

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-7-10-13

АНТИАГРЕГАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИНОНА

В. В. Быков^{1, 3*}, Г. А. Чернышева², В. И. Смольякова²,
В. Ю. Серебров¹, В. А. Хазанов³, В. В. Удут²

Изучена специфическая активность антиагрегантного средства индолинонового ряда (GRS) на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* и *in vivo* и на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс. В качестве препарата сравнения использована (АСК) и дипиридамол. У GRS в опыте *in vitro* в широком диапазоне концентраций ($0,75 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, $p < 0,05$) отмечается антиагрегантная активность, сопоставимая с таковой у ацетилсалициловой кислоты и дипиридамола. В опытах *in vivo* показана дозозависимая антиагрегантная активность GRS в дозах 2,5 – 20 мг/кг (21 – 14 %). Увеличение дозы GRS выше 10 мг/кг не приводит к увеличению антиагрегантной активности. При курсовом внутривенном введении в дозе 10 мг/кг GRS обладал антиагрегантной активностью у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, что проявлялось снижением амплитуды агрегации тромбоцитов до значений в интактной группе ($p < 0,05$).

Ключевые слова: антиагрегант; производное индолинона; ацетилсалициловая кислота; дипиридамол; GRS; агрегация тромбоцитов.

ВВЕДЕНИЕ

Антиагрегантная терапия является важнейшей частью профилактики тромботических осложнений [6]. Однако в последние годы на первый план, наряду с побочными эффектами ацетилсалициловой кислоты (АСК) и клопидогреля, выходит проблема резистентности к антиагрегантным средствам [3]. Согласно современным рекомендациям «двойная» антиагрегантная терапия состоит из комбинации аспирина и клопидогреля, к которым часто возникает резистентность. Так, число пациентов, у которых может наблюдаться резистентность к АСК и клопидогрелю, по данным разных авторов, составляет от 15 до 40 % [4, 7]. В основе возникновения резистентности к комбинированной терапии АСК и клопидогрелем лежат изменения биодоступности; изменяющаяся чувствительность тромбоцитов к АДФ и коллагену; увеличение поступления в тромбоциты простагландина H_2 из клеток эндотелия и моноцитов; нарастание числа молодых реактивных форм тромбоцитов (для АСК) и изменение их функционального состояния при некоторых заболеваниях (например, сахарном диабете); различия функционального состояния печени (клопидогрель – проле-

карство); генетический полиморфизм циклооксигеназы и ферментов монооксигеназной системы [9, 10, 12, 13]. Решение проблемы резистентности к применяемым в медицинской практике антиагрегантам в том числе связано с созданием препаратов с новым механизмом действия. Перспективным в этом отношении является соединение GRS — производное индолинона. Представители данного класса веществ являются индукторами цитозольной гуанилатциклазы [11].

Цель работы — исследование влияния нового соединения GRS на агрегацию тромбоцитов в опытах *in vitro* и *in vivo* на интактных животных и с экспериментальным сахарным диабетом [5].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исследуемого вещества использовали субстанцию GRS (2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1Н-индол-3(2H)-он) (рис. 1).

Опыты проведены на 67 аутбредных крысах-самцах линии Вистар массой 300 – 350 г. Животные были получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ имени Е. Д. Гольдберга. Содержание животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Крыс содержали в стандартных пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки по 5 особей в клетке. Температура воздуха в виварии была 20 – 23 °С, влажность — не более 50 %, объем воздухообмена (вытяжка: приток) — 8:10, световой режим (день : ночь) — 1:1. Кормление животных осу-

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации», Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2.

² Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга, Россия, 634034, Томск, ул. Ленина, 30.

³ Инновационные фармакологические разработки, Россия, 634021, Томск, ул. Елизаровых, 79/4.

* e-mail: preclin5_dep@iphar.ru

ществляли в соответствии с регламентирующими документами по содержанию животных [2].

