

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГИДРОКИНОНСУЛЬФОКИСЛОТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

Судакова О.А.<sup>1</sup>, Демидова М.А.<sup>1</sup>, Скачилова С.Я.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, e-mail: education@tvgtmu.ru;

<sup>2</sup>ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ», Старая Купавна, e-mail: skachilova@mail.ru

В эксперименте *in vitro* показано влияние нового производного гидрохинонсультфокислоты с лабораторным шифром ЛХТ 5-10, синтезированного в АО «Всероссийский центр по изучению безопасности биологически активных веществ» (АО «ВНЦ БАВ», г. Старая Купавна) на агрегационную способность тромбоцитов крови здоровых доноров. Исследуемое соединение добавляли *in vitro* к плазме крови доноров в концентрации  $10^{-3}$  Моль/л. Исследование проводили с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов/счетчик модель 230 LA, производство НПФ «БИОЛА». Определяли и анализировали параметры, полученные при исследовании спонтанной и стимулированной АДФ  $0,5 \times 10^{-5}$  М (2,5 мкг/мл) и коллагеном (20 мг/мл) агрегации тромбоцитов. Введение ЛХТ 5-10 ( $10^{-3}$  Моль/л) в кювету агрегометра с обогащенной тромбоцитами плазмой до начала исследования увеличивало средний размер тромбоцитарных агрегатов в среднем на 127% при спонтанной агрегации, а также усиливало и ускоряло АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов соответственно на 23,3% и 16,5%. Эффекты соединения ЛХТ 5-10 сравнивали с действием этамзилата. При спонтанной агрегации и АДФ-индуцированной агрегации эффекты ЛХТ 5-10 и этамзилата были сопоставимы. Достоверных изменений коллаген-индуцированной агрегации у исследуемого вещества ЛХТ 5-10 и этамзилата выявлено не было.

Ключевые слова: производное гидрохинонсультфокислоты, проагрегационная активность, АДФ-индуцированная агрегация, коллаген-индуцированная агрегация.

## ESTIMATION OF PROAGGREGANT ACTIVITY OF NEW DERIVATIVE HYDROQUINONESULPHONIC ACID

Sudakova O.A.<sup>1</sup>, Demidova M.A.<sup>1</sup>, Skachilova S.Ya.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tver State Medical University, Tver, e-mail: education@tvgtmu.ru;

<sup>2</sup>All-Russian Research Center for Safety of Biologically Active Substanc, Staraya Kupavna, e-mail: skachilova@mail.ru

This experiment shows *in vitro* an influence of the new derivative from the hydroquinonesulphonic acid (LHT 5-10) on ability to aggregation of blood platelet of the healthy donors. LHT 5-10 was synthesized in the All-Russian Research Center for Safety of Biologically Active Substance, city of Staraya Kupavna. It was determined and analyzed the parameters that had been got during the examination of the spontaneous aggregation of blood platelet and the aggregation of blood platelet stimulated by ADP  $0,5 \times 10^{-5}$  mol (2,5 mcg/ml) and by collagen (20 mg/ml). An addition of the LHT 5-10 ( $10^{-3}$  mol/l) to the cuvette of the aggregometry that was filled with plasma fortified by platelets caused the increase of average size of the platelets before the estimation up to 127% at spontaneous aggregation, and also caused the strengthen the aggregation of platelets with ADP  $0,5 \times 10^{-5}$  mol (2,5 mcg/ml) up to 23,3% and acceleration up to 16,5%. The effects of the LHT 5-10 compound were compared to that of the etamsylate. At spontaneous aggregation and aggregation of platelets with ADP the effects of the LHT 5-10 and etamsylate were comparable. There were no reliable changes of aggregation of platelets with collagen caused by influence of the LHT 5-10 and etamsylate.

Keywords: derivative hydroquinonesulphonic acid, proaggregant activity, aggregation of thrombocytes with ADP and with collagen.

