

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-13-16

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС, ВЫЗВАННЫХ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ, СОЕДИНЕНИЕМ PIR-10

А. В. Воронков¹, Н. Б. Шабанова¹, М. П. Воронкова²

Нарушения антитромботической функции эндотелия сосудов вызывали моделированием окклюзии левой средней мозговой артерии у крыс-самцов линии Вистар. Первая группа — ложнопериоперированные особи, вторая — крысы негативного контроля. Животным третьей группе вводили препарат сравнения сулодексид (30 ЛЕ, единицы высвобождения липопротеинлипазы), четвертой — исследуемое соединение PIR-10 (50 мг/кг). Все изучаемые вещества вводили внутривенно сразу после операции и ежедневно однократно в течение 3 сут. Соединение PIR-10 в равной степени, в сравнении с сулодексидом, способствовало уменьшению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (степень на 53,63 % ($p < 0,05$), скорость на 62,94 % ($p < 0,05$)). Кроме того, данное соединение препятствовало гиперкоагуляционному сдвигу по параметрам: активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время — на 117,62 % ($p < 0,05$), 57,55 % ($p < 0,05$), 92,06 % ($p < 0,05$), соответственно, и вызывало уменьшение концентрации фибриногена в плазме крови на 42,39 % ($p < 0,05$) в сравнении с животными, не получавшими фармакологические вещества, соединение PIR-10 предотвращало нарушения антитромботической функции эндотелия в условиях церебральной ишемии крыс, не уступая препарату сравнения сулодексиду.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция; церебральная ишемия; ишемический инсульт; производное пиримидина; антитромботический потенциал эндотелия сосудов; плазменный гемостаз; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные нарушения широко распространены во многих странах мира [17]. Важную роль при нарушениях мозгового кровообращения играет эндотелиальная дисфункция [14]. При этом “сбой” работы сосудистого эндотелия приводит к увеличению агрегации, тромбообразования, гиперкоагуляционному сдвигу [6]. Исходя из этого, поиск церебропротекторных средств, способных корректировать возникающую эндотелиальную дисфункцию, является актуальной задачей. Ранее были проведены исследования нового производного пиримидин-4(1H)-она (соединение PIR-10) и установлено наличие у него церебропротекторной активности [7], что может предполагать существование у данного вещества антиагрегантных и антикоагулянтных свойств.

Целью исследования явилось изучение влияния соединения PIR-10 на показатели свертывающей систе-

мы крови крыс в условиях экспериментальной церебральной ишемии.

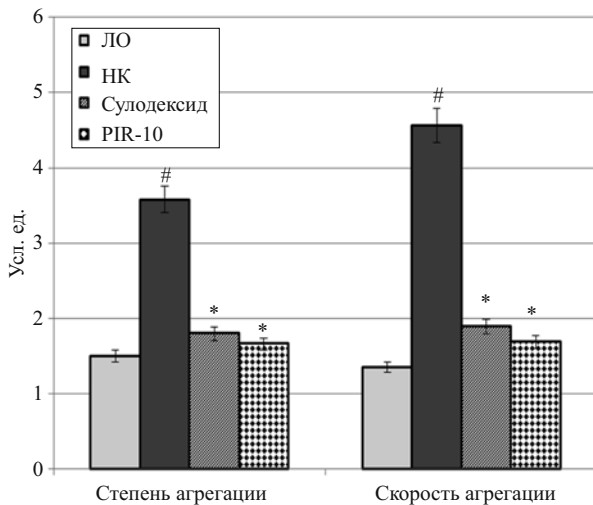
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные получены из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ. Исследование проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998) и лабораторной практики (GLP). В течение всего эксперимента крыс содержали при температуре окружающего воздуха (22 ± 2) °C и влажности (65 ± 5) % при естественном освещении. Крысы были размещены в клетках со стальными решетчатыми крышками и углублением для корма. В качестве подстилочного материала использовали автоклавированные нехвойные древесные опилки. Животные находились в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде. Один раз в неделю осуществляли смену клеток, поилок и подстилки.

