тромбоцитов

Исследование влияния новых производных ксантина и препаратов сравнения на агрегацию тромбоцитов в условиях in vitro на крови человека осуществляли с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «Биола 230LA» (Москва, Россия) [5]. В качестве индуктора агрегации использовали коллаген в концентрации 5 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (Барнаул, Россия). Определение активности исследуемых производных проводили в концентрации 2×10^{-3} М/л. При анализе агрегатограмм обращали внимание на спонтанную агрегацию тромбоцитов, вызванную введением исследуемого вещества в плазму, рассчитывали степень подавления или усиления агрегации под действием производных ксантина, оценивали дезагрегационный эффект соединений.

3. Антикоагуляционная активность

Определение антикоагуляционной активности впервые синтезированных соединений и гепарина натрия проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на

турбидиметрическом гемокоагулометре Solar CGL 2110 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь). Изучались показатели активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени (ПВ) и концентрации фибриногена по A. Clauss [2]. Определение антикоагуляционной активности исследуемых веществ проводили в концентрации 10^{-3} г/мл. В работе использовались реактивы производства «Технология-Стандарт» (Барнаул, Россия).

4. Тромбоэластография

Тромбоэластографию проводили на аппарате TEG 5000 (Haemoscope Corporation, США). При анализе тромбоэластограмм определяли общую тенденцию коагуляции (R, CI, TMA, TPI), функциональную активность тромбоцитов и фибриногена (MA, Angle), активность фибринолиза (CLT, CL30, LY30) и физико-механические свойства образовавшихся сгустков (E, G) [6]. В качестве активатора ТЭГ использовали 0,2 М р-р $CaCl_2$ («Технология-Стандарт», Россия).

5. Препараты сравнения

В качестве препаратов сравнения, согласно [2] из принципа химического подобия и установленной высокой биологической активности, в экспериментах использовали 3,7-диметил-1-(5-оксогексил)ксантин («Пентоксифиллин», ОАО «Дальхимфарм», Россия), соль 1,3,7-триметилксантина с бензоатом натрия («Кофеин-бензоат натрия», ОАО «Дальхимфарм», Россия), соль 1,3-диметилксантина с 1,2-этилендиамином («Эуфиллин», ОАО «Дальхимфарм», Россия), 2-ацетилоксибензойная кислота («Ацетилсалициловая кислота», фармацевтическая фабрика Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД, Китай) и гепарин натрия (ОАО «Синтез», Курган, Россия).

6. Обработка результатов

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. Выявлено, что вид распределения полученных данных отличается от нормального, поэтому при дальнейшей работе использовались непараметрические методы. Данные представлены в виде медианы, 25 и 75 процентилей. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости р для статистических критериев принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования влияния новых производных ксантина на адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние впервые синтезированных производных ксантина и препаратов сравнения на показатели функциональной активности тромбоцитов, Me (25-75)

№	Шифр	Удлинение АПТВ, % к контролю	Антиагрегационная активность, % к контролю
1	I	4,7 (3,5-5,6)	4,7 (3,2-5,4)
2	II	7,5 (5,9-8,3)	6,8 (5,2-8,3)*
3	III	7,2 (5,6-8,3)	3,1 (2,6-5,2)
4	IV	8,4 (6,1-9,3)	7,2 (6,1-8,5)*
5	V	8,6 (6,3-9,4)	2,3 (1,5-2,9)
6	VI	5,2 (4,1-6,4)	6,7 (5,2-8,9)*
7	VII	2,4 (1,9-3,5)	5,1 (3,0-7,7)
8	VIII	3,9 (2,1-5,2)	7,2 (5,4-9,3)*
9	IX	9,8 (8,1-10,4)	3,4 (2,2-4,7)
10	X	1,8 (1,1-2,4)	9,1 (8,1-11,6)*
11	Эуфиллин	-	2,5 (0,8-4,2)
12	Кофеин-бензоат натрия	-	5,3 (3,9-7,2)
13	Аспирин	-	0,0 (0,0-0,0)
14	Пентоксифиллин	-	0,0 (0,0-0,0)
15	Гепарин натрия	54,7 (47,7-60,2)	-

Примечание: * - уровень статистической значимости различий в сравнении с кофеин-бензоат натрием $p<0,05$, n-частота наблюдений.

