

УДК 616-005.6-08

DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-65-72

СОНИН Д. Л.², ДЕМЕНТЬЕВА И. Н.^{1, 2},
ЧЕФУ С. Г.^{1, 2}

Влияние препарата Нотромбел на системную гемодинамику и толерантность к тромбину в эксперименте

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

Статья поступила в редакцию 12.10.17; принята к печати 10.11.17

Реферат

Цель исследования – изучение влияния интрагастрального введения препарата Нотромбел, одного из представителей нового класса соединений – N,N'-замещенных пиперазинов – на системную гемодинамику и толерантность к тромбину.

Материал и методы исследования. На крысах-самцах линии Вистар изучали влияние курсового 14-кратного интрагастрального введения Нотромбела (0,01 мМ/кг) и ацетилсалициловой кислоты (АСК) (0,01 мМ/кг) на риск спонтанных кровоизлияний и толерантность к тромбину (внутривенное болюсное введение тромбина в дозе 50 ед. НИИ/кг). Количество циркулирующих тромбоцитов определяли до и через 5 мин после введения тромбина. Концентрацию фибриногена через 30 мин определяли гравиметрическим методом по Р. А. Рутбергу.

Результаты исследования. При курсовом применении Нотромбела и АСК спонтанных кровоизлияний и повышенной кровоточивости не наблюдалось. Показатели АД и ЧСС не отличались от таковых у контрольных животных.

После введения тромбина у всех экспериментальных животных развивалась тромбоцитопения и гипофибриногенемия. Выраженность гипофибриногенемии после введения тромбина у крыс, получавших Нотромбел (0,01 мМ/кг) и АСК (0,01 мМ/кг), была значимо меньше, чем в контроле. Различий между животными, получавшими Нотромбел и АСК, не выявлено.

Заключение. Нотромбел (0,01 мМ/кг), так же, как и АСК (0,01 мМ/кг), при курсовом двухнедельном интрагастральном ведении не вызывал спонтанных кровоизлияний и не оказывал негативного влияния на системную гемодинамику. Нотромбел, как и АСК, повышал толерантность к тромбину. Эти данные расширяют представления об антитромботическом действии Нотромбела.

Ключевые слова: Нотромбел, ацетилсалициловая кислота, системная гемодинамика, тромбин, коагулопатия потребления, тромбоциты, фибриноген

Для цитирования: Сонин Д. Л., Дементьева И. Н., Чёфу С. Г. Влияние препарата Нотромбел на системную гемодинамику и толерантность к тромбину в эксперименте. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017;16(4):65–72. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-65-72

UDC 616-005.6-08

DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-65-72

SONIN D. L.^{1, 2}, DEMENT'YEV I. N.^{1, 2},
CHEFU S. G.^{1, 2}

Effect of Notrombel on systemic hemodynamics and thrombin tolerance in the in vivo experiment

¹ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
197022, Russia, Saint Petersburg, L'va Tolstogo street, 6/8

² Institute of Experimental Medicine of the Almazov National Medical Research Centre
197341, Russia, Saint Petersburg, Akkuratova street, 2
e-mail: chefusveta@yandex.ru

Received 12.10.17; accepted 10.11.17

Summary

Objectives. The aim of the study was to investigate of the effect of administration of Notrombel, (one of the representatives of a new class of compounds, N,N'-substituted piperazines), on systemic hemodynamics and thrombin tolerance.

Material and methods. The effect of daily intragastric administration for 14 days of Notrombel (0.01 mM/kg) and ASA (0.01 mM/kg) on the risk of spontaneous hemorrhages and thrombin tolerance (intravenous bolus thrombin administration at a dose of 50 units NIH/kg) was studied in male Wistar rats. The number of circulating platelets was determined before and 5 minutes after thrombin administration. The concentration of fibrinogen after 30 min was determined by the gravimetric method according to Rutberg R.A.

Results. With the daily intragastric administration of Notrombel and ASA, spontaneous hemorrhages and increased bleeding were not observed. Blood pressure and heart rate did not differ from the control animals. Intravenous administration of thrombin caused thrombocytopenia and hypofibrinogenemia in all experimental animals. The severity of hypofibrinogenemia after thrombin administration was significantly less in rats treated with Notrombel (0.01 mM/kg) and ASA (0.01 mM/kg) than in the control group. There were no differences between Notrombel and ASA groups.

Conclusions. Daily intragastric administration of Notrombel and ASA for 14 days did not cause spontaneous hemorrhages and were not associated with any adverse hemodynamic effect. Both Notrombel and ASA increased tolerance to thrombin. These data broaden the currently available knowledge related to the antithrombotic action of Notrombel.

