

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 615.273.53:547.789.1].032.076.9

DOI 10.17816/pmj35188-94

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ В КРОВИ 4-ХЛОРФЕНИЛ-2-ГИДРОКСИ-4-ОКСО-2-БУТЕНОАТА ТИАЗОЛИНАММОНИЯ НА АНТИКОАГУЛЯНТНЫЙ ЭФФЕКТ ПРИ ПОДКОЖНОМ ВВЕДЕНИИ

А.В. Старкова, Ю.Н. Карпенко, Б.Я. Сыропятов, Ф.В. Собин, Н.А. Пулина*
Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия

STUDY OF INFLUENCE OF BLOOD THIAZOLINE AMMONIUM 4-CHLOROPHENYL-2-HYDROXY-4-OXO-2-BUTENOATE CONCENTRATION ON ANTICOAGULANT EFFECT UPON SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION

A.V. Starkova, Yu.N. Karpenko, B.Ya. Syropyatov, F.V. Sobin, N.A. Pulina*
Perm State Pharmaceutical Academy, Russian Federation

Цель. Изучение влияния содержания в крови 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноата тиазолинаммония на проявление антикоагулянтного эффекта при подкожном введении кроликам.

Материалы и методы. Исследования проведены на беспородных кроликах, которым подкожно вводили вещество в дозе 35 мг/кг. Время свертывания крови определяли с помощью коагулометра «Минилаб 701», а концентрацию соединения в крови – с помощью жидкостного микроколоночного хроматографа «Милихром А-02».

Результаты. Максимальная концентрация соединения в крови и максимальный антикоагулянтный эффект достигаются через 30 мин после подкожного введения. Вещество оказывает антикоагулянтный эффект в течение 120 мин после введения. На данный момент концентрация соединения в крови составляет $519,8 \pm 145,41$ нг/мл.

© Старкова А.В., Карпенко Ю.Н., Сыропятов Б.Я., Собин Ф.В., Пулина Н.А., 2018

тел. +7 902 631 20 04

e-mail: allaperm@list.ru

[Старкова А.В. (*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, доцент кафедры физиологии; Карпенко Ю.Н. – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии; Сыропятов Б.Я. – доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии; Собин Ф.В. – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии; Пулина Н.А. – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической технологии].

Выводы. Исследуемое соединение при подкожном введении быстро всасывается и начинает оказывать антикоагулянтный эффект. Эффективность его действия зависит от концентрации в крови.

Ключевые слова. Прямые антикоагулянты, 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноат тиазолин-аммония.

Aim. To study the effect of blood thiazoline ammonium 4-chlorophenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenate content on the manifestation of anticoagulant effect upon subcutaneous administration to rabbits.

Materials and methods. The studies were fulfilled on outbred rabbits. The substance was administered subcutaneously in the dose of 35 mg/kg. The time of blood coagulation was determined using coagulometer "Minilab 701", and blood concentration – by means of liquid micro-column chromatograph "Milichrom A-02".

Results. The obtained results prove that maximum concentration of the compound in blood and maximum anticoagulant effect is reached in 30 minutes after subcutaneous administration. The substance anticoagulant effect lasted for 120 minutes after its administration. At present, the compound concentration in blood is equal to 519.8 ± 145.41 ng/ml.

Conclusions. The studied compound, when administered subcutaneously, is quickly absorbed and begins to render an anticoagulant effect. Efficacy of action of this compound depends on its blood concentration.

Key words. Direct anticoagulants, thiazoline ammonium 4-chlorophenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenate.

ВВЕДЕНИЕ

В развитых странах тромбозы и тромбоземболические осложнения являются основной причиной заболеваемости и смертности населения. Риск возникновения этих осложнений высок у пациентов как терапевтического, так и хирургического профилей [3–6, 12, 19]. Для профилактики и лечения тромбозов и тромбоземболий широко используются прямые антикоагулянты.

В настоящее время в качестве антикоагулянтов применяются не прямые и прямые ингибиторы тромбина, а также прямые ингибиторы фактора Ха.

