ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

DOI: 10.30906/0869-2092-2023-86-9-22-26

АНТИТРОМБОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО 6*H*-1,3,4-ТИАДИАЗИНА (СОЕДИНЕНИЯ L-36) НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ АРТЕРИАЛЬНОГО ТРОМБОЗА

В. С. Сиротенко*, А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, К. А. Гайдукова[1]

На модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа(III) было установлено, что производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина соединение L-36 превосходит по значению $ЭД_{50}$ ацетилсалициловую кислоту в 3 раза. При моделировании повреждения сонной артерии электрическим током было показано, что исследуемое соединение превосходит по антитромботической активности ацетилсалициловую кислоту в 2,5 раза. Проведенное исследование позволило заключить, что производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина обладает выраженной антитромботической активностью.

Ключевые слова: антитромботическая активность; производные 6*H*-1,3,4-тиадиазина; ацетилсалициловая кислота; модель артериального тромбоза сонной артерии; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Ведущей причиной смертности среди населения являются сердечно-сосудистые заболевания, возникающие зачастую из-за процессов тромбообразования [17]. Спонтанное патологическое тромбообразование — тромбоз — связано с избыточной активацией системы гемостаза, причем артериальный тромбоз главным образом ассоциируется с повышением агрегации тромбоцитов, в меньшей степени — с нарушениями коагуляционного каскада. Артериальные тромбозы являются важным фактором, который определяет исход заболеваний сердечно-сосудистой системы, формируются при высокой скорости кровотока в результате повреждения сосудистой стенки и состоят преимущественно из скоплений тромбоцитов, фиксированных между собой фибриновыми нитями (белые тромбы) [3]. Антитромботическая (антиагрегантная) терапия является основой оптимального лечения/профилактики пациентов с очень высоким сердечно-сосудистым риском [5, 18]. Существенным недостатком антитромботической терапии остается риск развития серьезных осложнений: кровотечений [11], изъязвлений слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта [8], развития резистентности [15] и т.п. Кроме того, сердечно-сосудистые события продолжают возникать, несмотря на значительное количество антиагрегантных лекарственных средств (ЛС), применяемых в клинической практике [16]. Наличие осложнений, а также случаи рецидивов тромботических состояний приводят к необходимости прибегать к двойной антитромбоцитарной терапии [4, 13]. Поэтому в рамках изучения специфической активности потенциальных антиагрегантных ЛС необходимо исследовать их антитромботическое действие на различных моделях артериальных тромбозов. В ранее проведенных исследованиях было найдено производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина соединение L-36, проявляющее выраженную антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo*, превосходящую активность ацетилсалициловой кислоты (патент РФ 2259371 от 05.05.2003). Поэтому целью исследования явилось изучение антитромботической активности соединения L-36 на различных моделях артериального тромбоза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 84 крысах-самцах, массой 230 – 250 г (филиал “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, г. Москва). Субстанция соединения L-36 (рис. 1) была синтезирована сотрудниками

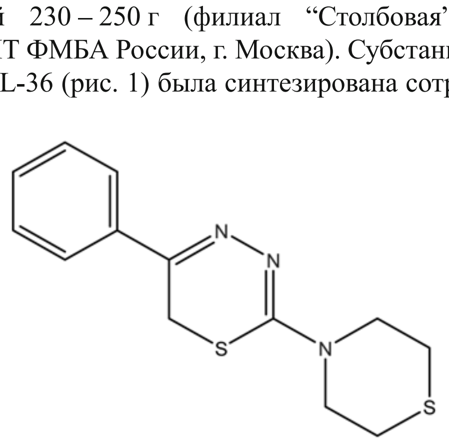

Рис. 1. Соединение L-36 – 5-фенил-2-морфолино-6*H*-1,3,4-тиадиазин.

