

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 4-ХЛОРФЕНИЛ-2-ГИДРОКСИ-4-ОКСО-2-БУТЕНОАТА И ГЕПАРИНА НА СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

А. В. Старкова, Ф. В. Собин, Б. Я. Сыропятов, Н. А. Пулина

Цель работы — исследование влияния на свертывание цельной крови кроликов 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноата (ФС 169) и гепарина *in vitro* и *in vivo*. Исследование проводили с помощью коагулометра Минилаб 701. Использовали цитратную (3,8 %) кровь беспородных кроликов в объемном соотношении 9:1. При исследовании *in vivo* гепарин и соединение ФС 169 вводили подкожно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФС 169 *in vitro* снижает свертываемость крови в 3,8 раза, *in vivo* в дозе, составляющей 1/40 от ЛД₅₀, через 30 мин после введения — в 2 раза. Эффект при подкожном введении сохранялся на протяжении 2 ч. Активность вещества ФС 169 *in vitro* и *in vivo* сопоставима с активностью гепарина.

Ключевые слова: 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноат; гепарин; Минилаб 701

ВВЕДЕНИЕ

Показанием к применению гепарина является склонность к тромбообразованию. Его широко применяют в хирургической и терапевтической практике. Основным недостатком препарата является отсутствие достоверных сведений о выраженности эффекта. Отсюда необходимость частых повторных определений показателей гемостаза. При использовании гепарина возможны реакции в местах инъекций (уплотнение, раздражение, боль, гематома, некрозы кожи), головная боль, озноб, гипертермия, тошнота, рвота, запор. При применении препарата более 3 дней могут развиваться иммунная тромбоцитопения и остеопороз, существует риск возникновения гиперкалиемии за счет угнетения синтеза альдостерона, усиление тромбообразования после отмены препарата [3]. Поэтому поиск новых соединений, обладающих прямой антикоагулянтной активностью является актуальным.

В результате скрининговых исследований веществ, синтезируемых в Пермской государственной фармацевтической академии, было выявлено вещество 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноат, которое *in vitro* значительно удлиняет время свертывания цитратной крови собак [4].

Целью работы стало исследование влияния 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноата (ФС 169) и гепарина на свертывание цельной крови кроликов *in vitro* и *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили с помощью коагулометра Минилаб 701. Использовали цитратную (3,8 %) кровь беспородных кроликов в объемном соотношении 9:1.

Для определения активности *in vitro* в кювету помещали 100 мкл крови и добавляли 100 мкл 0,2 % рас-

твора соединения ФС 169, для контроля вместо вещества добавляли 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия или гепарина. Гепарин использовали в концентрации 1 ЕД/мл крови. Затем пробы инкубировали в течение 60 с. Добавляли 100 мкл 1 % раствора хлорида кальция и приступали к измерению времени свертывания в секундах [1].

Исследования *in vivo* проведены на беспородных кроликах весом 2 – 4 кг. Общее количество используемых кроликов — 33. ФС 169 вводили подкожно в дозе 35 мг/кг (1/40 ЛД₅₀). Забор крови проводили 5 раз — до введения вещества и через 30, 60, 90, 120 мин после введения соединения. Гепарин вводили подкожно в дозе 60 ЕД/кг или 1 ЕД/мл крови, так как объем циркулирующей крови у кроликов равен 60 мл/кг [6]. Забор крови производили 5 раз — до введения и через 30, 60, 90, 120 мин после введения гепарина. Для определения времени свертывания в кювету помещали 100 мкл крови и добавляли 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия. Затем пробы инкубировали в течение 60 с. Добавляли 100 мкл 1 % раствора хлорида кальция и приступали к измерению времени свертывания в секундах [1].

Номер протокола этического комитета, утвердившего план исследования № 67 от 4.10.2012 г.

Результаты обработаны с помощью вариационной статистики по методу Фишера-Стьюдента [2].

Таблица 1. Влияние соединения ФС 169 и гепарина на время свертывания крови *in vitro*

Исследуемое вещество	Время свертывания, с		Количество исследований	p
	контроль	опыт		
ФС 169	141,3 ± 7,2	540,1 ± 88,8	6	< 0,01
Гепарин	145,7 ± 9,6	618,3 ± 55,8	9	< 0,001

p — в сравнении с контролем.

¹ Кафедра физиологии (зав. — проф. Б. Я. Сыропятов) Пермская государственная фармацевтическая академия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2.