По результатам проведенного исследования установлено, что ацетилсалициловая кислота и пентоксифиллин не оказывают влияния на агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном. Среди лекарственных препаратов группы ксантина наибольшая активность регистрировалась у кофеин-бензоат натрия. При предварительной инкубации кофеин-бензоат натрия в обогащенной тромбоцитами плазме в течение 3 минут, происходило снижение коллаген-индуцированной агрегации в среднем лишь на 5,3% относительно контроля. Синтезированные соединения показали различной степени выраженности антиагрегационную активность, превышающую показатели препаратов сравнения. Соединения под лабораторными шифрами II, IV, VI, VIII, X проявили антиагрегационную активность, превосходящую показатели препаратов сравнения. Наибольшую активность проявило соединение под лабораторным шифром X. В присутствии соединения X агрегация тромбоцитов снижалась в среднем на 9,1%. Дезагрегационная активность у экспериментальных соединений и препаратов сравнения не регистрировалась.

Соединения показали различной степени выраженности влияние на плазменный компонент гемостаза, проявляющееся изменением показателя внутреннего пути свертывания крови – АПТВ. На показатели концентрации фибриногена и ПВ исследуемые вещества и гепарин натрия влияния не оказывали. Синтезированные производные ксантина по уровню антикоагуляционной активности уступали препарату сравнения - гепарину натрия. Максимальное удлинение времени свертывания плазмы в тесте АПТВ не превышало 10% для исследуемых соединений. Однако сочетание антиагрегационной и антикоагуляционной активности может свидетельствовать о более широком и эффективном антитромботическом потенциале данных соединений. По результатам скрининга выбрано наиболее активное соединение под лабораторным шифром X, проявляющее антиагрегационную активность большую, чем препараты сравнения, и антикоагуляционную активность на уровне 8,6%.

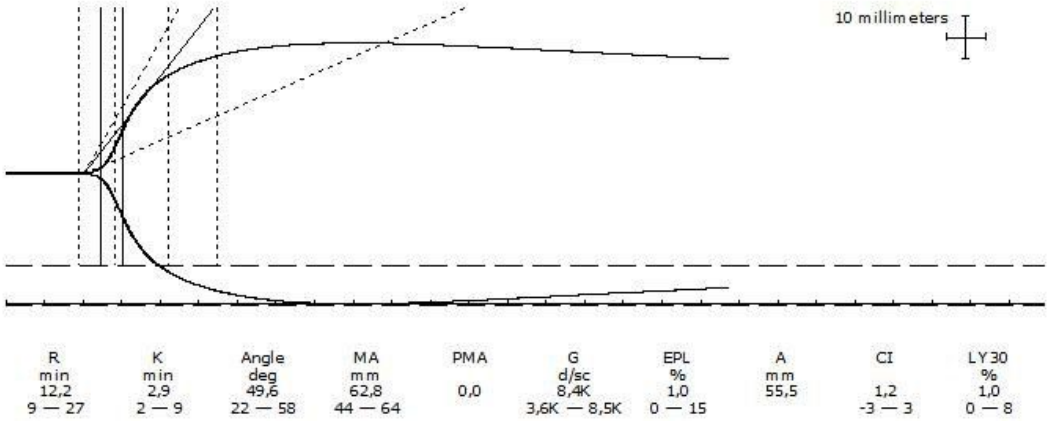
Следующим этапом определили влияние соединения X на систему гемостаза методом тромбоэластографии, позволяющим оценить систему гемостаза в комплексе по основным ключевым звеньям. Результаты исследования представлены в таблице 2 и на рисунке.

Таблица 2

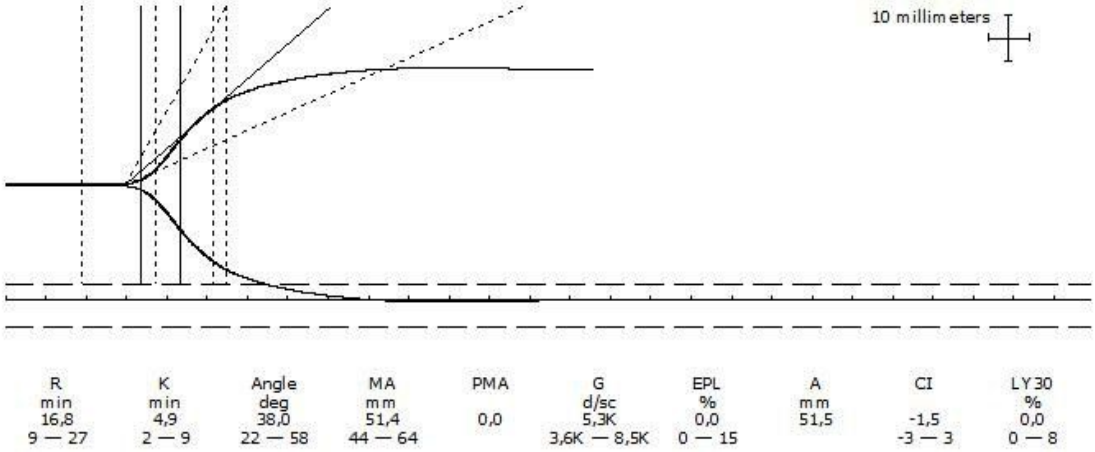
Показатели тромбоэластографии при действии соединения X, Me (25-75)