[1] ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, Россия, 400066, Волгоград, пл. Павших борцов, 1.
* e-mail: Sirotenko.viktor@yandex.ru

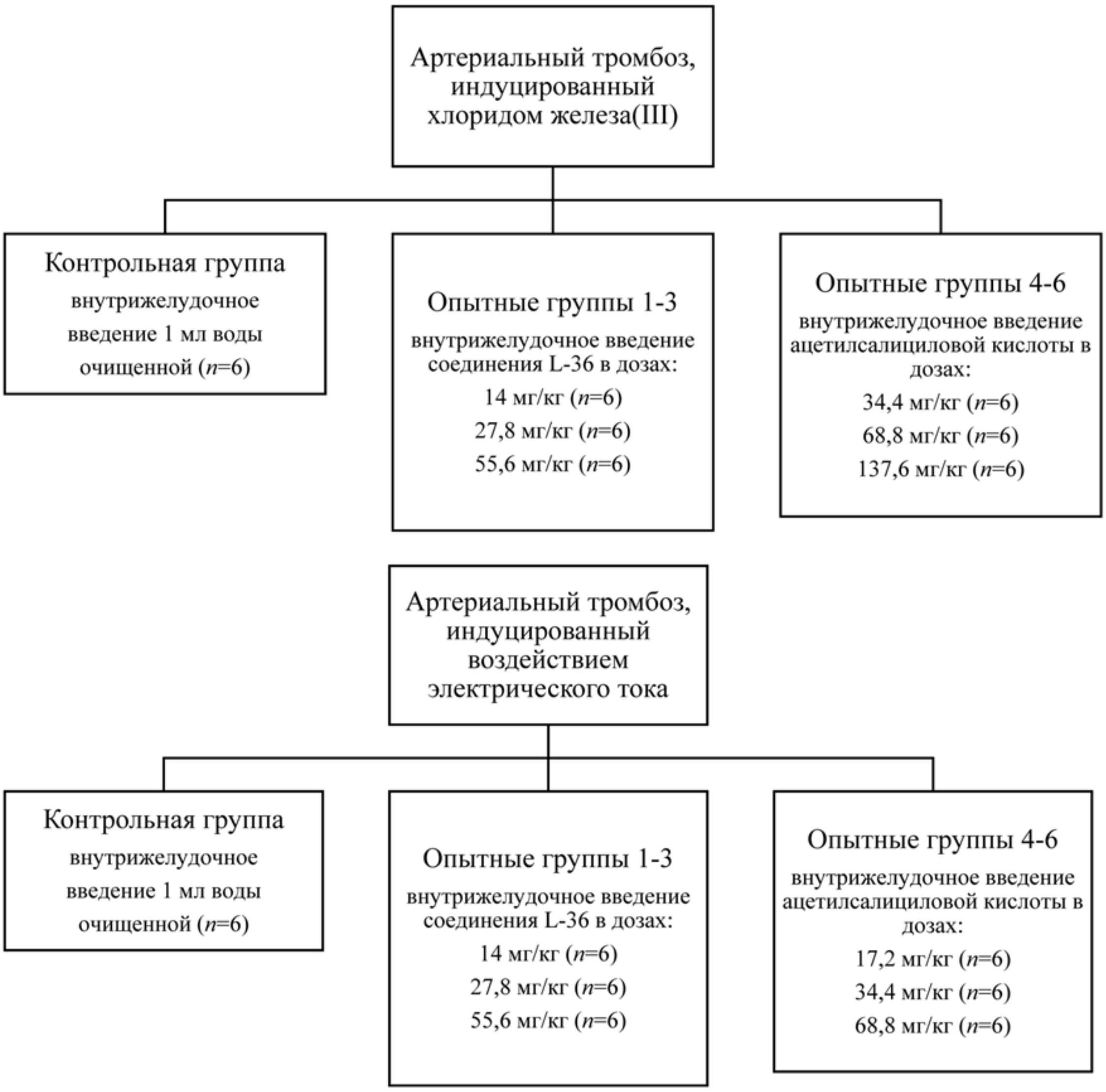

Рис. 2. Распределение животных по экспериментальным группам.

кафедры органической химии Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина под руководством академика РАН О. Н. Чупахина.

Антитромботическую активность тестируемых образцов (соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты) оценивали в соответствии с требованиями “Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [1] в условиях *in vivo* при однократном внутрижелудочном введении крысам на моделях артериального тромбоза, индуцированного поверхностной аппликацией 50 % раствора хлорида железа(III) [20] и воздействием постоянного электрического тока на сонную артерию крыс [12]. Соединение L-36 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота были изучены в дозах ЭД$_{50}$ антиагрегантной активности *in vivo*, полученных ранее, которые составили 27,8 и 34,4 мг/кг, соответственно. Группе контрольных животных вводили воду очищенную в эквивалентном объеме (1 мл) (рис. 2).