Key words: *Notrombel, acetylsalicylic acid, systemic hemodynamics, thrombin, consumptive coagulopathy, platelets, fibrinogen*

For citation: Sonin D. L., Dement'eva I. N., Chefu S. G. Effect of Notrombel on systemic hemodynamics and thrombin tolerance in the in vivo experiment. *Regional hemodynamics and microcirculation.* 2017;16(4):65–72. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-65-72

Введение

Согласно общепризнанной метаболически-воспалительной концепции атеросклероза, увеличение риска атеротромбоза связано с процессом дестабилизации атероматозных бляшек, которому предшествует повреждение эндотелия и воспаление в сосудистой стенке [1, 7]. Лейкоциты, тромбоциты и гладкомышечные клетки секретируют цитокины, которые стимулируют выработку окружающими клетками матриксных металлопротеиназ, разрушающих экстрацеллюлярный матрикс [10]. Возникающая в результате эрозия или разрыв покрышки атеросклеротической бляшки активируют агрегацию тромбоцитов, которая опосредуется коллагеном, тромбоксаном (ТхА₂), простагландинами (PGG₂ и PGH₂), АДФ и тромбином [23]. Одновременно с этим высвобождение тканевого фактора из ядра бляшки активирует коагуляционный каскад и образование фибрина [10].

Современная профилактика и терапия атеротромбоза включают комплекс воздействий, направленных на уменьшение проявлений дисфункции эндотелия, воспаления, нормализацию артериального давления, липидного и углеводного обмена, а также ингибирование тромбоцитов и каскада коагуляции [1, 10]. При стабильном течении атеросклероза в клинической практике широко используются аспирин и статины. Аспирин в малых дозах, блокируя тромбоксановый путь активации тромбоцитов на уровне циклооксигеназы-1, ингибирует их адгезию и агрегацию [7, 19] и улучшает функцию эндотелия [1, 25]. Однако, у части пациентов (5–40 % пациентов, в зависимости от исследования) аспирин не эффективен [7, 18]. Комбинация блокатора пуриnergических рецепторов P₂Y₁₂ клопидогреля с аспирином повышает эффективность антиагрегантной терапии и используется при остром коронарном синдроме и чрескожных коронарных вмешательствах (ЧКВ) [7].

Несмотря на соблюдение оптимальной двойной антиагрегантной терапии и вазопротекции, у 10–12 % пациентов в течение года после ЧКВ случается

атеротромбоз. Эта ситуация в литературе названа «клиническая резистентность к антиагрегантам» [8, 15, 24]. Проблема резистентности определяется рядом факторов, включая гиперреактивность тромбоцитов, которая ставит вопрос о необходимости введении третьего антиагреганта [9, 24]. Одним из способов решения проблемы резистентности является поиск нового соединения, обладающего широким спектром действия на различные типы рецепторов тромбоцитов.

Среди перспективных для профилактики и лечения атеротромбоза препаратов представляют интерес производные N-замещенных пиперазинов, обладающие широким спектром действия на кровеносную систему и систему гемостаза [2–6, 11, 12].

Установлено, что один из N,N'-замещенных пиперазинов, содержащий карбоксимидамидную группу (Нотромбел), обладает свойствами универсального ингибитора агрегации тромбоцитов – подавляет экспрессию P-селектина, уменьшает экспрессию тромбоцитарного мембранного комплекса GPIb-IX-V и тормозит тромбин-индуцированное образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов. Возможными мишенями для Нотромбела являются тромбоксановый (тромбоксансинтаза) путь передачи сигнала активации, а также непосредственно мембранные рецепторы GPIb-IX-V [4–6]. В опытах *in vivo* Нотромбел эффективно предотвращал развитие тромбоза бедренной артерии при фотодинамическом повреждении сосудистой стенки у крыс [2].

Нотромбел рассматривается как универсальный антитромботический препарат, вместе с тем до настоящего времени не проводились исследования безопасности курсового интрагастрального введения Нотромбела с точки зрения повышения риска кровоточивости и его влияния *in vivo* на толерантность к тромбину.

Цель исследования – изучение влияния введения препарата Нотромбел, одного из представителей нового

класса соединений – N,N'-замещенных пиперазинов – на системную гемодинамику и толерантность к тромбину.

Материал и методы исследования

Экспериментальные животные

Исследования проводились на крысах-самцах линии Вистар (возраст – 15–18 недель, масса – 250–270 г) (ФГУП «Питомник лабораторных животных "Рапполово"») в полном соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» [19]. Проведение исследования согласовано с Этическим комитетом ПСПбГМУ им. И. П. Павлова.

Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 ООО «Лабораторкорм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температура поддерживалась в пределах 22–25 °С, относительная влажность – 50–70 %. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней.

Введение препаратов

Препарат Нотромбел (соединение VR-0411) растворяли в стерильной очищенной воде.

В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (АСК) (*Sigma Aldrich*, США), механизм действия которой хорошо изучен. АСК растворяли в стерильной очищенной воде для инъекций при нагревании на водяной бане до 40,0 °С и периодическом энергичном встряхивании до полного растворения кристаллов.

Крысам растворы исследуемых препаратов вводили в фиксированный световой период (с 10.30 до 13.00 вне зависимости от приема пищи) интрагастрально (через зонд) из расчета 4 мл/кг в течение 14 суток в дозах:

Нотромбел: 0,01 мМ/кг;

АСК: 0,01 мМ/кг;

контроль: вода 4 мл/кг.

Исследование толерантности к тромбину проводили через 24 ч после 14-го введения препаратов либо воды.

Исследование влияния Нотромбела на системную гемодинамику

Исследование проводили под общей анестезией (хлоралгидрат 430 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией со скоростью 215 мг/кг/ч через пластиковый катетер, введенный в бедренную вену).