Первая серия экспериментов *in vivo* проведена на 40 здоровых крысах (по 5 животных в группе). Препараты получали 5 групп однократно внутрижелудочно в виде взвеси в 1 мл 1 % крахмальной слизи: GRS в дозах 1, 2,5, 5, 10 и 20 мг/кг, следующие 2 группы — АСК и дипиридамола в дозах 10 мг/кг соответственно [8] однократно внутрижелудочно в виде взвеси в 1 мл 1 % крахмальной слизи. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Через 3 ч после введения препаратов проводили забор крови.

Во второй серии у животных моделировали сахарный диабет однократным введением стрептозотоцина в дозе 40 мг/кг в виде раствора в 1 мл цитратного буфера (рН 4,0). Эксперименты выполнены на 15 крысах, из них 10 вводили стрептозотоцин, другие 5 оставались интактными. Уровень глюкозы в крови контролировали с помощью тест-полосок на глюкометре SmartScan (Lifescan, США) до и спустя 3 сут после введения стрептозотоцина. Опытной группе ($n = 5$) в течение 7 сут внутрижелудочно вводили GRS в дозе 10 мг/кг (в предварительных экспериментах на интактных животных доза 10 мг/кг была определена как минимальная эффективная) в виде взвеси в 1 мл 1 % крахмальной слизи. В эксперимент отбирались животные со значениями концентрации глюкозы свыше 10 ммоль/л. Животные контрольной ($n = 5$) и интактной ($n = 5$) групп в те же сроки получали эквивалентное количество 1 % крахмальной слизи. Последнее введение осуществляли за 3 ч до забора крови.

В опытах *in vitro* GRS вносили в плазму 12 интактных крыс-доноров за 10 мин до начала агрегации в конечных концентрациях $0,75 \cdot 10^{-7}$ М, $0,75 \cdot 10^{-6}$ М, $0,75 \cdot 10^{-5}$ М и $1,5 \cdot 10^{-5}$ М. Препараты сравнения АСК и дипиридамола также вносили в плазму за 10 мин до начала агрегации в конечных концентрациях $0,75 \cdot 10^{-5}$ М и $1,5 \cdot 10^{-5}$ М [8]. В качестве растворителя GRS и дипиридамола использовали диметилсульфоксид (ДМСО), для АСК — воду.

Для проведения экспериментов по оценке антиагрегантных эффектов исследуемых веществ кровь у животных забирали из общей сонной артерии под эфирным наркозом. В качестве стабилизатора использовали 3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении с кровью 1:9 по объему. Агрегацию тромбоцитов определяли нефелометрическим методом по Born. Получение богатой (БТП) и бедной (БеТП) тромбоцитами плазмы и подсчет числа тромбоцитов выполняли по стандартному методу [1]. После определения числа тромбоцитов в БТП проводили стандартизацию числа тромбоцитов, для чего БТП разводили необходимым количеством БеТП до (400 ± 30) тыс. тромбоцитов в 1 мм^3 в пробе. Агрегацию тромбоцитов оценивали в стандартизованной плазме на приборе АТ-02 (Россия), агрегатограм-

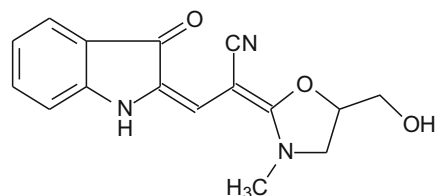


Рис. 1. Структурная формула GRS.

мы регистрировали самописцем Recorder 2210 (Швеция), выражали в процентах. За 100 % принимали значение оптической плотности для БТП, за 0 % — значение оптической плотности для БеТП. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ (“Sigma”, США) в конечной концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М.

По завершению экспериментов эвтаназию животных вызывали ингаляцией CO_2 .