К непрямым ингибиторам тромбина относят: нефракционированный гепарин, низкомолекулярные гепарины и синтетические пентасакхариды (фондапаринукс). Прямым ингибитором тромбина является дабигатран атексилат, фактора Ха – ривароксабан и апиксабан [8, 12, 17, 25].

Все они обладают побочными эффектами, которые ограничивают их применение.

Основными осложнениями при использовании нефракционированного гепарина

являются кровотечения, тромбоцитопения и остеопороз. Опасность кровотечения коррелирует с дозой гепарина, с применением дезагрегантной терапии и с тяжелым состоянием пациента [8, 25]. При введении препарата более 3 дней возможно развитие иммунной тромбоцитопении вследствие образования антител к комплексу гепарин + фактор 4 тромбоцитов [8, 25].

Побочные действия низкомолекулярных гепаринов такие же, как и у нефракционированного гепарина, но выражены они в меньшей степени. В несколько раз реже возникают тромбоцитопения, остеопороз, меньше риск появления кровотечений. Так же, как и нефракционированный гепарин, низкомолекулярные гепарины выводятся почками и могут накапливаться в крови у больных с почечной недостаточностью. Но поскольку низкомолекулярные гепарины в меньшей степени связываются плазменными белками, эндотелием и тромбоцитами и единственный способ их выведения – это почки, то у больных с тяжелой почечной недостаточностью их применение даже более опасно, чем нефракционированного гепарина [1, 7, 8, 20].

При использовании фондапаринукса сообщалось о возникновении гематом, сыпи или зуда в местах подкожных инъекций, обратимом бессимптомном увеличении уровня аминотрансфераз в сыворотке крови, тромбоцитопении, возникновении головной боли, озноба, гипертермии, тошноты, запора, бессонницы, аллергических реакций [8, 18, 25].

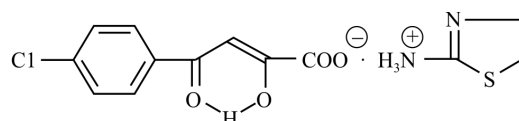
При применении дабигатрана возможны кровотечения любой локализации, анемия, тромбоцитопения, нарушения функций печени. Противопоказаниями к его применению являются: почечная недостаточность тяжелой степени; нарушения функций печени [10, 13–15, 22].

При лечении ривароксабаном были выявлены следующие побочные действия: кровотечения различной локализации, анемия, тромбоцитоз, тахикардия, гипотензия, тошнота, нарушения стула, боль в животе, сухость во рту, рвота, повышение активности ряда ферментов, нарушения функций печени, головокружение, головная боль, обмороки, почечная недостаточность, зуд, сыпь, боль в конечностях, лихорадка, отеки, ухудшение общего самочувствия. Противопоказаниями к его назначению являются: кровотечения, заболевания печени, беременность, период лактации, детский и подростковый возраст, почечная недостаточность тяжелой степени, непереносимость лактозы или галактозы [9, 11, 16, 23].

Противопоказаниями к применению апиксабана являются: кровотечения, заболевание печени, нарушение функций почек, возраст до 18 лет, беременность, грудное вскармливание. Применение апиксабана может вызвать: анемию, тромбоцитопению, артериальную гипотензию, кровотечения различной локализации, тошноту, нарушения функций печени [2, 8, 16].

Актуальность проблемы поиска новых прямых антикоагулянтов для практического здравоохранения определила необходимость углубленных исследований веществ, обладающих антикоагулянтной активностью для дальнейшего их внедрения.

В результате скрининговых исследований веществ, синтезируемых в Пермской государственной фармацевтической академии, было выявлено соединение, которое по результатам предыдущих исследований *in vitro* и *in vivo* замедляет процесс свертывания крови – 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноат тиазолиинаммония [26, 27].



Данное вещество, полученное в лабораторных условиях, представляет собой белый мелкокристаллический порошок без запаха, растворимый в воде, спирте этиловом, диоксане, труднорастворимый в хлороформе.