Эксперименты осуществлены на 40 крысах-самцах линии Вистар массой 200 – 220 г, разделенных на 4

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ФГБОУ ВО “Волгоградский государственный медицинский университет”, Россия, 357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11.

² ФГБОУ ВО “Волгоградский медицинский университет” Минздрава РФ, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.



Влияние соединения PIR-10 и сулодексид на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии крыс.

Примечание: ЛО — группа ложнооперированных крыс; НК — группа крыс негативного контроля; Сулодексид — группа крыс, получавших сулодексид (30 ЛЕ); PIR-10 — группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50 мг/кг);

статистически достоверно относительно группы крыс ЛО ($p < 0,05$), t -критерий Стьюдента;

* статистически достоверно относительно группы крыс НК ($p < 0,05$), t -критерий Стьюдента.

равные группы по 10 особей. Первую группу составляли ложнооперированные (ЛО) животные. Вторая группа представлена особями негативного контроля (НК), получавшими внутрибрюшинно взвесь очищенной воды с твином-80. По данным литературы, эталонным препаратом, обладающим эндотелиопротекторной активностью, считают сулодексид [12], поэтому он был выбран в качестве препарата сравнения (Vessel Due F, ALFA WASSERMANN, Italy). Данный препарат относится к антикоагулянтам и представляет собой смесь гепариноида с дерматан сульфатом. Сулодексид в дозе 30 ЛЕ (единицы высвобождения липопротеин-липазы) вводили внутрибрюшинно третьей группе животных [5]. Животные четвертой группы получали производное пиримидин-4(1H)-она (4-{2-[2-(2-гидроксипрокси-3-метоксифенил)винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил}бутановая кислота) под лабораторным шифром PIR-10 (синтезированное на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института) в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно [8]. Исследуемое вещество, препарат сравнения и воду очищенную с твином-80 вводили внутрибрю-

шинно после операции и на протяжении 3 суток. Крысам всех групп, кроме первой, моделировали фокальную церебральную ишемию левосторонней окклюзией среднелобной артерии (ОЛСМА) специально сконструированным десмокоагулятором (под хлоралгидратным наркозом, 350 мг/кг) [10].

Через 72 ч после окклюзии ОЛСМА животных декапитировали с последующим забором крови для приготовления плазмы. Богатую тромбоцитами плазму для изучения антитромбогенного потенциала получали центрифугированием в режиме 1200 об/мин в течение 10 мин. Затем плазму центрифугировали повторно (3000 об/мин в течение 15 мин) с целью определения показателей коагуляционного гемостаза [4].

Оценку антитромботической функции сосудистого эндотелия проводили по способности тромбоцитов к агрегации. Степень и скорость агрегации тромбоцитов регистрировали двухканальным лазерным анализатором агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 “Биола” (НПФ “БИОЛА”, Россия) методом G. Vorn в модификации Габбасова [9]. В качестве индуктора агрегации был использован АДФ в концентрации 5 мкМ (набор “АГРЕНАМ”, НПО “РЕНАМ”).

Анализ коагуляционного звена гемостаза проводили анализатором гемостаза АПГ2-01 “МИНИЛАБ 701”. В качестве исследуемых показателей были выбраны: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), содержание фибриногена [2].

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США) и Microsoft Excel 2010. Результаты выражали в виде среднего и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро — Уилка. При нормальном распределении для сравнения средних использовали параметрический t -критерий Стьюдента, в случае ненормального распределения — U -критерий Мана — Уитни. Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных табл. 1, достоверных отличий по количеству тромбоцитов у животных всех экспериментальных групп не обнаружено, что может свидетельствовать об отсутствии влияния церебральной ишемии на процесс образования тромбоцитов.