В течение всего эксперимента животные находились на термостатируемом операционном столике, обеспечивающем поддержание температуры тела на уровне $37,0 \pm 0,5$ °С. После введения животного в наркоз выполняли катетеризацию бедренной вены для введения исследуемых растворов. Для мониторинга артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) выделялась и катетеризовалась общая сонная артерия. В артерию вводилась полиэтиленовая трубка (PE-50, *Intramedic*, США), которая соединялась с миниатюрным датчи-

ком давления (*Baxter*, США). Гемодинамические параметры регистрировались на компьютере с помощью программного обеспечения «PhysExp» (ООО «Кардиопротект», Санкт-Петербург). Введение тестируемых растворов проводили через 20–30 мин после окончания хирургических манипуляций и при условии стабильной гемодинамики.

Исследование влияния Нотромбела на толерантность к тромбину

Через 24 ч после последнего введения исследуемых препаратов проводили исследование толерантности к тромбину по методу [14]. Использовали тромбин (ООО «Технология-Стандарт», РФ), фасовка 150 ед. НИН.

Разведение препарата: во флакон с тромбином вносили 3,0 мл 0,9 %-го стерильного раствора хлорида натрия и растворяли содержимое при комнатной температуре (+18–25 °С) и легком покачивании в течение 3 мин и, таким образом, получали раствор тромбина (50 ед. НИН/мл) (активность – 15 с).

Для определения активности тромбина использовали фибриноген человека (ООО «Технология-Стандарт», РФ). Разведение реактива: во флакон с фибриногеном вносили 2,0 мл дистиллированной воды и растворяли содержимое при комнатной температуре (+18–25 °С) и легком покачивании в течение 3 мин.

Через 30 мин от окончания хирургических манипуляций и при условии стабилизации гемодинамических параметров в течение 10–15 мин в левую яремную вену болюсно в течение 10 с вводили тромбин (50 ед. НИН/кг в 0,9 %-м растворе хлорида натрия, объем введения – 2 мл/кг). В контроле части животных вводили тромбин (Контроль-1), части – вместо тромбина вводили 0,9 %-й стерильный хлорид натрия в дозе 2 мл/кг (Контроль-2). Продолжительность последующего наблюдения составляла 30 мин.

Забор крови для определения количества тромбоцитов проводили перед введением тромбина, а также через 5 мин после введения тромбина из кончика хвоста (кроме группы Контроль-2). Забор крови для определения концентрации тромбина проводили из правой яремной вены через 30 мин после введения тромбина (стабилизатор – цитрат натрия 3,2 %, 1 часть на 9 частей крови).

После забора крови животных умерщвляли (обескровливанием путем вскрытия брюшной полости и перерезки аорты и задней полой вены) и через 3 мин после гибели (прекращения сердечных сокращений и дыхательных движений) проводили вскрытие и макроскопический осмотр жизненно важных органов.

Определение концентрации фибриногена

Определение концентрации фибриногена проводили гравиметрическим методом по Р. А. Рутбергу.

Для образования фибринового сгустка использовали тромбин (ООО «Технология-Стандарт», РФ), фасовка 150 ед. НИН, в разведении 50 ед. НИН/мл (активность – 15 с). К 1 мл плазмы крови добавляли 0,1 мл 5 %-го раствора хлорида кальция и 0,1 мл раствора тромбина. Образовавшийся сгусток переносили на обеззоленный бумажный фильтр (Красная лента,

Таблица 1		
Исходные параметры системной гемодинамики		
Table 1		
Baseline hemodynamic parameters		
Группа	Артериальное давление, мм рт. ст.	Частота сердечных сокращений, уд./мин
Контроль (n=5)	116,0±19,0	403,2±37,6
Нотромбел (n=6)	126,3±11,7	444,0±15,2
АСК (n=5)	120,2±15,8	405,6±59,6

ООО «Мелиор XXI») и просушивали другим фильтром до сухого состояния. Для расчета концентрации фибриногена в плазме крови массу сгустка умножали на коэффициент 0,222.

Остаточную концентрацию фибриногена по отношению к величине, найденной у интактных крыс, рассчитывали по формуле:

$$D = \{1 - [(C_k - C_o) : C_k]\} 100,$$

где D – остаточная концентрация фибриногена, %; C_k – концентрация у крыс контрольной группы (Контроль-2 – ни тромбин, ни препараты не вводили); C_o – концентрация фибриногена у крыс опытной группы).

Остаточная концентрация является характеристикой толерантности к тромбину – ее значения у крыс, которым тромбин ввели без предварительных воздействий, принимали за 100 %-ю толерантность к тромбину. Это позволяет рассчитать изменения толерантности в процентах: остаточная концентрация фибриногена в плазме крови (в % к исходной) у интактных крыс = 100 %-й толерантности; у животных сравняемой группы толерантность равна X % [14].