Цель работы – изучение влияния содержания в крови 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноата тиазолиинаммония на выраженность антикоагулянтного эффекта при подкожном введении кроликам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования *in vivo* проведены на беспородных кроликах массой 2–5 кг. Животные содержались при стандартном пищевом режиме в условиях вивария в соответствии с СанПиН № 1045-73 и требованиями Фармкомитета РФ к проведению доклинических испытаний, изложенных в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [21], а также с со-

блюдением международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.).

Для изучения антикоагулянтного эффекта вещество вводили подкожно в дозе 35 мг/кг (1/40 ЛД₅₀), которое составило при подкожном введении 1290 (1100–1500) мг/кг. Доза была выбрана с учетом объема циркулирующей крови кролика. Данная доза вещества соответствует концентрации соединения 1 мг/мл крови кролика [28].

Забор крови производили 5 раз – до введения соединения и через 30, 60, 90 и 120 мин после него. Из краевой вены уха отбирали 2 мл крови, стабилизировали 0,2 мл 3,8%-ного раствора лимоннокислого натрия.

Изучение времени свертывания крови проводилось с помощью коагулометра «Минилаб 701». В кювету помещали 100 мкл крови и добавляли 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия. Пробы инкубировали в течение 60 с, затем добавляли 100 мкл 1%-ного раствора хлорида кальция и приступали к измерению времени свертывания крови.

Для определения концентрации исследуемого соединения в крови вещество вводилось подкожно в дозе 35 мг/кг. Забор крови производился из краевой вены уха. Отбирали 2 мл крови, стабилизировали 0,2 мл 3,8%-ного раствора лимоннокислого натрия. Забор крови производился 9 раз – до введения и через 30, 60, 90, 120, 180, 360 мин, 24 и 48 ч после введения соединения.

Определение концентрации 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноата тиазолиаммония в плазме крови производили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на микроколоночном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова») в течение 30–60 мин после забора крови.

Хроматографическое исследование осуществляли на колонке Pronto SIL 120-3-C₁₈ AQ в режиме градиентного элюирования с использованием подвижной фазы на основе ацетонитрила и перхлоратного буфера. Длина волны детектирования исследуемого вещества – 320 нм.

Пробоподготовка биологической жидкости проводилась следующим образом: цельную кровь (2 мл) центрифугировали в пробирках Эппендорфа при 3000 об/мин в течение 5 мин. Плазму отбирали в количестве 0,5 мл и переносили в пробирку Эппендорфа, добавляли 100 мкл кислоты хлористоводородной и 1,5 мл эфира диэтилового. Содержимое пробирки встряхивали на пробирочном вортексе в течение 10 мин и центрифугировали при 5000 об/мин 5 мин; 1 мл экстракта помещали в вialу хроматографическую и испаряли органический растворитель в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола и исследовали методом ВЭЖХ.

Результаты исследования обработаны с помощью вариационной статистики методом Фишера – Стьюдента [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из табл. 1, при подкожном введении вещество быстро всасывается, так как максимальное снижение свертываемости отмечается уже через 30 мин после введения. Замедление свертывания крови на 30-й мин составило 102,9 % от исходного времени свертывания. Активность сохранялась около 2 ч.

При исследовании концентрации соединения в крови после подкожного введения видно (табл. 2), что вещество достаточно быстро всасывается. Максимальной концентрация стала через 30 мин после

введения и составила $1610,2 \pm 194,48$ нг/мл. Затем она начала постепенно снижаться. Через 60 мин после введения она составила $1189,8 \pm 278,03$ нг/мл, через 90 мин – $721,4 \pm 220,73$ нг/мл, через 120 мин – $519,8 \pm 145,41$ нг/мл. К 180 мин исследова-

ния концентрация значительно снизилась до $273,2 \pm 74,52$ нг/мл. Через сутки после введения в крови обнаруживается остаточное содержание вещества – $51,0 \pm 22,49$ нг/мл. Через 48 ч после введения вещество в крови не обнаруживается.