Для расчета показателя ЭД$_{50}$ (эффективная доза, в которой наблюдается 50 % эффекта) дозы исследуемых веществ были увеличены или уменьшены, в зависимости от проявленного эффекта. С целью инициации процессов тромбообразования в сонной артерии наркотизированным животным (хлоралгидрат, внутрибрюшинно, 400 мг/кг) осуществляли препарирование сосуда и его изоляцию с помощью парафиновой бумаги. Затем на сонную артерию крыс производили аппликацию 30 мкл 50 % раствора хлорида железа(III). Для моделирования тромбоза электрическим током под сонную артерию подводили электроды, подающие постоянный ток (12 мВ, 50 мА), инициирующий повреждение сонной артерии. Кровоток в сонной артерии оценивали с помощью ультразвукового допплерографа Миниакс Допплер-К (ООО “СП Минимакс”, Россия). Об уровне антитромботической активности

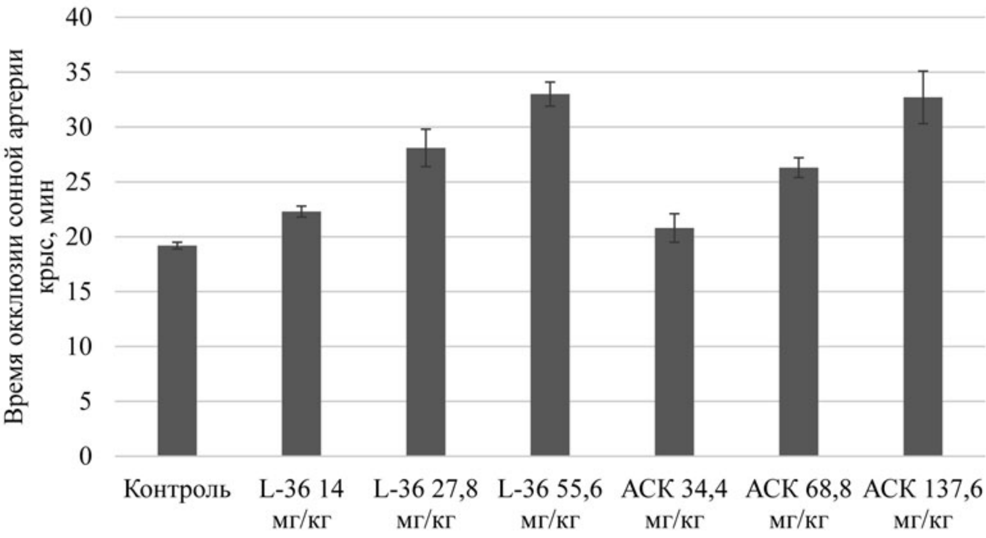

Рис. 3. Антитромботическая активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели артериального тромбоза сонной артери крыс, индуцированного аппликацией 50 % раствора хлорида железа(III) при однократном внутрижелудочном введении ($M \pm SEM$) ($n = 6$).

Примечание: * данные достоверны по отношению к контролю (критерий one-way ANOVA, $p \leq 0{,}01$); АСК — ацетилсалициловая кислота.

тестируемых образцов судили по увеличению времени полной окклюзии каротидной артерии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием встроенных функций программного обеспечения Microsoft Excel 2019 (M, SEM, ED_{50}), а также программы GraphPad Prism 8.0. Для оценки множества групп прибегали к критерию one-way ANOVA ($p < 0{,}05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При обработке сонной артерии крыс раствором хлорида железа(III) происходит образование тромба, показателем которого является время полной окклюзии сосуда (остановка кровотока).