Морфологическое исследование

Морфологическому исследованию подвергнуто 4 животных из числа получавших интрагастрально Нотромбел (0,01 мМ/кг) и АСК (0,01 мМ/кг). После забора крови для исследования агрегации тромбоцитов животных подвергали эвтаназии (внутривенное введение 20 %-го раствора уретана в дозе 5 мл/кг). Через 5 мин после прекращения дыхательных движений и сердечных сокращений проводили вскрытие и морфологическое исследование макроскопическим методом.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics Version 20. Значимость различий из-

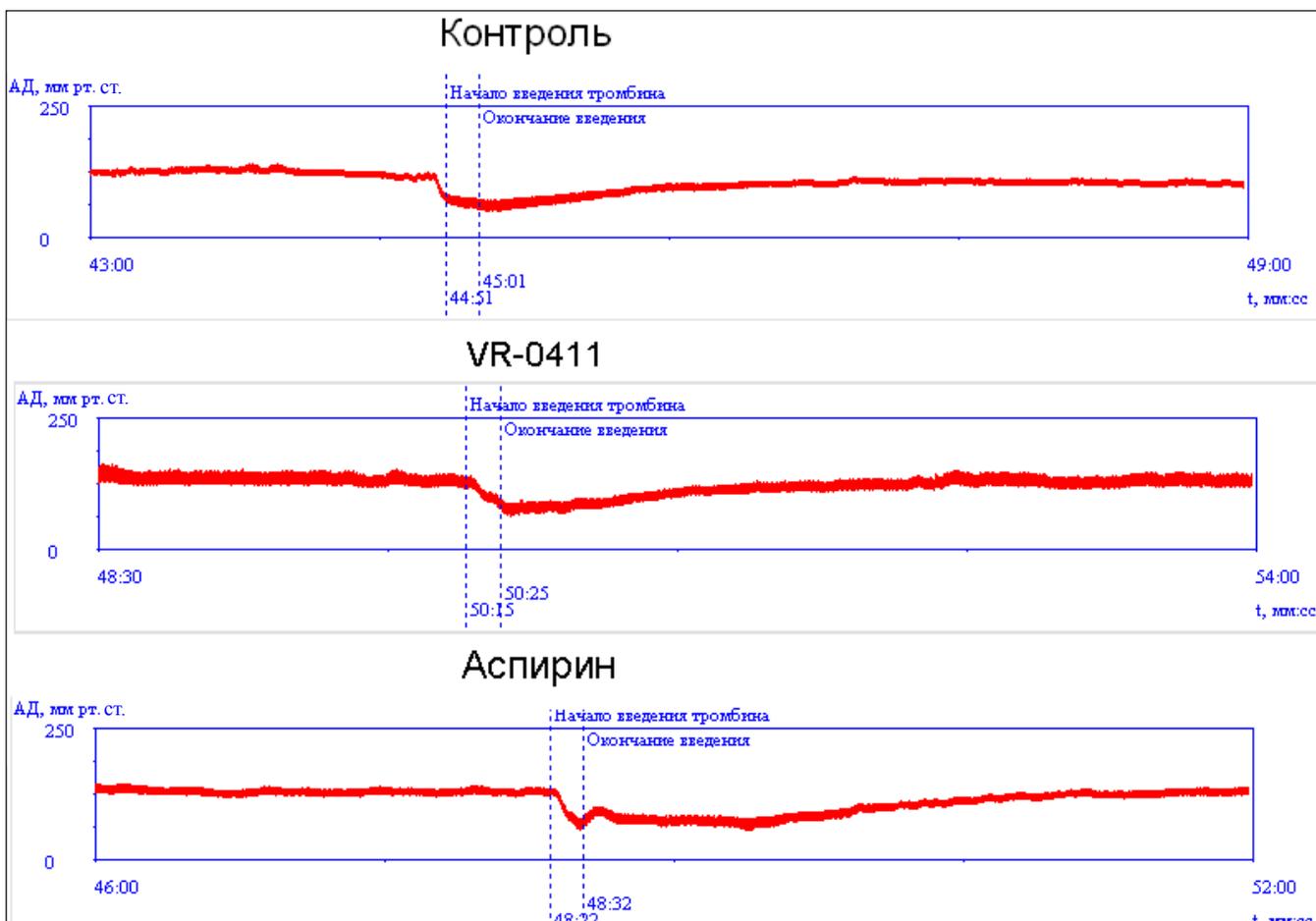


Рис. 1. Запись артериального давления с помощью программно-аппаратного комплекса PhysExp во время действия тромбина: VR-0411 – Нотромбел, Аспирин – ацетилсалициловая кислота

Fig. 1. Arterial pressure recordings during thrombin administration by hardware-software complex PhysExp

меряемых параметров оценивалась с помощью критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Значения p менее чем 0,05 рассматривались как значимые. Результаты представлены в виде $M \pm m$.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние курсового применения Нотромбела и АСК на наличие спонтанных кровоизлияний

В период интрагастрального введения препаратов не выявлено изменений общего состояния, внешнего вида и поведения ни у одного из исследованных животных. Макроскопическое исследование слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, бронхиального дерева, мочевыводящих путей крыс, получавших Нотромбел ($n=4$) или АСК ($n=4$) в дозе 0,01 мМ/кг, не выявило признаков спонтанных кровоизлияний. У всех исследованных животных слизистые оболочки были нормального цвета, блестящие, без кровоизлияний и иных патологических изменений. Также не выявлено признаков спонтанных кровотечений в печени, почках, легких, головном мозге, сердце и селезенке. Таким образом, Нотромбел, так же как и АСК, при двухнедельном ежедневном интрагастральном введении в дозе 0,01 мМ/кг не вызывает спонтанных кровотечений.

