

Экспериментальные исследования  
ПЕТРИЩЕВ Н. Н.<sup>1,2</sup>, ВЕСЕЛКИНА О. С.<sup>3</sup>,  
ЧЕФУ С. Г.<sup>1,2</sup>, ДЕМЕНТЬЕВА И. Н.<sup>1,2</sup>,  
ВАСИНА Е. Ю.<sup>1,2</sup>

## Влияние Озагрела на процесс тромбообразования

<sup>1</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им.акад. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург.

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И. П. Павлова

<sup>3</sup> ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург  
e-mail: chefusveta@yandex.ru

### Реферат

Проведено исследование внутривенного введения Озагрела на агрегационную активность тромбоцитов, фибринолитическую активность плазмы крови и течение экспериментального тромбоза у крыс-самцов Вистар. Показано, что Озагрел дозозависимо ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, препятствует тромбообразованию при фотоповреждении сосудистой стенки и замедляет спонтанный фибринолиз.

*Ключевые слова:* Озагрел, фототромбоз, крысы, тромбоциты, агрегация, фибринолиз.

Petrishchev N. N.<sup>1,2</sup>, Veselkina O. S.<sup>3</sup>, Chefu S. G.<sup>1,2</sup>,  
Dement'eva I. N.<sup>1,2</sup>, Vasina E. Yu.<sup>1,2</sup>

## The effect of Ozagrel on thrombogenesis

<sup>1</sup> V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint-Petersburg

<sup>2</sup> I. P. Pavlov Federal Medical University, Saint-Petersburg

<sup>3</sup> VERTEX Pharmaceutical Company, Saint-Petersburg  
e-mail: chefusveta@yandex.ru

### Abstract

The effect of intravenous Ozagrel (OKY-046) administration on platelet aggregation, fibrinolytic activity of blood plasma, and experimental thrombosis was investigated in male Wistar rats. It was shown that ozagrel dose-dependently inhibits ADP-induced platelet aggregation, prevents thrombogenesis after photoinduced vascular injury and retards spontaneous fibrinolysis.

*Keywords:* Ozagrel, photothrombosis, rat, platelets, aggregation, fibrinolysis.

### Введение

В последние годы все более широкое применение в клинической практике находит избирательный ингибитор тромбосан А2-синтетазы Озагрел — (Е)-3-[4-(1Н-Имидазолилметил)фенил]-2-пропеновая кислота, ОКУ-046), исследования которого ведутся с 1981 г. [20], однако механизм действия препарата до конца не изучен.

Озагрел ингибирует синтез тромбосана А2, снижает индуцированную арахидоновой кислотой и коллагеном агрегацию тромбоцитов, не отменяя при этом стимулированное этими препаратами увеличение синтеза простагландинов, удлиняет время кровотечения [16]. Уменьшает проявления аллергической реакции в дыхательных путях (отек слизистой оболочки, бронхоспазм) [10, 11].

Озагрел применяется при бронхиальной астме и при цереброваскулярных заболеваниях, а также эмболии и тромбозе артерий как противоаллергическое, антиагрегационное, антитромботическое средство [17, 24, 25].

В экспериментальных исследованиях показано, что препарат ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, арахидоновой кислотой, коллагеном, и тормозит образование тромба при повреждении вен [16, 18].

Вместе с тем механизмы антитромботического действия Озагрела окончательно не установлены.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния Озагрела на агрегационную активность тромбоцитов и фибринолитическую активность

крови *ex vivo* и процесс тромбообразования при фотоповреждении сосудистой стенки.

### Материал и методы исследования

#### Экспериментальные животные

Исследования проводились на крысах-самцах линии Вистар (возраст — 18–22 недели, масса — 250–300 г) (РАН, питомник лабораторных животных Института физиологии им. И. П. Павлова, Колтуши). Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 фирмы «Информ-корм», Россия) и воды.