Таблица 2. Влияние соединения ФС 169 на время свертывания крови *in vivo* ($n = 8$)

Интервал	Время свертывания, с	p
Исходная свертываемость	128,4 ± 3,92	
30 мин	260,6 ± 17,76	< 0,001
60 мин	241,7 ± 9,81	< 0,001
90 мин	228,1 ± 14,00	< 0,001
120 мин	158,9 ± 10,22	< 0,05

p — в сравнении с исходной свертываемостью.
 n — количество исследований.

Таблица 3. Влияние гепарина на время свертывания крови *in vivo* ($n = 10$)

Интервал	Время свертывания, с	p
Исходная свертываемость	141,8 ± 5,16	
30 мин	255,0 ± 13,59	< 0,001
60 мин	282,7 ± 13,00	< 0,001
90 мин	320,9 ± 37,83	< 0,001
120 мин	206,7 ± 16,58	< 0,01

p — в сравнении с исходной свертываемостью.
 n — количество исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании *in vitro* были получены следующие результаты (табл. 1).

Как видно из табл. 1, ФС 169 *in vitro* в 3,8 раз удлиняет время свертывания крови. Его эффективность сопоставима с уровнем эффективности гепарина.

Определение острой токсичности соединения ФС 169 проведено на беспородных мышах массой 18 – 28 г при подкожном введении [5]. ЛД₅₀ равна 1290 (1100 – 1500) мг/кг. Согласно ГОСТ 12.1007–76, соединение относится к 3 классу токсичности, то есть является умеренно токсичным.

Как видно из табл. 2, вещество ФС 169 при подкожном введении достаточно быстро всасывается и вызывает снижение свертываемости крови в 2 раза от исходного уровня уже через 30 мин. Активность сохраняется около 2 ч.

Максимальный эффект гепарина, как видно из табл. 3, отмечается на 90 мин после введения и составляет 2,3 от исходного уровня времени свертывания крови. Продолжительность действия составила 2 ч.

ВЫВОД

4-Хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноат снижает свертываемость крови в 3,8 раза *in vitro*, а в 2 раза *in vivo*. Вещество обладает умеренной токсичностью,

быстро всасывается при подкожном введении, снижает свертываемость крови *in vivo* в дозе, составляющей 1/40 от ЛД₅₀. Максимальный эффект наблюдается через 30 мин после введения. Эффективность при подкожном введении сохраняется на протяжении 2 ч, что сопоставимо с эффективностью гепарина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализатор показателей гемостаза МИНИЛАБ 710. Техническое описание и инструкция по эксплуатации, А / О Юни-мед, Москва (2002).
2. Е. В. Гублер, *Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов*, Медицина, Ленинград (1978).
3. *Методические рекомендации по профилактике тромбозмических осложнений в травматологии и ортопедии*, Ю. Л. Шевченко (ред.), Москва (2006).
4. Патент на изобретение № 2461550 Пулина Н. А., Сыропятов Б. Я., Собин Ф. В., Ковалева М. Ю., Антонов С. Г., Вахрин М. И., *4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноат, обладающий антикоагулянтной активностью*, 20.09.2012.
5. В. В. Прозоровский, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 497 – 502 (1978).
6. И. М. Трахтенберг, Р. Е. Сова, В. О. Шефтель, Ф. А. Оникиенко, *Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте*, Медицина, Москва (1978).

Поступила 12.03.13

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF 4-CHLOROPHENYL-2-HYDROXY-4-OXO-2-BUTENOATE AND HEPARIN ON BLOOD COAGULATION

A. V. Starkova, F. V. Sobin, B. Ya. Syropyatov, and N. A. Pulina

Department of Physiology, Perm State Pharmaceutical Academy, ul. Polevaya 2, Perm, 614990, Russia

The purpose of this work investigation to study the effect of 4-chlorophenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoate (thiazoline ammonium butenoate, compound FS 169) and heparin on the coagulation of whole rabbit blood *in vitro* and *in vivo*. The effects of heparin and FS 169 were investigated using a Minilab 701 coagulometer. Citrated (3.8%) blood of outbred rabbits was used in a volumetric ratio of 9 : 1. In the experiments *in vivo*, heparin and FS 169 were introduced subcutaneously. The results showed that FS 169 *in vitro* reduced the blood clotting time 3.8 times; *in vivo*, this compound in a dose of 1/40 LD₅₀ decreased the clotting time 2 times within 30 min after introduction. The drug effect upon subcutaneous administration lasted for 2 h. The activity of FS 169 both *in vitro* and *in vivo* was comparable with the activity of heparin.

Keywords: 4-chlorophenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoate; heparin; Minilab 701 coagulometer