Таблица 1. Содержание тромбоцитов в плазме крови крыс в условиях фокальной церебральной ишемии и ее коррекции соединением PIR-10 и сулодексидом ($M \pm m$)

Группа	ЛО	НК	Сулодексид, 30 ЛЕ	PIR-10, 50 мг/кг
PLT*10 ⁹ /л	434,83 ± 15,77	441,83 ± 17,08	430,17 ± 13,73	440,67 ± 12,17

Примечание: PLT — количество тромбоцитов; ЛО — группа ложнооперированных крыс; НК — группа крыс негативного контроля; Сулодексид — группа крыс, получавших сулодексид; PIR-10 — группа крыс, получавших субстанцию PIR-10.

У крыс группы ЛО показатели степени и скорости агрегации тромбоцитов составили $(1,50 \pm 0,08)$ и $(1,35 \pm 0,07)$ усл. ед., соответственно. На фоне экспериментально смоделированной фокальной ишемии мозга крыс наблюдали значительное повышение агрегации тромбоцитов. Так, у группы крыс НК степень агрегации увеличилась на 138,67 % ($p < 0,05$), по сравнению с ЛО-особями, а скорость — на 237,77 % ($p < 0,05$) (рисунок). Таким образом, недостаточность мозгового кровообращения, вызванная ОЛСМА, усиливает АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что подтверждают результаты проведенных ранее исследований [4]. После введения сулодексида рассчитанные показатели агрегации тромбоцитов оказались достоверно ниже: на 49,72 % при $p < 0,05$ (степень агрегации) и на 58,55 % ($p < 0,001$) (скорость агрегации) значений крыс группы НК. Полученные результаты согласуются с данными о наличии положительного антитромботического действия у сулодексида [11]. Аналогичная тенденция изменений антитромботического потенциала наблюдалась после введения соединения PIR-10, скорость и степень агрегации снизились на 62,94 % ($p < 0,05$) и 53,63 % ($p < 0,05$), соответственно, относительно данных оперированных крыс, не получавших фармакологическую поддержку. Данные результаты, вероятно, могут быть связаны с тем, что исследуемые вещества способны восстанавливать про/антиагрегантный дисбаланс и вследствие этого восстанавливать нарушенный антитромботический потенциал сосудистого эндотелия [13, 15].

Анализируя данные, полученные при оценке плазменного звена гемостаза, можно отметить уменьшение активированного частичного тромбопластинового времени на 64,72 % ($p < 0,05$), протромбинового времени на 43,69 % ($p < 0,05$), тромбинового времени на 67,86 % ($p < 0,05$), увеличение концентрации фибриногена 254,55 % ($p < 0,05$) у группы крыс, не подвергавшихся воздействию фармакологических веществ, в сравнении с ЛО-животными (табл. 2). Таким образом, фокальная церебральная ишемия приводит к гиперкоагуляционному сдвигу, который проявляется нарушением как эндогенного, так и экзогенного путей свертывания, а также третьей стадии плазменного ге-

мостаза, что, несомненно, усугубляет возникающую эндотелиальную дисфункцию, полученные результаты согласуются с литературными данными [1].

Применение сулодексида способствовало улучшению работы внешнего и внутреннего путей коагуляции, данный препарат сравнения приводил к увеличению АЧТВ на 153,18 % ($p < 0,05$) и ПВ на 63,38 % ($p < 0,05$) относительно показателей крыс группы НК. Тромбиновое время, характеризующее третью стадию коагуляционного гемостаза [1], увеличилось после приема сулодексида на 118,63 % ($p < 0,05$) в сравнении с особями группы НК. Также у крыс, получавших сулодексид, наблюдалась тенденция к уменьшению количества фибриногена на 47,18 % ($p < 0,05$) относительно животных НК. Полученные данные свидетельствуют об увеличении антикоагулянтной активности и уменьшении процессов фибринообразования у крыс, получавших сулодексид в условиях церебральной ишемии, и не противоречит результатам, полученным другими авторами [16]. Положительная тенденция изменений вторичного гемостаза наблюдалась на фоне внутрибрюшинного введения исследуемого соединения PIR-10. АЧТВ группы крыс, получавших PIR-10, составило $(28,77 \pm 0,50)$, что на 117,62 % ($p < 0,05$) превышает показатель группы НК. Также у данной группы животных отмечали достоверное повышение периода ПВ на 57,55 % ($p < 0,05$) и ТВ на 92,06 % ($p < 0,05$) и уменьшение уровня фибриногена на 42,39 % ($p < 0,05$) в сравнении с крысами НК. Статистически значимых отличий между группами животных, получавших сулодексид и соединение PIR-10, не обнаружено, что свидетельствует о наличии положительного эффекта в отношении разных звеньев коагуляционного гемостаза у изученного соединения, сопоставимого с сулодексидом.