#### Введение Озагрела

Озагрел вводили в дозах 0,1 мМ/кг, 0,025 мМ/кг, 0,01 мМ/кг и 0,001 мМ/кг в 1 мл физиологического раствора в хвостовую вену. В контроле вводили 1 мл физиологического раствора.

Дальнейшие манипуляции (забор крови для определения агрегационной активности тромбоцитов и времени спонтанного фибринолиза, моделирование тромбоза) проводили через 60 минут после введения препарата под наркозом (тиопентал-натрий 50 мг/кг внутривенно в 1 мл физиологического раствора).

#### Определение агрегационной активности тромбоцитов в цельной крови крыс

Забор крови в объеме 5 мл у крыс осуществляли в течение 40–60 секунд из правой бедренной вены через 1 час после введения Озагрела либо физиологического раствора. В качестве стабилизатора использовали раствор гепарина (Московский эндокринный завод) из расчета 50 ЕД/мл крови. Соотношение крови и стабилизатора составляло 9:1. Кровь помещали в силиконизированные пробирки и осторожно перемешивали. Исследование агрегационной активности тромбоцитов производили в цельной крови через 30 мин от момента забора крови на импедансном агрегометре АИ-300 при стандартной температуре (37 °С) и постоянной скорости перемешивания (1100 об/мин) [4].

В качестве индуктора использовали раствор династриевой соли АДФ (Мм. 427,2, «Reanal», Венгрия) в физиологическом растворе в конечной концентрации в пробе  $2,55 \cdot 10^{-4}$  М. Соотношение объемов индуктора агрегации и пробы цельной крови составляло 1:12.

#### Моделирование тромбоза

Для моделирования тромбоза через 50 минут после введения Озагрела в левую бедренную вену вводили фотосенсибилизатор бенгальский розовый (Acros Organic, США) в дозе 17 мг/кг в 1 мл физиологического раствора [6, 8].

После введения фотосенсибилизатора производили разрез длиной около 2 см на внутренней поверхности правого бедра животного. Участок бедренной артерии длиной около 5 мм освобождали от окружающих тканей выделяли из сосудисто-нервного пучка. Под данный участок артерии подводили полосу непрозрачного черного пластика шириной 3мм, изолируя тем самым вену и окружающие ткани от облучения. Облучение проводили при помощи диодного лазера «DPSS-лазер» (Diode Pump Solid

State Laser, Южная Корея) (длина волны — 532 нм, мощность — 60 мВт, площадь облучения — 1 мм<sup>2</sup>) в течение 30 минут.

Исследование кровотока в бедренной артерии проводили при помощи высокочастотной ультразвуковой доплерографии (прибор «Минимакс-Допплер-К», частота датчика — 20 МГц). Оценивались скорость кровотока непосредственно перед облучением (фон) и каждые 5 минут после облучения.

Определение времени спонтанного фибринолиза проводили по методу Ковальского [2, 13].

Забор стабилизированной цитратом натрия (3,2 %) крови в объеме 5 мл у крыс осуществляли в течение 40±60 секунд из бедренной вены. Соотношение крови и стабилизатора составляло 9:1. Стабилизированную кровь для получения бедной тромбоцитами плазмы центрифугировали в течение 15 минут на скорости 1200g (Центрифуга СМ 6.02).

Для проведения анализа использовали набор реагентов для исследования спонтанного эуглобулинового фибринолиза фирмы ООО «Технология-стандарт» (Россия, Барнаул) в соответствии с инструкцией. Укорочение времени лизиса свидетельствует об активации, а удлинение — об угнетении фибринолиза.

#### Статистическая обработка результатов

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Значения Р менее чем 0,05 рассматривались как значимые. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

#### Влияния Озагрела на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в цельной крови крыс при определении импедансным методом составляли в контроле  $5,0 \pm 0,5$  Ом, что соответствует значениям у здоровых животных [3].