На первом этапе была изучена антитромботическая активность субстанции соединения L-36 и препарата сравнения — ацетилсалициловой кислоты при пероральном введении крысам в дозах $ЭД_{50}$ антиагрегантной активности *in vivo*, полученных ранее на крысах. Среднее время окклюзии сонной артерии в контрольной группе животных, которым вводили воду очищенную, составило в среднем 19,2 мин. При этом субстанция соединения L-36 в дозе 14 мг/кг способствовала удлинению времени образования тромба на 16 %, в дозе 27,8 мг/кг — на 46,3 % относительно контрольной группы животных ($p \leq 0{,}05$). Увеличение дозы вещества L-36 до 55,6 мг/кг приводило к удлинению времени окклюзии каротидной артерии на 72,0 %. Полученные данные позволили рассчитать показатель $ЭД_{50}$ для субстанции L-36, который составил 36,5 мг/кг (рис. 3). Препарат сравнения — ацетилсалициловая кислота в дозе 34,4 мг/кг способствовала удлинению времени окклюзии сонной артерии в среднем до 20,8 мин, что на 16,8 % больше показателя контрольной группы. Увеличение дозы ацетилсалициловой кислоты до 68,8 и 137,6 мг/кг приводило к достоверному увеличению времени наступления полной окклюзии сонной артерии на 35,7 и 63,6 %, соответственно. Расчетная $ЭД_{50}$ ацетилсалициловой кислоты составила 110,3 мг/кг (рис. 3).

Таким образом, субстанция соединения L-36 на данной модели артериального тромбоза проявила выраженную антитромботическую активность и по показателю $ЭД_{50}$ превосходила препарат сравнения — ацетилсалициловую кислоту — в 3 раза.

На втором этапе исследования было проведено моделирование тромбоза сонной артерии крыс электрическим током. Данная модель тромбоза позволяет воспроизвести максимально приближенное острое повреждение эндотелия, наблюдаемое в клинической практике [9]. После воздействия постоянного электрического тока на сонную артерию крыс среднее время окклюзии сосуда в группе контрольных животных составило в среднем 14,7 мин. Однократное внутрижелудочное введение соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты в дозах $ЭД_{50}$ антиагрегантной активности *in vivo* (27,8 и 34,4 мг/кг, соответственно) способствовало пролонгированию времени полной окклюзии сонной артерии на 62,1 ($p < 0{,}05$) и 33,2 % ($p < 0{,}05$) соответственно. Применение L-36 в дозах 14 и 55,6 мг/кг позволило выявить дозозависимое удлинение времени остановки кровотока в сонной артерии на 29,3 ($p < 0{,}05$) и 91,6 % ($p < 0{,}05$), соответственно. Значение $ЭД_{50}$ для соединения L-36 на данной модели тромбоза составило 24,8 мг/кг (рис. 4). Ацетилсалициловая кислота также проявила дозозависимое анти-

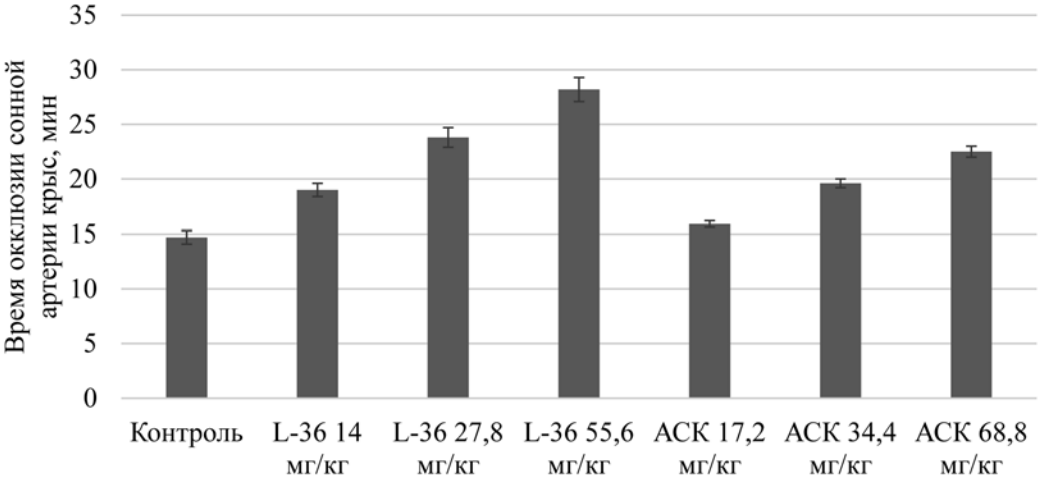

Рис. 4. Антитромботическая активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутрижелудочном введении ($M \pm SEM$) ($n = 6$).