На фармацевтическом рынке имеется большое число лекарственных препаратов и их комбинаций, которые широко применяются врачами для лечения патологии системы крови. Известно, что к состояниям повышенной кровоточивости или угрожающим жизни кровотечениям часто приводят не только гематологические заболевания, но и заболевания и

травмы других органов и систем. Подбор лекарственного препарата в каждом конкретном случае затрудняет не только широкий выбор лекарств, но и наличие определенных противопоказаний, побочных эффектов лекарственных средств, а иногда и отсутствие необходимых лекарственных форм. Таким образом, поиск новых более эффективных лекарственных веществ, обладающих гемостатическими свойствами, в настоящее время является особенно актуальным. С этой целью в АО «Всероссийский центр по изучению безопасности биологически активных веществ» г. Старая Купавна были синтезированы соединения - производные гидрохинонсульфоокислоты.

В состав молекулы гидрохинонсульфоокислоты входят сульфокислота и фенольное соединение дигидроксibenзол (гидрохинон). Известно, что сульфокислоты являются промежуточными веществами в синтезе ряда лекарственных препаратов, таких как анальгин, diazolin и др. Сульфогруппы усиливают действие антибактериальных и сульфамидных препаратов.

Гидрохинон (дигидроксibenзол) используют для синтеза многих лекарственных средств, в том числе эта молекула лежит в основе химической структуры ангиопротектора и корректора микроциркуляции этамзилата. Общеизвестно, что этамзилат часто применяют для профилактики и лечения послеоперационных кровотечений, кровотечений на фоне онкологических и других деструктивных заболеваний, для лечения геморрагического синдрома, вызванного передозировкой антикоагулянтов непрямого действия, гастродуоденальных кровотечений, а также используют для профилактики внутримозговых геморрагий [1]. Этамзилат обладает кровоостанавливающим действием, оказывает сложное ангиопротекторное действие, которое включает защиту эндотелия сосудов, стабилизацию стенок капилляров и нормализацию их проницаемости при патологических процессах, что улучшает микроциркуляцию и повышает адгезию тромбоцитов [2].

В серии предыдущих экспериментов [3; 4] было отмечено, что среди производных гидрохинонсульфоокислоты ((OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H) имеются биологически активные вещества, обладающие низкой токсичностью, а также способностью уменьшать выраженность активной кожной анафилаксии у мышей и умеренной антиэкссудативной активностью. Наличие противоаллергической и противовоспалительной активностей, вероятно, связано с наличием в молекуле исследуемых веществ дигидроксibenзола, проявляющего выраженные антиоксидантные свойства [5]. Так как воспалительная реакция является патогенетическим звеном раневого процесса, выявленные свойства изучаемых соединений сыграют положительную роль в ускорении заживления раневой кровоточащей поверхности.

В связи с изложенным выше исследование влияния производных гидрохинонсульфоокислоты на агрегантную активность системы крови представляет научный

интерес в процессе поиска лекарственных препаратов, обладающих гемостатической активностью.

**Цель исследования** – изучение и оценка проагрегантной активности нового производного гидрохинонсульфокислоты с лабораторным шифром ЛХТ 5-10, синтезированного в АО «Всероссийский центр по изучению безопасности биологически активных веществ» (АО «ВНЦ БАВ», г. Старая Купавна, Россия) в экспериментах *in vitro*.

#### **Материал и методы исследования**

Экспериментальное исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава РФ. При проведении исследования использовали кровь здоровых доноров. Перед началом эксперимента все добровольцы были ознакомлены с целями, задачами и процедурой исследования, с возможным риском и ожидаемыми результатами, а также правилами подготовки к исследованию. Участники подписывали информированное согласие.

К исследованию не были допущены добровольцы с заболеваниями крови, острыми и хроническими инфекционными заболеваниями, тяжелой соматической и онкологической патологией, эндокринными расстройствами, исключали курящих лиц, употреблявших накануне исследования алкоголь и лекарственные препараты (в том числе, нестероидные противовоспалительные препараты, антибиотики, антиагреганты, антикоагулянты и др.).