Для статистической обработки данных использовали пакет программного обеспечения «R». Данные были представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий ($p < 0,05$) между сериями определяли с помощью *U*-теста Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование антиагрегантной активности GRS в опыте *in vitro* показало дозозависимый эффект исследуемого соединения. GRS в концентрациях $0,75 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М достоверно на 20 – 40 % снижал агрегацию тромбоцитов по сравнению с контролем, а в концентрациях $0,75 \cdot 10^{-5}$ М и $1,5 \cdot 10^{-5}$ М не уступал по эффективности дипиридамолу (табл. 1). Однако следует отметить, что в опыте *in vitro* GRS уступает по эффективности АСК. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов после инкубации с GRS была на 42 и 66 % выше агрегации после инкубации с АСК, соответственно, в концентрациях $0,75 \cdot 10^{-5}$ М и $1,5 \cdot 10^{-5}$ М.

GRS после однократного внутрижелудочного введения интактным крысам в дозах 2,5; 5; 10 и 20 мг/кг проявлял выраженную антиагрегантную активность. В диапазоне доз от 2,5 до 20 мг/кг амплитуда агрегации тромбоцитов была ниже контрольных значений на 19 – 46 %. По выраженности изучаемого эффекта GRS сопоставим с АСК и дипиридамолом (рис. 2). В диапазоне доз GRS от 1 до 5 мг/кг наблюдается дозозависимое снижение агрегации тромбоцитов, при повышении вводимой дозы от 5 до 20 мг/кг изменений в эффекте препарата не выявлено.

Исходные значения концентрации глюкозы в цельной крови крыс до введения стрептозотоцина в среднем составляли $(6,7 \pm 0,1)$ ммоль/л. К 3 сут после введения стрептозотоцина концентрация глюкозы в крови животных контрольной и опытной групп составляла $(16,1 \pm 1,1)$ и $(16,9 \pm 1,6)$ ммоль/л, соответственно. К концу эксперимента (10 сут) перед забором крови кон-

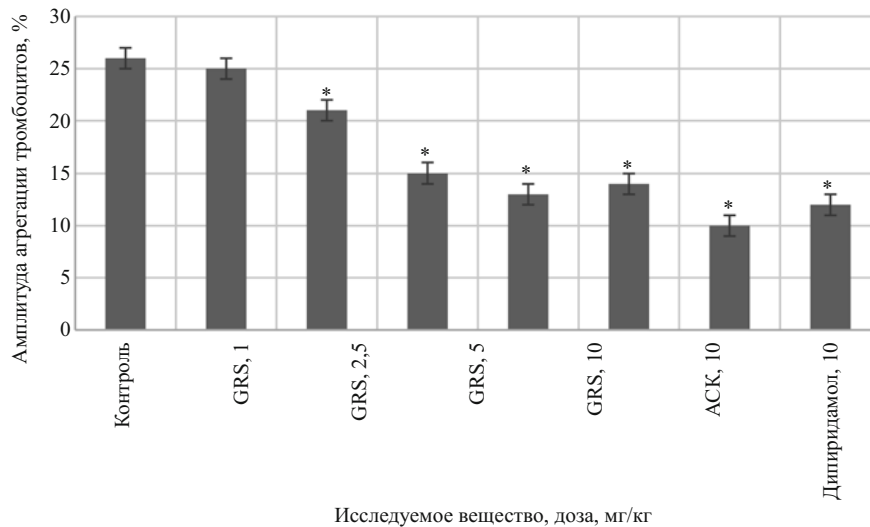


Рис. 2. Влияние однократного внутрижелудочного введения крысам GRS (в дозах 1; 2,5; 5; 10 и 20 мг/кг), АСК (в дозе 10 мг/кг) и дипиридамола (в дозе 10 мг/кг) на агрегацию тромбоцитов (индуктор агрегации АДФ в конечной концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М). 100 % — значение оптической плотности для БТП, 0 % — значение оптической плотности для БетП.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

центрация глюкозы в цельной крови крыс равнялась в контрольной группе ($22,7 \pm 1,6$) ммоль/л, а в опытной — ($20,0 \pm 2,7$) ммоль/л. Таким образом, на модели стрептозотцин-индуцированного сахарного диабета к 7 сут возникла выраженная гипергликемия (табл. 2).