Показатель	Контроль, n=7	Соединение X, n=7	p
SP, мин	10,3 (7,5-12,3)	11,3 (9,4-12,1)	0,1
R, мин	11,6 (9,7-13,2)	11,7 (10,4-12,5)	0,2
Angle, град.	43,7 (42,4-44,3)	42,1 (39,1-43,7)	0,3
MA, мм	55,9 (51,2-57,8)	44,8 (42,1-45,3)	0,001
TMA, мин	35,4 (32,4-38,5)	39,6 (37,6-41,2)	0,01
G, дин/см^2	6,3 (5,7-6,4)	4,9 (3,7-5,1)	0,008
E, дин/см^2	127,3 (115,4-142,3)	106,4 (96,7-110,2)	0,001
TPI, /сек	15,1 (13,2-17,1)	12,4 (11,2-14,3)	0,003
CL30, %	97,5 (91,3-99,5)	98,4 (96,4-99,8)	0,4
LY30, %	0,6 (0,2-0,9)	0,0 (0,0-0,0)	0,3
CLT, мин	36,9 (32,4-38,3)	35,4 (32,1-37,4)	0,2
CI	0,6 (0,3-1,3)	-1,3 (-1,1/-1,9)	0,001

Примечание: p - уровень статистической значимости различий признаков группы соединения X в сравнении с контролем, n - количество проб.



1



2

Примеры тромбоэластограмм цитратной крови в контроле (1)
и в присутствии соединения X (2)

Результаты комплексного метода оценки состояния системы гемостаза методом тромбоэластографии в присутствии соединения X свидетельствуют о проявлении исключительно антиагрегационного эффекта. Принципиальным в данном случае является изменение показателя активности тромбоцитов (MA) на фоне нормального количества тромбоцитов и фибриногена. Показатель MA в присутствии соединения X снижен на 19,9% (p=0,001) по сравнению с контролем. Это приводит к статистически значимому снижению общего коагуляционного потенциала в сторону гипокоагуляции – показатель TMA удлиняется на 11,8% (p=0,001), а TPI уменьшается в 1,3 раза (p=0,003) в сравнении с контролем. Изменяются и механико-физические свойства сгустка: показатели E и G снижены в группе соединения X в 1,3 раза по сравнению с контролем. Показатели, ответственные за

систему фибринолиза (CLT, CL30, LY30), остаются на уровне контрольных значений. Таким образом, методом тромбоэластографии подтвержден антиагрегационный эффект нового соединения X в отношении функциональной активности тромбоцитов.

Заключение

Среди впервые синтезированных производных ксантина найдены соединения, превосходящие по антиагрегационной активности ряд применяемых в настоящее время препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о высоком антитромботическом потенциале синтезированных соединений, что свидетельствует о перспективности дальнейшего поиска потенциальных антиагрегантов среди тиетансодержащих производных ксантина для создания на их основе избирательно действующих, высокоэффективных лекарственных препаратов.

Список литературы

1. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. – Чита : Экспресс-издательство, 2012. – 832 с.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. - М. : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. - 944 с.
3. Тимирханова Г.А. Первичный анализ зависимости антикоагуляционной активности тиетансодержащих производных теофиллина от стереохимических особенностей строения молекул / Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Ф.А. Халиуллин, Ф.Х. Камилов // Казань : Бриг, 2016. – С. 430-433.
4. Халиуллин Ф.А. Тииираны в синтезе биологически активных производных ксантина и бензимидазола : дис. ... д-ра фарм. наук. – Уфа, 1998. – 428 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. Rapid thrombelastography delivers real-time results that predict transfusion within 1 hour of admission / B.A. Cotton, G. Faz, Q.M. Hatch // J. Trauma. – 2011. – Vol. 71, № 2. – P. 407-414.
7. Patrono C. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis / C. Patrono, F. Andreotti, H. Arnesen // European Heart Journal. – 2011. – Vol. 32. – P. 2922–2932.
8. Samorodov A. Antithrombotic activity of new 1-ethylxanthine cyclohexylammonium salt / A. Samorodov, F. Kamilov, G. Timirkhanova, et al. // FASEB J. – 2014. – 28. - 1054.5.