ВЫВОДЫ

1. В результате окклюзии левой средней мозговой артерии наблюдается рост степени и скорости агрегации тромбоцитов на 138 и 237 % и изменение некоторых показателей коагуляционного гемостаза: уменьшение АЧТВ на 64,72 %, ПВ — на 43,69 %, ТВ — на 67,86 %, увеличение уровня фибриногена в плазме

Таблица 2. Влияние соединения PIR-10 и сулодексида на показатели плазменного гемостаза в условиях фокальной церебральной ишемии крыс ($M \pm m$)

Группа	АЧТВ, с	ПВ, с	ТВ, с	Фибриноген, г/л
ЛО	$37,47 \pm 1,43$	$24,10 \pm 0,74$	$20,38 \pm 0,86$	$1,65 \pm 0,10$
НК	$13,22 \pm 1,14^{\#}$	$13,57 \pm 0,50^{\#}$	$6,55 \pm 0,51^{\#}$	$5,85 \pm 0,39^{\#}$
Сулодексид	$33,47 \pm 1,35^*$	$22,17 \pm 0,73^*$	$14,32 \pm 0,88^*$	$3,09 \pm 0,16^*$
PIR-10	$28,77 \pm 0,5^*$	$21,38 \pm 0,60^*$	$12,58 \pm 1,32^*$	$3,37 \pm 0,13^*$

Примечание: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, с; ПВ — протромбиновое время, с; ТВ — тромбиновое время, с; Фибриноген — концентрация фибриногена (г/л); ЛО — группа ложнооперированных крыс; НК — группа крыс негативного контроля; Сулодексид — группа крыс, получавших сулодексид (30 ЛЕ); PIR-10 — группа крыс, получавших субстанцию PIR-10 (50 мг/кг); $^{\#}$ статистически значимо относительно группы крыс ЛО ($p < 0,05$), t -критерий Стьюдента; * статистически значимо относительно группы крыс НК ($p < 0,05$), t -критерий Стьюдента.

крови на 254,55 % по сравнению с ЛО животными ($p < 0,05$).

2. Соединение PIR-10 в дозе 50 мг/кг, вводимое внутрибрюшинно сразу после моделирования патологии и в течение 3 сут однократно ежедневно, вызывает достоверное снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов на 53,63 % ($p < 0,05$) и 62,94 % ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК, кроме того, полученные данные статистически значимо не отличаются от значений ЛО животных и крыс, которым вводили препарат сравнения сулодексид (30 ЛЕ).