Влияние Нотромбела и АСК на системную гемодинамику

Через 24 ч после 14-го интрагастрального введения тестируемых препаратов в дозе 0,01 мМ/кг животных наркотизировали и через 30 мин измеряли среднее АД и ЧСС. Результаты измерений представлены в табл. 1. Уровни гемодинамических параметров достоверно не различались между группами.

Влияние Нотромбела и АСК на толерантность животных к тромбину

При проведении хирургических манипуляций у экспериментальных животных повышенной кровоточивости не наблюдалось. В 30-минутный период после введения тромбина не погибло ни одно животное.

Через несколько секунд от начала внутривенного введения тромбина уровень среднего АД достоверно снижался и через 1–2 мин возвращался к исходному уровню (рис. 1; 2). Снижение уровня АД от исходного уровня у крыс группы Контроль-1 составило $43,0 \pm 16,8$ % ($n=5$), Нотромбел – $42,5 \pm 13,3$ % ($n=6$) и у АСК – $40,7 \pm 9,9$ % ($n=5$). ЧСС в трех группах достоверно не изменялось. Таким образом, различий в гипотензивном эффекте тромбина между тремя группами животных выявлено не было.

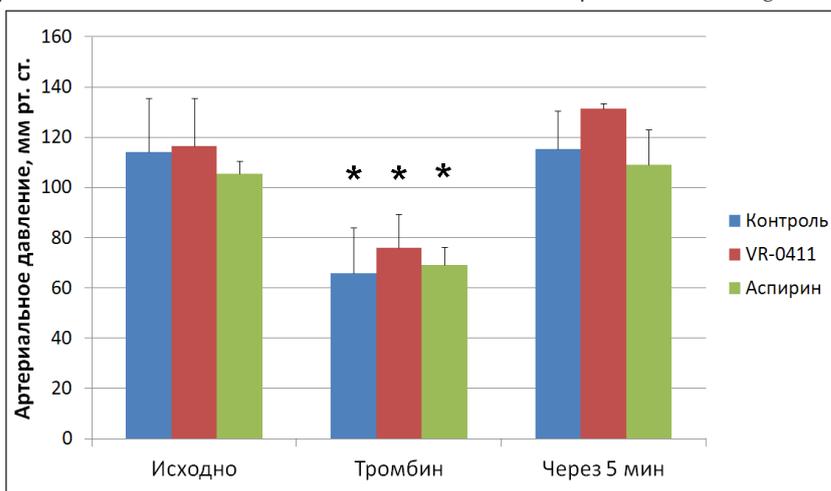


Рис. 2. Сравнение выраженности изменений гемодинамики, вызываемых тромбином, на фоне действия Нотромбела (VR-0411) и АСК (Аспирин): * – $p < 0,05$ при сравнении с исходными значениями (критерий Вилкоксона)
Fig. 2. Comparison of the severity of hemodynamic changes caused by thrombin during the action of Notrombel and ASA: * – $p < 0,05$ when compared with baseline values (Wilcoxon test)

В контроле через 5 мин после введения тромбина значительно снижалось количество тромбоцитов (табл. 2); через 30 мин концентрация фибриногена в крови была значительно ниже, чем в Контроле-2 (табл. 3). Выраженная тромбоцитопения и гипофибриногенемия после введения тромбина свидетельствуют о развитии у крыс коагулопатии потребления.

В группе крыс, получавших интрагастрально Нотромбел в дозе 0,01 мМ/кг, исходное количество тромбоцитов было выше, чем в контроле (Контроль-1), в среднем на 19 %. Через 5 мин после введения тромбина развивалась выраженная тромбоцитопения; через 30 мин концентрация фибриногена была значительно ниже, чем в группе Контроль-2 ($p < 0,01$). Эти данные свидетельствуют о развитии у крыс коагулопатии потребления. Достоверных различий в динамике количества тромбоцитов с животными, не получавшими препарат, не отмечалось, однако концентрация фибриногена была выше, чем в Контроле-1 ($p < 0,05$), что свидетельствует о более легком течении коагулопатии. Рассчитанная по описанной выше методике толерантность к тромбину составила 121,5 %.

Таблица 2

Количество тромбоцитов у крыс до и после введения тромбина

Table 2

The number of platelets in the blood of rats before and after injection of thrombin

Количество тромбоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	Контроль-1 ($n=7$)	Нотромбел ($n=8$)	АСК ($n=7$)
До введения тромбина	767,1 \pm 59,4	913,8 \pm 57,1#	917,1 \pm 51,7#
Через 5 мин после введения тромбина	428,6 \pm 29,8**	587,5 \pm 92,8**	470,0 \pm 57,1**
% убыли тромбоцитов	43,6 \pm 3,1	38,0 \pm 6,3	49,4 \pm 4,5

** – $p < 0,01$ по сравнению с показателями до введения тромбина;

– $p < 0,05$ по сравнению с животными, не получавшими препарат.