У крыс со стрептозотцин-индуцированным сахарным диабетом к 10 сут наблюдается значимое повышение агрегационной способности тромбоцитов на 56 %, по сравнению с интактными животными. GRS при курсовом внутрижелудочном введении в дозе 10 мг/кг крысам со стрептозотцин-индуцированным сахарным диабетом проявлял антиагрегантную активность, снижая на 25 % амплитуду агрегации тромбоцитов, по сравнению с контрольной группой. Значения амплитуды агрегации тромбоцитов в опытной группе

после курсового введения GRS статистически значимо не отличались от таковых в интактной группе.

Хроническая гипергликемия при сахарном диабете изменяет функциональное состояние тромбоцитов за счет гликирования их поверхностных белков, вызывая увеличение экспрессии гликопротеинов Ib и IIb/IIIa [15]. Диабетическая ангиопатия сопровождается повреждением клеток эндотелия и увеличением адгезии к нему тромбоцитов [14].

В литературе имеются данные о веществе риоцигуат — активаторе растворимой гуанилатциклазы, которое обладает антиагрегантным эффектом [17].

GRS обладает подобным механизмом действия: повышая активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов, увеличивает в них концентрацию цГМФ, который активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу (цГМФ-ПК). цГМФ-ПК в свою очередь активирует фосфорилированием стимулирующий вазодилатацию фосфопротеин (VASP). VASP инактивирует гликопротеин IIb/IIIa [14], что препятствует адгезии тромбоцитов к стенке поврежденного сосуда. Так же VASP ремоделирует актин цитоскелета тромбоцита

Таблица 1. Влияние растворителя (ДМСО), GRS, АСК и дипиридамола в разных концентрациях на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* ($M \pm m$)

Группа	Амплитуда агрегации тромбоцитов, %
Контроль	25 ± 1
ДМСО	23 ± 1
GRS	
$0,75 \cdot 10^{-7}$ М	22 ± 1
$0,75 \cdot 10^{-6}$ М	$20 \pm 1^*$
$0,75 \cdot 10^{-5}$ М	$17 \pm 1^{* \#}$
$1,5 \cdot 10^{-5}$ М	$15 \pm 1^{* \#}$
АСК	
$0,75 \cdot 10^{-5}$ М	$12 \pm 1^*$
$1,5 \cdot 10^{-5}$ М	$9 \pm 1^*$
Дипиридамола	
$0,75 \cdot 10^{-5}$ М	$16 \pm 1^*$
$1,5 \cdot 10^{-5}$ М	$13 \pm 1^*$

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями контроля; # $p < 0,05$ по сравнению с АСК в аналогичных концентрациях.

Таблица 2. Влияние курсового (7-кратного) внутрижелудочного введения GRS (10 мг/кг) на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов у крыс с моделью стрептозотцин-индуцированного сахарного диабета ($M \pm m$)

Группа	Количество тромбоцитов, тыс./мл	Амплитуда агрегации тромбоцитов, %
Интактные животные ($n = 5$)	658 ± 19	23 ± 2
Контроль ($n = 5$)	661 ± 13	$36 \pm 2^*$
GRS ($n = 5$)	651 ± 13	27 ± 2

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями интактных животных.

[16]. Это препятствует его активации, в том числе от АДФ. Данный механизм действия GRS делает его уникальным препаратом в ряду антиагрегантных средств и указывает на возможную эффективность применения GRS для антиагрегантной терапии различных клинических состояний, сопровождающихся гиперагрегацией тромбоцитов.

Таким образом, GRS является перспективным соединением для разработки антиагрегантного лекарственного препарата с новым механизмом действия.

ВЫВОДЫ

1. В опытах *in vitro* GRS проявляет выраженную антиагрегантную активность в диапазоне концентраций ($0,75 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-5}$ М, $p < 0,05$).

2. В опытах *in vivo* на интактных крысах после однократного внутривенного введения GRS была показана дозозависимая антиагрегантная активность соединения в диапазоне доз 2,5 – 20 мг/кг, сопоставимая с таковой у дипиридамола и АСК ($p < 0,05$).