3. Соединение PIR-10 в дозе 50 мг/кг, вводимое внутрибрюшинно сразу после моделирования патологии и в течение 3 сут однократно ежедневно, вызывает увеличение АЧТВ, ПВ, ТВ на 117,62 % ($p < 0,05$), 57,55 % ($p < 0,05$), 92,06 % ($p < 0,05$), соответственно, и уменьшает концентрацию фибриногена до ($3,37 \pm 0,13$) г/л — на 42,39 % ($p < 0,05$) относительно группы животных НК. Значимых отличий у крыс после введения PIR-10 в дозе 50 мг/кг относительно ЛО крыс и животных, которым вводили препарат сравнения сулодексид 30 (ЛЕ), не наблюдали.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. М. Анищенко, О. И. Алиев, Т. М. Плотникова, *Сиб. науч. мед. ж.*, **33**(4), 30 – 34 (2013).
2. З. С. Баркаган, А. П. Момот, *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза*, Ньюдиамед, Москва (2008).
3. А. В. Воронков, *Автореф. дис. д-ра. мед. наук*, Волгоград (2011).
4. А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, *Тромбоз, гемостаз и реол.*, **70**(2), 73 – 78 (2017).
5. А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, А. В. Мамлеев, А. В. Арльт, *Здоровье и образ. в XXI веке*, **19**(8), 181 – 184 (2017).
6. А. В. Воронков, Э. Т. Оганесян, Д. И. Поздняков и др. *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(2), 16 – 20 (2017).
7. А. В. Воронков, Н. Б. Шабанова, И. П. Кодониди, И. С. Шаталов, *Фармация и фармакол.*, **6**(2), 167 – 181 (2018).
8. А. В. Воронков, Н. Б. Шабанова, Д. И. Поздняков и др., *Соврем. пробл. науки и образ.*, № 5; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26738> (дата обращения: 12.07.2018) (2017).
9. З. А. Габбасов, Е. Г. Попов, И. Ю. Гаврилов и др., *Лаб. дело*, **10**, 15 – 18 (1989).
10. Л. Е. Назарова, И. Н. Дьякова, *Мед. вестник Башкортостана*, № 3, 133 – 135 (2011).
11. И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слиецанс и др., *Фармация*, № 4, 34 – 36 (2012).
12. И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слиецанс и др., *Сax. диабет*, № 3, 12 – 15 (2011).
13. Н. Chen, G. Li, P. Zhan, X. Liu, *Eur. J. Med. Chem.*, **46**(11), 5609 – 5615 (2011).
14. A. S. Go, D. Mozaffarian, V. L. Roger, et al., *Circulation*, **127**(1), 143 – 152 (2013).
15. S. Y. Kim, Y. K. Koo, J. Y. Koob et al., *J. Med. Food*, **13**(5), 1069 – 1074 (2010).
16. V. Masola, G. Zaza, M. Onisto, et al., *Int. Angiol.*, **33**(3), 243 – 254 (2014).
17. M. Roy-O'Reilly, L. D. McCullough, *Exp. Neurol.*, **259**, 16 – 27 (2014).

Поступила 29.04.19

PIR-10 ADMINISTRATION FOR CORRECTION OF BLOOD COAGULATION SYSTEM INDUCED BY CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

A. V. Voronkov¹, N. B. Shabanova¹, and M. P. Voronkova²

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, prosp. Kalinina 11, Pyatigorsk, 357532 Russia

² Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131 Russia

Violations of the antithrombotic vascular endothelial function were caused by modeling occlusion of the left middle cerebral artery in male Wistar rats. The first control group contained false operated animals, the second group consisted of untreated rats (negative control), animals of the third (reference) group were injected with standard drug sulodexide (30 EVL, units of lipoprotein lipase release), and rats of the fourth (test) group were treated with the new pyrimidin-4(1H)-yl derivative PIR-10 (50 mg/kg). All studied substances were administered i.p. for three days after surgical manipulation. The test compound PIR-10 contributed equally with sulodexide to the reduction of ADP-induced platelet aggregation degree (by 53.63%, $p < 0.05$) and rate (by 62.94%, $p < 0.05$). In addition, PIR-10 prevented hypercoagulation shift due to increase in ACTV, PV, TV by 117.62%, 57.55%, 92.06% ($p < 0,05$), respectively, and decrease in fibrinogen concentration by 42,39% ($p < 0,05$) as compared to the values for untreated animals. Thus, compound PIR-10 prevented violations of the antithrombotic function of endothelium and was not inferior to reference drug sulodexide under conditions of cerebral ischemia model in rats.

Keywords: endothelial dysfunction; cerebral ischemia; ischemic stroke; pyrimidine derivatives; antithrombotic potential; plasma hemostasis; rats.