Таблица 1

Влияние 4-хлорфенил-2-гидроксид-4-оксо-2-бутеноата тиазолиаммония на свертывание крови при подкожном введении в дозе 35 мг/кг

Интервал	Время свертывания, с	Изменение свертываемости, %	Количество исследований	<i>p</i>
Исходная свертываемость	$128,4 \pm 3,92$		8	
30 мин	$260,6 \pm 17,76$	-102,9	8	< 0,001
60 мин	$241,7 \pm 9,81$	-88,2	8	< 0,001
90 мин	$228,1 \pm 14,00$	-77,6	8	< 0,001
120 мин	$158,9 \pm 10,22$	-23,7	8	< 0,05

Примечание: *p* – в сравнении с исходной свертываемостью.

Таблица 2

Исследование концентрации 4-хлорфенил-2-гидроксид-4-оксо-2-бутеноата тиазолиаммония в крови при подкожном введении в дозе 35 мг/кг

Интервал	Концентрация, нг/мл	Количество исследований
Исходная концентрация	0	5
30 мин	$1610,2 \pm 194,48$	5
60 мин	$1189,8 \pm 278,03$	5
90 мин	$721,4 \pm 220,73$	5
120 мин	$519,8 \pm 145,41$	5
180 мин	$273,2 \pm 74,52$	5
360 мин	$115,0 \pm 72,07$	5
24 ч	$51,0 \pm 22,49$	5
48 ч	0	5

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 4-хлорфенил-2-гидроксид-4-оксо-2-бутеноат тиазолиаммония быстро всасывается при подкожном введении. Максимальная концентрация соединения в крови ($1610,2 \pm 194,48$ нг/мл) достигается через 30 мин после подкожного введения. Максимальный антикоагулянтный эффект также соответствует 30 мин исследования – свертываемость крови замедляется на 102,9 %. Затем антикоагулянтная активность начинает сни-

жаться, через 60 мин замедление свертывания составило -88,2 %. Снижается и концентрация соединения в крови, через 60 мин после введения равна $1189,8 \pm 278,03$ нг/мл. Через 90 мин замедление свертывания крови составило -77,6% от исходного, при этом концентрация соединения в крови снизилась до $721,4 \pm 220,73$ нг/мл. Вещество оказывает антикоагулянтный эффект в течение 120 мин после введения, замедление свертывания крови при этом составило 23,7 % от исход-

ного уровня. На данный момент концентрация соединения в крови соответствует $519,8 \pm 145,41$ нг/мл. Снижение концентрации соединения до более низкого значения приводит к прекращению действия вещества.

Выводы

1. Исследуемое соединение при подкожном введении быстро всасывается и начинает оказывать антикоагулянтный эффект.
2. Максимальная концентрация вещества в крови и максимальный антикоагулянтный эффект отмечены на 30-й минуте после введения.
3. Эффективность действия соединения зависит от его концентрации в крови.
4. Снижение концентрации 4-хлорфенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеноата тиазолин-аммония в крови ниже $519,8 \pm 145,41$ нг/мл приводит к прекращению оказываемого действия.