Примечание: * данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA ($p < 0{,}05$); АСК — ацетилсалициловая кислота.

тромботическое действие, ее показатель $ЭД_{50}$ составил 62,5 мг/кг (рис. 4).

Таким образом, на двух моделях артериального тромбоза была показана высокая антитромбогенная активность соединения L-36, превосходящая таковую для ацетилсалициловой кислоты.

Артериальный тромбоз является частым осложнением многих системных заболеваний, связанных с хроническим воспалением, включая атеросклероз, диабет, ожирение, онкологические и аутоиммунные ревматологические заболевания [7]. Воздействие хлорида железа(III) на поверхность сонной артерии сопровождается многостадийным процессом, активирующим сразу несколько составляющих тромботического процесса: агрегацию тромбоцитов, образование фибрина и эритроциты и приводящим к повреждению эндотелия сосуда и, как следствие, тромбообразованию [6, 10]. Кроме того, хлорид железа по биологии сосудистого поражения подразумевает развитие в очаге поражения реакции Хабера — Вейса (взаимодействие железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы), которая также приводит к тромбообразованию. Таким образом, выбор модели артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа, является обоснованным, а исследование потенциальных антиагрегантных ЛС на процессы тромбообразования позволяет зафиксировать наличие антитромбогенных свойств соединений. Проведенный сравнительный анализ выявил преимущество антитромботического действия производного 6*H*-1,3,4-тиадиазина — соединения L-36 над препаратом сравнения.

Использование анодного тока в качестве индуктора тромбоза широко распространено в экспериментальных исследованиях, в частности, в опытах на крысах. Патогенез артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, связан с ключевой ролью активации тромбоцитарного звена гемостаза в начальных этапах его развития, а именно со значительным повреждением эндотелия, обнажением субэндотелиального матрикса, адгезией тромбоцитов [2, 14]. Образование тромба в данном случае не связано с реальной клинической практикой, однако структура тромба (богатые тромбоцитами и фибрином, а также эритроцитами, захваченными фибриновой сетью) доказывает, что сгусток по структуре формируется такой же, как и в клинических случаях [19].

Таким образом, проведенное исследование позволяет заключить, что производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина — соединение L-36 — по своей антитромботической активности превосходит препарат сравнения на различных моделях экспериментальных тромбозов, что свидетельствует о его влиянии на патогенетические звенья агрегации тромбоцитов. Данное соединение является перспективным для дальнейшего углубленного изучения механизма антиагрегантного действия.

ВЫВОДЫ

1. На модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа(III) было установлено, что производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина — соединение L-36 превосходит по значению $ЭД_{50}$ ацетилсалициловую кислоту в 3 раза ($p \le 0{,}05$).

2. При моделировании повреждения каротидной артерии электрическим током было показано, что исследуемое соединение превосходит по антитромботической активности ацетилсалициловую кислоту в 2,5 раза ($p \le 0{,}05$).