3. GRS в дозе 10 мг/кг в курсовом (10-дневном) применении проявляет антиагрегантный эффект у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, снижая амплитуду агрегации тромбоцитов до значений в интактной группе ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. З. С. Баркаган, А. П. Момот, *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза*, Ньюдиамед, Москва (2001).

- Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачев, *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях*, Профиль, Москва (2003).
- Е. С. Кропачева, *Атеротромбоз*, № 2, 115 – 129 (2018).
- С. Ю. Марцевич, *Рац. фармакотер. в кардиол.*, **6**(4), 607 – 609 (2010).
- А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва (2013).
- Л. В. Попова, М. Б. Аксенова, Т. В. Хлевчук, *Клин. мед.*, № 10, 729 – 736 (2016).
- О. В. Сироткина, Т. В. Вавилова, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 2, 3 – 15 (2007).
- S. Ashida, K. Sakum, Y. Abiko, *Thromb. Res.*, **17**(5), 663 – 671 (1980).
- W. H. Chen, P. Y. Lee, W. Ng, et al., *J. Am. College Cardiol.*, **43**(6), 1122 – 1126 (2004).
- J. W. Eikelboom, J. Hirsh, J. I. Weitz, et al., *Circulation*, **105**(14), 1650 – 1655 (2002).
- V. G. Granik, S. Yu. Ryabova, N. B. Grigor'ev, *Rus. Chem. Rev.*, **66**(8), 717 – 731 (1997).
- K. Grundmann, K. Jaschonek, B. Kleine, et al., *Neurol. J.*, **25**(1), 63 – 66 (2003).
- S. Guthikonda, E. I. Lev, R. Patel, et al., *J. Thrombosis Haemostasis*, **5**(3), 490 – 496 (2007).
- R. Kaur, M. Kaur, J. Singh, *Cardiovasc. Diabetol.*, **17**(1), 121 (2018).
- M. Razmara, P. Hjemdahl, C. G. Ostenson, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **6**(12), 2186 – 2192 (2008).
- M. Reinhard, T. Jarchau, U. Walter, *Trends in Biochem. Sci.*, **26**(4), 243 – 249 (2001).
- C. Reiss, I. Mindukshev, V. Bischoffl, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **172**(21), 5199 – 5210 (2015).

Поступила 07.06.19

ANTIPLATELET ACTIVITY OF A NEW INDOLINONE DERIVATIVE

V. V. Bykov^{1,2*}, G. A. Chernysheva³, V. I. Smolyakova², V. Yu. Serebrov¹, V. A. Khazanov², and V. V. Udut³

¹ Siberian State Medical University, Moskovskii tract 2, Tomsk, 634050 Russia

² Innovative Pharmacology Research & Development LLC, ul. Elizarovykh 79/4, Tomsk, 634021 Russia

³ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 30, Tomsk, 634028, Russia

* e-mail: preclin5dep@iphar.ru

Specific activity of a new antiplatelet drug of indolinone series (codenamed GRS) was studied *in vitro* on the model of ADP-induced platelet aggregation and *in vivo* on a model of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. Acetylsalicylic acid and dipyridamole were used as reference drugs. *In vitro* tests demonstrated that GRS exhibited antiplatelet activity in a wide range of concentrations ($0,75 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-5}$ М, $p < 0,05$), being comparable in the activity to both acetylsalicylic acid and dipyridamole. *In vivo* tests showed dose-dependent antiplatelet activity of GRS in doses of 2.5 – 20 mg/kg (21 – 14%). Increasing the dose of GRS above 10 mg/kg did not improve its antiplatelet activity. After multiple oral administration at 10 mg/kg dose in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, GRS exhibited antiplatelet activity by reducing the platelet aggregation rate to a level observed in the control group ($p < 0,05$).

Keywords: antiplatelet agent; indolinone derivative; acetylsalicylic acid; dipyridamole; GRS; platelet aggregation.