Концентрация фибриногена у крыс через 30 мин после введения тромбина

Table 3

Concentration of fibrinogen in rats at 30 minutes after thrombin administration

Показатель	Контроль-2 (n=13)	Контроль-1 (n=12)	Нотромбел (n=10)	АСК (n=10)
Концентрация фибриногена, г/л (M±m)	2,80±0,08	1,21±0,06**	1,47±0,08** #	1,41±0,07** #
Остаточная концентрация фибриногена по отношению к интактным животным (Контроль-2), %	100	43,2	52,5	50,4
Толерантность к тромбину, %		100	121,5	116,5

** – $p < 0,01$ по сравнению с группой Контроль-2; # – $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль-1.

В группе животных, получавших интрагастрально АСК в дозе 0,01 мМ/кг, как и у получавших Нотромбел, исходное количество тромбоцитов было выше (в среднем на 20 %), чем у крыс контрольной группы. Через 5 мин после введения тромбина наблюдалось резкое уменьшение количества тромбоцитов; через 30 мин концентрация фибриногена в крови была значительно ниже, чем в группе Контроль-2 ($p < 0,01$), что свидетельствует о развитии коагулопатии потребления. Достоверных различий в динамике количества тромбоцитов с животными, не получавшими препарат, не отмечалось, а концентрация фибриногена была выше, чем в Контроле-1 ($p < 0,05$). Толерантность к тромбину составила 116,5 %.

На вскрытии кровь в артериях и венах жидкая, без видимых сгустков; видимых кровоизлияний в легких, миокарде, печени, почках не наблюдалось.

Таким образом, Нотромбел (0,01 мМ/кг), так же, как и АСК (0,01 мМ/кг), при курсовом двухнедельном интрагастральном ведении значительно уменьшали выраженность коагулопатии потребления после внутривенного введения тромбина, о чем свидетельствует менее выраженная гипофибриногенемия, чем в контроле. Различий между животными, получавшими Нотромбел и препарат сравнения АСК, не было.

По литературным данным, АСК повышает устойчивость животных к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) как на тромбиновой модели у крыс [14], так и на коллаген-эпинефриновой модели у мышей [16]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что Нотромбел по эффективности повышения толерантности к тромбину не уступает АСК.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что длительное интрагастральное введение Нотромбела в тестируемых дозах безопасно, поскольку он не изменяет общего состояния животных, не вызывает спонтанных кровотечений и не ведет к изменению системной гемодинамики и реактивности сердечно-сосудистой системы.

По литературным данным, аспирин при курсовом (7-суточном) приеме повышал количество тромбоцитов в крови и общую тромбоцитарную массу у здоровых добровольцев, предположительно, в результате прямого влияния АСК на созревание мегакариоцитов или опосредованного через наличие или отсутствие месенджеров, выделяемых активированными или инактивированными тромбоцитами соответственно;

при этом авторы увеличения уровня тромбопоэтина не наблюдали [17]. В наших исследованиях увеличение количества тромбоцитов наблюдалось после курсового приема как АСК, так и Нотромбела.

Как видно из рис. 1 и 2, введение тромбина вызвало быстрое, выраженное, но кратковременное снижение уровня артериального давления. При введении тромбина на фоне АСК и Нотромбела разницы с контролем в выраженности гипотензивного эффекта не наблюдалось. Это может быть связано с эндотелийзависимой вазорелаксацией через PAR-1-рецепторы, активируемые тромбином [22, 26], а также с образованием в микрососудах легких микроагрегатов, состоящих из фибрина и форменных элементов крови – тромбоцитов и нейтрофилов [20, 21], развитием кратковременной микроэмболии сосудов малого круга и рефлекторным расширением сосудов большого круга кровообращения.

Хотя Нотромбел не предотвращал падения АД, но не в меньшей степени, чем АСК, предотвращал убыль фибриногена.

Нотромбел проявляет универсальные свойства антиагреганта, блокирующего три различных пути активации тромбоцитов (АДФ, арахидоновой кислоты и коллагена), сопоставимые с препаратом сравнения АСК [17]. Нотромбел (соединение VR-0411), как и АСК, ингибирует тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Возможными мишенями препарата являются тромбоксановый (тромбоксансинтаза) и полифосфоинозитидный (образование IP_3) пути передачи сигнала активации [3].

По литературным данным, АСК повышает толерантность к тромбину у крыс [20], а также устойчивость к развитию ДВС на коллаген-эпинефриновой модели у мышей [16]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что Нотромбел по эффективности повышения толерантности к тромбину не уступает АСК.

Заключение

Нотромбел (0,01 мМ/кг), так же, как и АСК (0,01 мМ/кг), при курсовом двухнедельном интрагастральном ведении не вызывал спонтанных кровоизлияний и не оказывал негативного влияния на системную гемодинамику. Нотромбел, как и АСК, повышал толерантность к тромбину. Эти данные расширяют представления об антитромботическом действии Нотромбела.