Агрегационную способность тромбоцитов анализировали турбидометрическим оптическим методом по Борну и О'Брайену и методом З.А. Габбасова с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов/счетчик модель 230 LA, производства НПФ «БИОЛА» ВНКЦ г. Москва. Данный анализатор позволяет регистрировать агрегацию тромбоцитов в реальном времени путем анализа флюктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением количества частиц в оптическом канале анализатора. Относительная дисперсия этих флюктуаций является пропорциональной среднему размеру агрегатов [6]. Достоинством данного метода является его высокая чувствительность, что позволяет использовать его для исследования спонтанной агрегации тромбоцитов, агрегации, стимулированной низкими концентрациями индукторов, а также агрегации субклеточных структур и макромолекул. К недостаткам метода относят то, что показатель агрегации отражает только относительное увеличение среднего радиуса агрегатов и равен нулю при отсутствии агрегации [7].

Забор крови осуществляли утром натощак из локтевой вены в одноразовые стерильные вакуумные пробирки (системы вакуумного забора крови «BD Vacutainer®») с буферным раствором 3,2% цитрата натрия в соотношении кровь : цитрат - 9 : 1.

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали путем центрифугирования при

1000 g в течение 10 минут при комнатной температуре (15-25 °C). Из пробирки отбирали 2,5 мл верхнего слоя (супернатанта). Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали повторным центрифугированием остатков крови при 3000 g в течение 15 минут. Светопропускание ОТП принимали за 0%, светопропускание БТП – за 100%. В работе использовали центрифугу UNICO® PowerSpin™ LX.

На первом этапе исследования изучали проагрегантную активность нового производного гидрохинонсульфокислоты с лабораторным шифром ЛХТ 5-10. На втором этапе исследовали влияние на агрегационную способность тромбоцитов плазмы препарата сравнения – ангиопротектора и гемостатика этамзилата. Полученные на первом и втором этапах данные сравнивали с контролем и между собой.

Данные соединения добавляли *in vitro* к обогащенной тромбоцитами плазме крови здоровых доноров в концентрации  $10^{-3}$  Моль/л. Определяли и анализировали параметры агрегации, полученные в течение 5 минут при исследовании спонтанной и стимулированной агрегации тромбоцитов. В качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ)  $0,5 \times 10^{-5}$  М (2,5 мкг/мл) (ООО «Технология-Стандарт», Россия) и коллаген (20 мг/мл) (ООО «Технология-Стандарт», Россия) [8; 9].

Полученные агрегатограммы анализировали с использованием программного обеспечения AGGR. Параметры агрегации оценивали по кривой среднего размера агрегатов и по кривой светопропускания, учитывая общий характер агрегации (полная, неполная, обратимая, необратимая, одноволновая, двухволновая). По кривой светопропускания определяли максимальное приращение светопропускания после добавления индуктора в процентах - степень агрегации максимальную – Level max (L max) (%), а также максимальный наклон кривой светопропускания в процентах в минуту - скорость агрегации максимальную Velocity max (V max) (%/мин.)

По кривой среднего размера агрегатов определяли максимальное значение среднего размера агрегатов - Level max (Lmax) в относительных единицах (отн. ед.), характеризующее максимальную степень агрегации тромбоцитов и максимальный угол наклона кривой Velocity max (V max) в относительных единицах в минуту (отн. ед./мин.), определяющий максимальную скорость агрегации [10].

Результаты исследования обработаны статистически с помощью стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2007. Проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с помощью критерия Шапиро - Уилка. Результаты представлены медианой и межквартильными интервалами. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела - Уоллиса. Критический уровень значимости  $p$  для статистических критериев принимали равным 0,05.

## Результаты исследования и их обсуждение

При анализе спонтанной агрегации было выявлено достоверное по сравнению с контролем увеличение на 127% величины степени светопропускания при введении исследуемого соединения ЛХТ 5-10 в кювету агрегометра с обогащенной тромбоцитами плазмой за 10 минут до начала исследования. Введение препарата сравнения этамзилата также приводило к достоверному увеличению степени светопропускания на 127% по сравнению с контролем. При этом скорость агрегации по кривой светопропускания существенно не менялась при введении в кювету соединения ЛХТ 5-10, так же как и этамзилата.