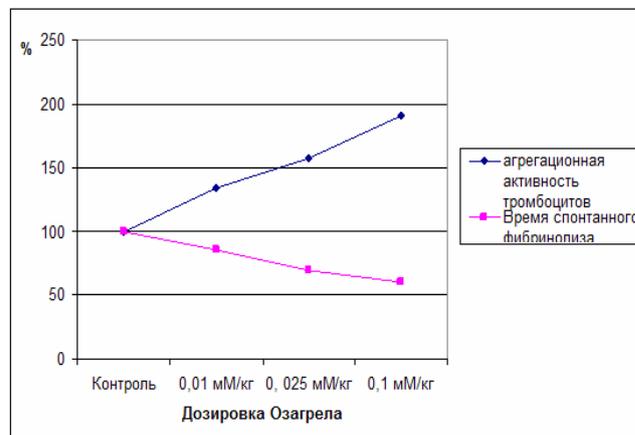


Рис. 1. Влияние Озагрела на агрегационную активность тромбоцитов и время спонтанного фибринолиза

Таблица 1

Показатель	Контроль (Физ р-р)	Доза Озагрела, мМ/кг		
		0,1	0,025	0,01
Средние значения агрегационной активности тромбоцитов, Ом	5,0±0,5	3,0±0,6	3,5±0,6	4,3±0,2
% к контролю		60	70	86
Различия достоверны с контролем, p <		0,01	0,01	0,01

Влияние Озагрела на фибринолитическую активность крови

Таблица 2

Показатель	Контроль (физ. р-р)	Доза Озагрела, мМ/кг		
		0,1	0,025	0,01
Средние значения агрегационной активности тромбоцитов, Ом	129,4±12,1	247,0±44,0	203,1±31,3	173,8±36,4
% к контролю		191	157	134
Различия достоверны с контролем, p <		0,01	0,01	0,05

Через 1 час после введения Озагрела при всех исследованных дозировках наблюдалось достоверное дозозависимое снижение интенсивности агрегации тромбоцитов (табл. 1, рис. 1).

*Влияния Озагрела на время спонтанного фибринолиза*

В контроле показатели фибринолитической активности крови (время спонтанного фибринолиза — 129,4±12,1 минуты) не отличались от наших предыдущих результатов, полученных на здоровых животных. Согласно данным литературы, время спонтанного эуглобинового фибринолиза у интактных крыс в осенне-зимний период составляет от 60,8±11,2 минуты до 229±17 минуты [1, 5].

Через 1 час после введения Озагрела при всех исследованных дозировках наблюдалось достоверное дозозависимое увеличение времени спонтанного фибринолиза (табл. 2, рис. 1)

Снижение фибринолитической активности плазмы после введения Озагрела может быть связано с повышением активности РАИ [12].

*Влияния Озагрела на течение экспериментального фототромбоза*

Исходные показатели линейной скорости кровотока в бедренной артерии Vas=7,79±2,87 мл/мин соответствовали результатам, полученным ранее на здоровых крысах линии Вистар [6].

Во время лазерного облучения бедренной артерии (на фоне введения фотосенсибилизатора) кровотока уже на 10-й минуте снижался более чем в 2 раза (до 38,39±14,03 % от исходного уровня, p<0,01), что

свидетельствует о начале тромбоза и развивающейся обструкции артерии, а к 20-й минуте полностью прекращался в связи с полной обструкцией сосуда.

При введении Озагрела за 1 час до начала лазерного облучения наблюдалось дозозависимое подавление тромбообразования. Так, при введении Озагрела в дозе 0,01 мМ/кг у всех животных кровотока в бедренной артерии, как и в контроле, резко снижался на 10-й минуте и полностью прекращался к 20-й минуте облучения.

При увеличении дозы препарата до 0,025 мМ/кг тромбоз отмечен лишь в 40 % случаев. До 20-й минуты облучения кровотока в бедренной артерии замедлялся у всех животных, но затем к 30–40-й минуте у большей части животных восстанавливался и даже достигал исходных показателей.