Библиографический список

1. Аверков О.В. Низкомолекулярные гепарины в новых рекомендациях по ведению больных острым коронарным синдромом без стойких подъемов сегмента ST на ЭКГ. Клиническая фармакология и терапия 2008; 17 (1): 36–40.
2. Аликсабан: инструкция, применение и формула, available at: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id 6095.htm
3. Баркаган З.С. Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии. М.: Ньюдиамед 2000; 148.
4. Баркаган З.С. Современная антитромботическая профилактика и терапия. Фармакотерапия заболеваний сердечно-сосудистой системы: лекции для практиче-ских врачей. VIII национальный конгресс «Человек и лекарство». М. 2002; 142–153.
5. Баркаган З.С., Сердюк Г.В. Невынашивание беременности и мертворождаемость при нарушениях в системе гемостаза. Гематология и трансфузиология 1991; 4: 3–5.
6. Бокарев И.Н., Попова Л.В. Венозный тромбоз и тромбоз легочной артерии. Медицинское информационное агентство 2005; 208.
7. Бокарев И.Н., Попова Л.В. Опыт применения низкомолекулярных гепаринов при лечении тромбозов глубоких вен. Трудный пациент 2008; 10, available at: <http://www.t-patient.ru/archive/tp10-08/tp10-08 495.html>.
8. Васильева Е.Ю., Воробьева И.И. Прямые антикоагулянты в кардиологии. Российский медицинский журнал 2010; 18 (22): 1379–1383.
9. Верткин А.А. Применение ривароксабана в качестве антитромботической терапии у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. Кардиология 2013; 4: 3–4.
10. Гиляров М.Ю. Дабигатран: как выбрать оптимальную дозу в реальной клинической практике? Вестник аритмологии 2012; 69: 77–80.
11. Гиляров М.Ю. Ривароксабан в профилактике тромботических осложнений у пациентов с фибрилляцией предсердий. Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2012; 8 (3): 453–456.
12. Головачева Т.В., Скворцов В.В., Скворцов К.Ю. Применение антикоагулянтов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Атеротромбоз 2009; 2: 2–19.
13. Дабигатран – новый подход к профилактике тромботических осложнений. Травматология и ортопедия России 2011; 3 (61): 80–83.

14. Дабигатрана этексилат: инструкция, применение, формула, available at: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_5498.htm.
15. *Затейщиков Д.А., Зотова И.В.* Дабигатран: перспективы клинического применения. Фарматека 2011; 15: 30–34.
16. *Канорский С.Г.* Предупреждение тромбоэмболий у больных с фибрилляцией предсердий: проблема выбора орального антикоагулянта. Международный медицинский журнал 2012; 3: 24–29.
17. *Куликов А.Н.* Фармакотерапия острых коронарных синдромов. ФАР Миндекс-Практик 2005; 9: 1–16.
18. *Латфулин И.А., Подольская А.А.* Применение антикоагулянтов при остром коронарном синдроме. Актуальные вопросы клинической фармакологии 2009; 3: 71–75.
19. *Макацария А.Д., Бицадзе В.О.* Тромбофилические состояния в акушерской практике. М.: Russo 2001; 480.
20. *Мелкумян А.Л., Берковский А.Л., Кишинец Р.С., Козлов А.А.* Мониторинг эффективности применения прямых антикоагулянтов. Гематология и трансфузиология 2013; 58 (1): 32–38.
21. *Миронов А.Н., Бунатян Н.Д.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К 2012; 944.
22. *Моисеев С.В.* Когда и как применять дабигатран при фибрилляции предсердий? Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2012; 8 (6): 819–825.
23. *Никонов В.В., Курсов С.В.* Механизм действия антикоагулянтов и перспективы клинического применения ривароксабана – первого эффективного ингибитора фактора Ха с возможностью энтерального введения. Медицина неотложных состояний 2011; 34 (3): 52–57.
24. *Прозоровский В.В.* Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. Психофармакология и биологическая наркологию 2007; 7 (3–4): 2090–2120.
25. *Пэрадайн Н.А., Шувалова Н.В.* Новые пероральные антикоагулянты. Здоровоохранение Чувашии 2013; 4, available at: <http://giduv.com/2013/4/novyeperoralnye>.
26. *Старкова А.В., Собин В.Ф., Сыропятов Б.Я., Пулина Н.А.* Исследование влияния 4-хлорфенил-2-гидроксид-4-оксо-2-бутеноат тиазолиаммония на свертывание крови при внутрижелудочном и подкожном введении. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2014; 7: 53–55.
27. *Старкова А.В., Собин В.Ф., Сыропятов Б.Я., Пулина Н.А.* Сравнительная оценка влияния 4-хлорфенил-2-гидроксид-4-оксо-2-бутеноат тиазолиаммония и гепарина на свертывание крови. Экспериментальная и клиническая фармакология 2013; 76 (10): 25–26.
28. *Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А.* Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. М.: Медицина 1978;

Материал поступил в редакцию 15.11.2017