На следующем этапе в кювету с ОТП, кроме ЛХТ 5-10 и этамзилата, вводили активаторы тромбоцитов. АДФ – мощный индуктор агрегации, который увеличивает содержание кальция в цитоплазме тромбоцита, изменяет его форму и тем самым повышает его готовность к адгезии и агрегации. При проведении АДФ-индуцированной агрегации с исследуемым веществом ЛХТ 5-10 было отмечено достоверное увеличение тромбоцитарных агрегатов на 23,3% по сравнению с контролем и ускорение степени агрегации по кривой светопропускания на 16,5%.

При введении индуктора агрегации АДФ в кювету с этамзилатом также было выявлено достоверное увеличение степени и скорости светопропускания соответственно на 27,6% и 20,7% по сравнению с контролем. Таким образом, было установлено, что величины степени и скорости агрегации тромбоцитов после введения АДФ у исследуемого соединения ЛХТ 5-10 и этамзилата являются сопоставимыми.

Коллаген - сильный стимулятор тромбоцитов, находящийся в субэндотелии сосудов и высвобождающийся при его повреждении. Оценка агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, показала, что введение ЛХТ 5-10 в кювету агрегометра не приводило к увеличению степени светопропускания и не оказывало влияния на скорость агрегации по кривой светопропускания. Введение препарата сравнения этамзилата в кювету с ОТП также не выявило достоверных изменений коллаген-индуцированной агрегации (табл. 1, 2).

Таблица 1

Значения показателей агрегации тромбоцитов по кривой светопропускания при добавлении ЛХТ 5-10 и этамзилата в кювету с плазмой, обогащенной тромбоцитами *in vitro*

Вид агрегации	Контроль Плазма обычная+ NaCl	Плазма+ ЛХТ 5-10, 10 <sup>-3</sup> М/л	Плазма+ Этамзилат, 10 <sup>-3</sup> М/л
<b>Максимальная степень агрегации, Lmax, %</b>			

Спонтанная агрегация	1,5 (1,1-2,3)	3,4 (2,8-5,4) *	3,4 (2,9-4,1) *
АДФ-индуцированная агрегация 0,5x10 <sup>-5</sup> М (2,5 мкг/мл)	39,5 (32,8-44,2)	48,7 (44,3-53,7)*	50,4 (45,3-55,9) *
Коллаген-индуцированная агрегация (20 мг/мл)	58,7 (43,8-66,5)	59,9 (47,5-70,2)	58,5 (44,4-64,8)
<b>Максимальная скорость агрегации, Vmax, %/мин</b>			
Спонтанная агрегация	1,7 (0,8-3,8)	2,2 (1,3-4,6)	2,1 (0,9-3,5)
АДФ-индуцированная агрегация 0,5x10 <sup>-5</sup> М (2,5 мкг/мл)	50,3 (45,1-54,3)	58,6 (55,6-63,2)*	60,7 (56,5-66,1) *
Коллаген-индуцированная агрегация (20 мг/мл)	56,8 (28,5-79,1)	48,7 (26,8-68,2)	48,8 (24,8-74,1)

Примечания: в таблице представлены медиана и межквартильный интервал (n=10),

\* - различия с контролем достоверны (p<0,05).

Таблица 2

Изменение спонтанной, АДФ-индуцированной и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов под влиянием ЛХТ 5-10 и этамзилата *in vitro*

Показатели	Изменение спонтанной агрегации, % к контролю	Изменения АДФ-индуцированной агрегации, % к контролю	Изменение коллаген-индуцированной агрегации, % к контролю
<b>ЛХТ 5-10, 10<sup>-3</sup> Моль/л</b>			
Lmax, %	127% *	23,3% *	-2%
Vmax, %/мин.	29,4%	16,5%*	-14,3%
<b>Этамзилат, 10<sup>-3</sup> Моль/л</b>			
Lmax, %	127%*	27,6%*	-0,3%
Vmax, %/мин.	23,5%	20,7%*	-14,1%

Примечание: \* - различия с контролем достоверны (p<0,05).