При максимальной дозировке Озагрела — 0,1 мМ/кг не только не было ни одного случая тромбоза, но и у всех животных уже с 10-й минуты облучения и до конца наблюдения наблюдалось выраженное увеличение скорости кровотока в бедренной артерии. Так, на последней, 40-й минуте облучения скорость кровотока в среднем превышала исходную более чем в 1,5 раза (178,76±33,87 %, p<0,01).

Полученные данные свидетельствуют о том, что антитромботический эффект Озагрела при экспериментальном фототромбозе связан с ингибированием тромбообразования, а не с тромболизом.

В механизме фототромбоза основное значение имеет повреждение эндотелия активными формами кислорода, образующимися при световом возбуж-

дении фотосенсибилизатора. Прямых указаний на влияние Озагрела на образование АФК и активность антиоксидантных систем нет, но вместе с тем известно, что при воздействии  $H_2O_2$  на фоне снижения образования ТХА<sub>2</sub> увеличивается образование простаглицина (ПЦ) [9]. Можно допустить, что при локальном фотохимическом повреждении эндотелия за счет повышения образования АФК стимулируется циклооксигеназная активность и повышается продукция  $PGH_2$  [9], который преимущественно превращается в ПЦ, поскольку Озагрел блокирует образование ТХА<sub>2</sub>.

Препятствием для адгезии тромбоцитов к эндотелиальной стенке могло стать и повышение скорости кровотока, связанное с увеличением после введения Озагрела сердечного выброса [19, 21] и подавлением вазоконстрикторных реакций [14, 23] при повреждении сосудистой стенки. Блокирование ТхА<sub>2</sub>-синтазы приводит к увеличению спонтанной продукции NO в эндотелиальных клетках [7, 15, 22], и к увеличению антитромботических свойств сосудистой стенки.

Таким образом, Озагрел можно рассматривать как перспективный препарат для профилактики тромбоза и ретромбоза артерий при стентировании и ангиопластике.