Конфликт интересов / Conflict of interests

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Баркаган З. С., Костюченко Г. И. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных // Сибирский научный медицинский журнал. – 2006. – Т. 26. – № 2. – С. 132–138. [Barkagan Z.S., Kostyuchenko G.I. Inflammatory metabolic conception of atherothrombosis and new approaches to therapy of patients. Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal. 2006;(2):132–138. (In Russ).]
2. Васина Е. Ю., Чёфу С. Г., Петрищев Н. Н., Весёлкина О. С. Влияние препарата Нотромбел на процесс фотоиндуцированного тромбообразования // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 70–75. [Vasina E. Y., Chefu S. G., Petrishchev N. N., Veselkina O. S. The influence of Notrombel on the process of photo-induced thrombogenesis Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya. 2017. T. 16. № 3. C. 70-75. (In Russ).]
3. Веселкина О. С., Петрищев Н. Н., Васина Л. В. и др. Влияние новых соединений, N,N'-замещенных пиперазинов, на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. – № 8. – С. 28–33. [Veselkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V. et al. Influence of New N,N'-Substituted Piperazines on Thrombin-Induced Platelet Activation. Eksp Klin Farmakol. 2014;77(8):28-33. (In Russ).]
4. Веселкина О. С., Петрищев Н. Н., Васина Л. В. и др. Влияние препарата Нотромбел на экспрессию мембранного комплекса GPIIb-IX-V тромбоцитами, активированными тромбином // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2016. – Т. 102. – № 5. – С. 590–596. [Veselkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V. et al. Nothrombel effect on the expression of membrane complex gpib-ix-v platelets activated by thrombin Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova. 2016; 102(5):590-596. (In Russ).]
5. Веселкина О. С., Петрищев Н. Н., Васина Л. В. и др. Влияние препарата Нотромбел на тромбин-индуцированное образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т. 103. – № 3. – С. 318–326. [Veselkina O.S., Petrishchev N.N., Vasina L.V. et al. Nothrombel effect on the formation of platelet-leukocyte complexes induced by thrombin. Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova. 2017;103(3):318-326. (In Russ).]
6. Веселкина О. С., Соловцова И. Л., Петрищев Н. Н. и др. Влияние M,N-замещенных пиперазинов на цитоллиз // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – № 11. – С. 25–31. [Veselkina O. S., Solovcova I. L., Petrishchev N. N. et al. Vliyanie M,N-zameshchennyh piperazinov na citoliz. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2015. T. 49, № 11. S. 25-31. (In Russ).]
7. Духанин А. С., Шимановский Н. Л. Современные тенденции в применении антитромбоцитарных препаратов для профилактики атеротромботических событий // Международный медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 88–94. [Modern tendencies in administration of anti-thrombocyte medication in prevention of atherothrombotic events. Mezhdunarodnyj medicinskij zhurnal. 2011; (2): 88–94. Dukhanin A. S., Shimanovsky N. L. (In Russ).]
8. Кулешова Э. В., Дорофейков В. В., Вавилова А. В. и др. Резистентность к аспирину у больных ИБС по данным импедансной агрегатометрии // Бюллетень ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова. – 2010. – № 5. – С. 49–54. [Kuleshova E. V., Dorofeykov V. V., Vavilova A. V. et al. Aspirin resistance in the patients with ischemic heart disease assessed by impedance aggregometry. Byulleten' FCSKEH im. V.A. Almazova. 2010; (5): 49-54. (In Russ).]
9. Лишневецкая В. Ю. Сегодняшний день антитромбоцитарной терапии // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2009. – № 2. – С. 23–36. [Lishnevskaya V.YU. Antiplatelets therapy today. Tromboz gemostaz i reologiya. 2009;(2):23–36. (In Russ).]
10. Панченко Е. П. Атеротромбоз: механизмы развития и реально проводимая терапия // Атеротромбоз. – 2008. – № 1. – С. 22–26. [Panchenko E.P. Aterotromboz: mekhanizmy razvitiya i real'no provodimaya terapiya. Aterotromboz. 2008;(1):22–26. (In Russ).]
11. Патент РФ на изобретение № 2 469 029/10.12.2012. Бюл. № 34. Веселкина О. С., Викторов Н. Б., Петрищев Н. Н., Поплавская Ю. В. Вещество, обладающее сочетанной антиагрегантной, антикоагулянтной и вазодилаторной активностью, N,N'-замещенные пиперазины и способ их получения. [Patent RUS № 2 469 029/10.12.2012. Byul. № 34. Veselkina O.S., Viktorov N.B., Petrishchev N.N., Poplavskaya YU.V. Vveshchestvo, obladayushchee sochetannoj antiagregantnoj, anikoagulyantnoj i vazodilatatornij aktivnost'yu, N,N'-zameshchennye piperaziny i sposob ih polucheniya. (In Russ).] Доступно по: <http://www.freepatent.ru/images/patents/146/2469029/patent-2469029.pdf>. Ссылка активна на 18.11.2017.
12. Петрищев Н. Н., Васина Л. В., Копатько С. А., Веселкина О. С. Скрининговое исследование антиагрегантных свойств N,N-замещенных пиперазинов // Сборник тезисов докладов III Международного конгресса «Кардиология на перекрестке наук» совместно с VII Международным симпозиумом по эхокардиографии и соудистому ультразвуку, XIX ежегодной научно-практической конференцией «Актуальные вопросы кардиологии», Тюмень, 16–18 мая 2012 г. – Тюмень, 2012. – С. 186–187. [Petrishchev N.N., Vasina L.V., Kopat'ko S.A., Veselkina O.S. Skringingovoe issledovanie antiagregantnyh svojstv N,N-zameshchennyh piperazinov // Sbornik tezisov dokladov III Mezhdunarodnogo kongressa «Kardiologiya na perekrestke nauk» sovmestno s VII Mezhdunarodnym simpoziumom po ehkrokardiografii i sosudistomu ul'trazvuku, XIX ezhegodnoj nauchno-prakticheskoy konferenciej «Aktual'nye voprosy kardiologii», Tyumen', 16-18 maya. 2012. Tyumen';2012. – P. 186-187. (In Russ).]
13. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова / И. В. Белозерцева, О. А. Драволлина, М. А. Тур; под ред. Э. Э. Звартау. – СПб.: СПбГМУ, 2014. – 80 с. [Rukovodstvo po ispol'zovaniyu laboratornyh zhitovnyh dlya nauchnyh i uchebnyh celej v PSPbGMU im. akad. I.P. Pavlova / Belozerceva I.V., Dravolina O.A., Tur M.A.; pod red. E.H.EH. Zvartau. – SPb, izd-vo SPbGMU, 2014. – 80 p. (In Russ).]
14. Сулкарнаева Г. А., Согрин Э. Н., Бышевский А. Ш., Шаповалов П. Я. Методика количественного определения толерантности животных к тромбину // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 5 – С. 70–71. [Sulkarnaeva G.A. Sogrin E.H.N. Byshevskij A.SH. SHapovalov P.YA. Metodika kolichestvennogo opredeleniya tolerantnosti zhitovnyh k trombinu. Sovremennye naukoemkie tekhnologii. 2004;(5):70-71. (In Russ).]
15. Angiolillo D.J. Variability in responsiveness to oral antiplatelet therapy. Am J Cardiol. 2009;103(3 Suppl): 27A-34A.
16. DiMinno G., Silver M.J. Mouse Antithrombotic Assay: A Simple Method for the Evaluation of Antithrombotic Agents in vivo. Potentiation of Antithrombotic Activity by Ethyl Alcohol. J Pharmacol Exp Ther. 1983;225(1):57–60.