Таким образом, было установлено, что исследуемое вещество с лабораторным шифром ЛХТ 5-10 (в концентрации 10<sup>-3</sup> Моль/л) проявляет проагрегантную активность *in vitro*, сопоставимую с показателями проагрегантной активности препарата сравнения этамзилата (в концентрации 10<sup>-3</sup> Моль/л) по степени агрегации тромбоцитов при спонтанной агрегации, но при этом не влияет на скорость образования тромбоцитарных агрегатов, что также сравнимо с действием этамзилата. Вещество ЛХТ 5-10 достоверно усиливает (23,3%) и

ускоряет АДФ-индуцированную агрегацию (16,5%) по сравнению с контролем, но не влияет на степень и скорость коллаген-индуцированной агрегации. Этамзилат также оказывает положительное влияние на степень (27,6%) и скорость (20,7%) АДФ-индуцированной агрегации. При введении активатора тромбоцитов - коллагена, значимых эффектов влияния на агрегацию этамзилата (в концентрации  $10^{-3}$  Моль/л) найдено не было.

Полученные результаты позволяют рекомендовать новое производное гидрохинонсульфокислоты ЛХТ 5-10 для дальнейшего изучения *in vivo* и рассматривать его как потенциальное вещество для создания препаратов для лечения заболеваний, связанных с патологией свертывающей системы крови.

### **Выводы**

1. Исследуемое вещество под лабораторным шифром ЛХТ 5-10 и препарат сравнения этамзилат при спонтанной агрегации *in vitro* достоверно увеличивали степень агрегации тромбоцитов в 2,3 раза, влияния на скорость агрегации отмечено не было.

2. Под влиянием ЛХТ 5-10 ( $10^{-3}$  Моль/л) происходило достоверное увеличение тромбоцитарных агрегатов в 1,2 раза и ускорение их образования в 1,2 раза при введении индуктора агрегации АДФ ( $0,5 \times 10^{-5}$  М (2,5 мкг/мл)). При введении этамзилата АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов также усиливалась в 1,3 раза и ускорялась в 1,2 раза.

3. Достоверных изменений коллаген-индуцированной агрегации (20 мг/мл) под влиянием исследуемого вещества ЛХТ 5-10 и этамзилата отмечено не было.

### **Список литературы**

1. Володин Н.Н. Современные подходы к комплексной терапии перинатальных поражений ЦНС у новорожденных / Н.Н. Володин, С.О. Рогаткин // Фарматека. – 2004. – № 1. – С. 72-83.
2. Дегтев М.В. Способ криодеструкции бородавок и гемангиом с использованием этамзилата натрия / М.В. Дегтев, Е.В. Кожевников, В.А. Кожевников // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 1. – С. 69-72.
3. Демидова М.А. Исследование противоаллергической активности новых производных гидрохинонсульфокислоты / М.А. Демидова, С.Я. Скачилова, О.А. Судакова // Врач-аспирант. – 2011. – № 6.1 (49). – С. 163-168.
4. Судакова О.А. Исследование противовоспалительной активности новых производных гидрохинонсульфокислоты / О.А. Судакова, М.А. Демидова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. - URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5786> (дата обращения: 24.04.2018).

5. Антиоксидантный и прооксидантный эффекты арбутина и гидрохинона в эксперименте *in vitro* / Волобой Н.Л. [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10. - № 5. – С. 41-44.
6. Габбасов З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов // Лабораторное дело. – 1989. – № 10. – С. 15-18.
7. Рахматулина Д.М. Методы определения спонтанной агрегации тромбоцитов // Вестник современной клинической медицины. – 2017. – Т. 10. - № 3. – С. 60-65.
8. Клиническая лабораторная диагностика: учебник в 2 т. / ред. В.В. Долгов. – М.: ООО «Лабдиаг», 2018. – Т. 2. - 624 с.
9. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной активности тромбоцитов: учебное пособие / А.Л. Берковский, С.А. Васильев, Л.В. Жердева и др. – М.: Изд-во НПО «Ренам», 2004. – 28 с.
10. Некрасова Е.Г. Особенности сосудистого гемостаза, ассоциированного с сахарным диабетом у больных микозами стоп, и их лечение с коррекцией микроциркуляторных нарушений / Е.Г. Некрасова [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2011. – № 2. – С. 53-62.