Финансирование

Исследования выполнены за счет Соглашения № 075-15-2020-777 от 1 октября 2020 г. о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации, г. Москва.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Макаров, Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз, в кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России, Москва (2012).
2. А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, В. С. Сиротенко и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **84**(9), 20 – 23 (2021); doi: 10.30906 / 0869-2092-2021-84-9-20-23
3. V. Aboyans, R. Bauersachs, L. Mazzolai, et al., *Eur. Heart J.*, **42**(39), 4013 – 4024 (2021); doi: 10.1093 / eurheartj / ehab390
4. L. Castilla-Guerra, M. D. C. Fernández-Moreno, J. M. de la Vega-Sánchez, et al., *Clin. Investig. Arterioscler.*, **31**(6), 282 – 288 (2019); doi: 10.1016 / j.arteri.2019.01.006
5. M. P. M. Feitosa, C. D. Soffiatti, J. P. P. Linhares Filho, et al., *Rev. Assoc. Med. Bras.*, (1992), **65**(3), 316 – 318 (2019); doi: 10.1590 / 1806-9282.65.3.316
6. S. P. Grover, N. Mackman, *Platelets*, **31**(4), 432 – 438 (2020); doi: 10.1080 / 09537104.2019.1678119
7. Y. Ito, K. Ohno, Y. Morikawa, et al., *Sci Rep.*, **8**, 9955 (2018); doi: 10.1038 / s41598-018-28181-8
8. S. Jacob, E. V. Belli, *Ann. Thorac. Surg.*, **107**(2), e105 – e106 (2019); doi: 10.1016 / j.athoracsur.2018.06.013
9. B. Kalaska, J. Miklosz, J. Swieton, et al., *Vaccine*, **40**(13), 1996 – 2002 (2022); doi: 10.1016 / j.vaccine.2022.02.037
10. T. A. Kuznetsova, B. G. Andryukov, I. D. Makarenkova, et al., *Molecules*, **26**(9), 2618 (2021); doi: 10.3390 / molecules26092618
11. M. W. Lee, P. O. Katz, *Clin. Geriatr. Med.*, **37**(1), 31 – 42 (2021); doi: 10.1016 / j.cger.2020.08.004
12. W. Li, M. Nieman, A. Sen Gupta, *J. Vis. Exp.*, **115**, 54479 (2016); doi: 10.3791 / 54479
13. N. Marcinczyk, A. Gołaszewska, A. Gromotowicz-Poplawska, et al., *Front. Pharmacol.*, **12**, 682987 (2021); doi: 10.3389 / fphar.2021.682987
14. T. Quillard, G. Franck, T. Mawson, E. Folco, et al., *Curr. Opin. Lipidol.*, **28**(5), 434 – 441 (2017); doi: 10.1097 / MOL.0000000000000440
15. D. L. Rolnik, K. H. Nicolaides, L. C. Poon, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **226**(2S), S1108 – S1119 (2022); doi: 10.1016 / j.ajog.2020.08.045
16. J. Saw, G. C. Wong, J. Mayo, et al., *Heart*, **102**(10), 763 – 769 (2016); doi: 10.1136 / heartjnl-2015 – 308691
17. Y. Shim, I. Kwon, Y. Park, et al., *Med. J.*, **62**(11), 1032 – 1041 (2021); doi: 10.3349 / ymj.2021.62.11.1032
18. X. Wang, M. Ziegler, J. D. McFadyen, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **178**(21), 4246 – 4269 (2021); doi: 10.1111 / bph.15635
19. A. Zakrzeska, A. Gromotowicz-Popławska, J. Szemraj, et al., *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, **16**(4), 1085 – 1094 (2015); doi: 10.1177 / 1470320313515037
20. A. Zambon, M. Averna, L. D’Erasmo, et al., *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **51**(3), 635 – 653 (2022); doi: 10.1016 / j.ecl.2022.02.004

Поступила 09.09.23

ANTITHROMBOGENIC PROPERTIES OF THE 6*H*-1,3,4-THIADIAZINE DERIVATIVE (COMPOUND L-36) ON VARIOUS MODELS OF ARTERIAL THROMBOSIS

V. S. Sirotenko*, A. A. Spasov, A. F. Kucheryavenko, and K. A. Gaidukova

Volgograd State Medical University, Volgograd, 400066 Russia

* e-mail: Sirotenko.viktor@yandex.ru

Using a model of arterial thrombosis of the carotid artery induced by iron(III) chloride in rats, it was found that the 6*H*-1,3,4-thiadiazine derivative (compound L-36) exceeds the ED_{50} value of acetylsalicylic acid by 3 times. When modeling injury to the carotid artery by electric current, it was shown that the studied compound exceeds acetylsalicylic acid in antithrombotic activity by 2.5 times. The conducted study revealed that the derivative of 6*H*-1,3,4-thiadiazine has a pronounced antithrombotic activity superior to that of the comparison drug acetylsalicylic acid.

Keywords: antithrombotic activity; derivatives of 6*H*-1,3,4-thiadiazine; acetylsalicylic acid; model of arterial thrombosis of the carotid artery; rats.