17. Erhart S, Beer JH, Reinhart WH. Influence of Aspirin on Platelet Count and Volume in Humans. *Acta Haematol.* 1999;101:140–144.

18. Ferreiro JL, Angiolillo DJ. New Directions in Antiplatelet Therapy. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5:433–445. <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.111.966176>.

19. Furuno T, Yamasaki F, Yokoyama T, Sato K., Sato T, Doi Y, Sugiura T. Effects of various doses of aspirin on platelet activity and endothelial function. *Heart. Vessels.* 2011;(3): 267–73. doi: 10.1007/s00380-010-0054-8.

20. Garcia-Szabo R, Kern DF, Malik AB. Pulmonary vascular response to thrombin: effects of thromboxane synthetase inhibition with OKY-046 and OKY-1581. *Prostaglandins.* 1984;28(6):851–66.

21. Kaplan JE(1), Malik AB. Thrombin-induced intravascular coagulation: role in vascular injury. // *Semin Thromb Hemost.* 1987;13(4):398–415.

22. Ku DD, Zaleski JK. Receptor mechanism of thrombin-induced endothelium-dependent and endothelium-independent coronary vascular effects in dogs. // *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22(4):609–16.

23. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(9): 883–884. doi: 10.1056/NEJMc1307806.

24. Patrick W.L., Patel C., Guddeti R., Narayan A., Madaleni M., Kumar S., Dolma K., Serla V.V., Sangha M., Govindavarjulla A., Saddala P., Singh P., Halaby R., Gibson C.M. Is there a need for «triple therapy»? Role of anticoagulation with dual antiplatelet therapy in acute coronary syndromes (ATLAS Study & TRAP Study). *Curr Cardiol Rep.* 2013;15(10): 411. doi: 10.1007/s11886-013-0411-1.

25. Taubert D., Berkels R., Grosser N., Schröder H., Gröndemann D., Schömig E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action.

Br. J. Pharmacol. 143(1): 159–165. 2004. DOI:10.1038/sj.bjp.0705907.

26. Tesfamariam B, Allen GT, Normandin D, Antonaccio MJ. Involvement of the «tethered ligand» receptor in thrombin-induced endothelium-mediated relaxations. // *Am J Physiol.* 1993;265(5 Pt 2):H1744–9.

Сведения об авторах

Сонин Дмитрий Леонидович – кандидат медицинских наук, заведующий Отделом микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, e-mail: sonin_dl@almazovcentre.ru.

Дементьева Ирина Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра лазерной медицины (НОИ биомедицины) Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова.

Чефу Светлана Григорьевна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальных исследований Центра лазерной медицины (НОИ биомедицины) Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, e-mail: chefusveta@yandex.ru.

Author information

Sonin Dmitry Leonidovich – Candidate of Medical Sciences, Head of the Division of microcirculation and myocardial metabolism, Institute of Experimental Medicine, V. A. Almazov National Medical Research Centre, e-mail: sonin_dl@almazovcentre.ru.

Dement'eva Irina Nikolaevna – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Laser Medicine Center, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

Chefu Svetlana Grigoryevna – Candidate of Biological Sciences, Head of Experimental Research Laboratory of the Laser Medicine Center, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, e-mail: chefusveta@yandex.ru.