## Литература

1. Вышков, Е. В. Оптимизация противотромботической терапии острого инфаркта миокарда : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е. В. Вышков. — Томск, 2009. — 46 с.
2. Грицюк, А. И. Фибринолитическая система крови человека и методы ее лабораторного исследования / А. И. Грицюк. — Киев, 1969. — 136 с.
3. Дементьева, И. Н. Влияние светодиодного облучения на агрегацию тромбоцитов : автореф. дис. ... канд. биол. наук / И. Н. Дементьева. — СПб., 2004. — 22 с.
4. Иванов, В. И. Исследование функциональной активности тромбоцитов в цельной крови / В. И. Иванов // Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний / под ред. Н. Н. Петрищева, Л. П. Папаян. — СПб., 1999. — С. 53–58.
5. Киселева, О. М. Влияние ишемического повреждения головного мозга на некоторые показатели гомеостаза в условиях дислипидемии (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук / О. М. Киселева. — Саранск, 2010. — 24 с.
6. Петрищев, Н. Н. Модель экспериментального фототромбоза бедренной артерии крысы / Н. Н. Петрищев [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2009. — Т. 8. — № 1. — С. 42–45.
7. Bishop-Bailey, D. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture / D. Bishop-Bailey [et al] // Br. J. Pharmacol. — 1997. — Vol. 121. — № 1. — P. 125–133.
8. Boselli, C. Selective impairment of noradrenergic transmission in the bisected rat vas deferens following photochemically-induced cerebral ischaemia / C. Boselli // Int. J. Androl. — 2007. — Vol. 30. — № 3. — P. 129–136.
9. Cseko, C. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways / C. Cseko // J. Appl. Physiol. — 2004. — Vol. 97. — № 3. — P. 1130–1137.
10. Hayashi, M. A prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for airway allergic inflammation in mice / M. Hayashi // Clin. Exp. Allergy. — 2010. — Vol. 40. — № 2. — P. 317–326.
11. Ishitsuka, Y. A selective thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) synthase inhibitor, ozagrel, attenuates lung injury and decreases monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 mRNA expression in oleic acid-induced lung injury in guinea pigs / Y. Ishitsuka [et al] // J. Pharmacol. Sci. — 2009. — Vol. 111. — № 2. — P. 211–215.
12. Kosugi, T. Changes in parameters of the coagulation-fibrinolysis system and platelet function after OKY-046 administration to patients with ruptured aneurysm of the cerebral artery / T. Kosugi [et al] // Int. J. Tissue React. — 1991. — Vol. 13. — № 1. — P. 51–57.
13. Kowalski, E. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis / E. Kowalski [et al] // J. Clin. Pathol. — 1959. — Vol. 12. — № 3. — P. 215–218.
14. Miike, T. NK1 receptor-mediated endothelium-dependent relaxation and contraction with different sensitivity to post-receptor signaling in pulmonary arteries / T. Miike [et al] // Vascul. Pharmacol. — 2009. — Vol. 51. — № 2–3. — P. 147–153.
15. Miyamoto, A. Ibuprofen or ozagrel increases NO release and l-nitro arginine induces TXA<sub>2</sub> release from cultured porcine basilar arterial endothelial cells / A. Miyamoto [et al] // Vascul. Pharmacol. — 2007. — Vol. 46. — № 2. — P. 85–90.
16. Naito, J. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on aggregation of rabbit platelets / J. Naito [et al] // Eur. J. Pharmacol. — 1983. — Vol. 91. — № 1. — P. 41–48.
17. Shinohara, Y. Edaravone (radical scavenger) versus sodium ozagrel (antiplatelet agent) in acute noncardioembolic ischemic stroke (EDO trial) / Y. Shinohara [et al] // Cerebrovasc. Dis. — 2009. — Vol. 27. — № 5. — P. 485–492.
18. Terashita, Z. Effects of thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitors (CV-4151 and ozagrel), aspirin, and ticlopidine on the thrombosis caused by endothelial cell injury / Z. Terashita // Thromb. Res. — 1995. — Vol. 77. — № 5. — P. 411–421.
19. Torii, T. Effects of a new thromboxane A<sub>2</sub>-antagonist (ONO-3708) and a new leukotriene-antagonist (ONO-1078) on thromboxane A<sub>2</sub> analogue-, leukotriene C<sub>4</sub>-, and D<sub>4</sub>-induced regional myocardial blood flow reduction / T. Torii // Heart Vessels. — 1988. — Vol. 4. — № 2. — P. 104–111.
20. Uchida, Y. Role of prostaglandin I<sub>2</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> in recurring reduction of carotid and cerebral blood flow

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

in dogs / Y. Uchida, S. Murao // *Stroke*. — 1981. — Vol. 12. — № 6. — P. 786–792.

21. Uchida, Y. *Effects of thromboxane synthetase inhibitors on cyclical reduction of coronary blood flow in dogs* / Y. Uchida, S. Murao // *Jpn Heart J*. — 1981. — Vol. 22. — № 6. — P. 971–975.

22. Wang, G. R. *Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide : in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase* / G. R. Wang [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — № 9. — P. 4888–4893.

23. Wright, W. S. *Ozagrel attenuates early streptozotocin-induced constriction of arterioles in the mouse retina* / W. S. Wright, N. R. Harris // *Exp. Eye Res*. — 2008. — Vol. 86. — № 3. — P. 528–536.

24. Yao, H. X. *The study of relationship between platelet function and thrombus in patients with essential thrombocythaemia* / H. X. Yao [et al] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. — 2010. — Vol. 90. — № 4. — P. 253–255.

25. Yao, H. X. *Effects of sodium ozagrel in primary thrombocytosis combined with thrombosis* / H. X. Yao [et al] // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. — 2009. — Vol. 17. — № 5. — P. 1360–1362.