

## СОСТОЯНИЕ ТРОМБОЦИТАРНО-КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МЕТАБОЛИТОВ ПРОИЗВОДНОГО ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

Палагина И. А., Кудря М. Я.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков  
admin@iper.com.ua

Исследованиями в области сахарного диабета (СД) установлено, что он приводит к тромбозам различного поражения кровеносных сосудов различных органов и структур (сердца, почек, мозга, сетчатки глаза и др.), сочетающимся с нарушениями микроциркуляции, гемореологических свойств крови и состояния гемостаза [1]. В частности, экспериментально установлено, что у крыс с аллоксановым диабетом проявляются нарушения в звене тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в виде усиления функциональной активности тромбоцитов и снижения антиагрегационных свойств сосудистой стенки, что способствует развитию микротромбоза. В этих условиях обнаруживается значительный прирост конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков (ПОБ), который может дестабилизировать мембрану тромбоцитов и опосредуется через увеличение образования простагландина  $H_2$  и тромбоксана  $A_2$ . Одновременно у крыс отмечается повышение коагулирующих свойств системы гемостаза и ухудшение реологии крови с повышением ее вязкости. Именно развивающаяся гиперкоагуляция и повреждение системы фибринолиза в сочетании с гиперактивацией тромбоцитов является одним из факторов повреждения стенки сосудов при СД [2].

Главная роль в патогенезе диабетического коагулопатического синдрома отводится гормонально-метаболическим нарушениям. Известно, в частности, что гиперкатехола-

минемия сопровождается стимуляцией агрегации тромбоцитов, синтеза тромбина, фибриногена и других коагулогенных метаболитов. Влияют на агрегационную способность тромбоцитов и эритроцитов также гипергликемия и диспротеинемия. Гиперлипидемия и дислипидопропротеинемия ухудшают реологические свойства крови, что приводит к замедлению кровотока и усилению агрегации тромбоцитов и эритроцитов. Важными механизмами стимуляции системы гемостаза являются активация процессов ПОЛ и ПОБ, а также повышение провоспалительного статуса, в частности, гиперпродукция цитокинов: фактора некроза опухолей (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8) [3, 4].

Однако, несмотря на многочисленные экспериментальные и клинические наблюдения об изменениях отдельных показателей тромбоцитарно-сосудистого и коагуляционного гемостаза, механизмы, ответственные за нарушения в этой системе на ранних стадиях и в динамике СД, остаются во многом неясными и активно изучаются в настоящее время.

Учитывая высокую значимость факторов свертывания крови в прогрессировании атеротромбоза, развитии сердечно-сосудистых осложнений и опосредованную — в нарушениях функций почек при СД, важное место в условиях фармакологической компенсации данной патологии занимает мониторинг гемостазиологических параметров по антитромботическому эффекту

и контроль системы гемостаза. Исследования гемостаза проводятся и с целью оценки безопасности применения новых антидиабетических средств, а также выявления их возможной сопутствующей антикоагулянтной активности.

Оригинальное антидиабетическое средство фенсукцинал ( $\beta$ -фенилэтиламин 2-оксисукцинаниловой кислоты), который способен стимулировать регенерацию, секреторную функцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и снижать инсулинорезистентность, обладает выраженными антиоксидантными свойствами и проявляет признаки антикоагулянтного действия. Наряду с этим, фенсукцинал характеризуется низкой токсичностью [5, 6]. В I фазе биотрансформации данного антидиабетического средства при реакциях гидролиза могут образовываться

его потенциально активные метаболиты: 2-гидроксифенилсукцинамид (2-ГФСА) и  $\beta$ -фенилэтилсукцинамид ( $\beta$ -ФЭСА). Для оценки биологической активности и безопасности этих метаболитов определен интерес представляют исследования их влияния на состояние гемостаза, что позволит оценить их возможный вклад в проявления антикоагулянтного действия самого лекарственного средства.

Целью работы было выяснение характера изменений тромбоцитарно-коагуляционного гемостаза у крыс под влиянием потенциальных метаболитов антидиабетического средства производного сукцината — 2-гидроксифенилсукцинамида и  $\beta$ -фенилэтилсукцинамида, а также оценка вклада этих соединений в эффекты лекарственного средства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования гемостаза проведены на 50 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах массой 180–280 г, которые были разделены на подопытные и контрольные группы.

Животные подопытных групп получали исследуемые вещества в виде суспензии на Твин-80 перорально натощак в течение 30 дней. Дозы 2-ГФСА и  $\beta$ -ФЭСА составили 17 и 18 мг/кг массы тела, которые являлись эквивалентными эффективной дозе фенсукцинала, что соответствует 25 мг/кг массы тела. Контрольным животным вводили Твин-80 в идентичных количествах.

На протяжении эксперимента все животные содержались на стандартном рационе в условиях вивария. Манипуляции, связанные с взятием крови из хвостовой вены у крыс, проведены с соблюдением общепринятых этических принципов экспериментов на животных.

О состоянии тромбоцитарного звена гемостаза судили по времени и степени агрегации тромбоцитов (АТ). Исследования проводили на стекле при добавлении к плазме универсального индуктора агрегации согласно инструкции к набору фирмы «Технология-стандарт» (Россия) [7]. При изучении процесса коагуляции общеприняты-

ми в гемостазиологии методами определяли активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), время рекальцификации (ВР), частичное тромбопластиновое время (ЧТВ), протромбиновое время (ПВ) с расчетом протромбинового отношения (ПО) и международного нормализованного отношения (МНО), тромбиновое время (ТВ). Время рекальцификации определяли мануально унифицированным методом [8], все другие показатели — на коагулометре Coag Chrom 3003 (Польша) наборами фирмы «Технология-стандарт» (Россия). Индексы АПТВ и ТВ рассчитывали в процентах относительно их значений в нормальной плазме крови.

Для обработки данных использовали пакет программ Biostat 6.0. Нормальность распределения в рядах определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W). Для парного сравнения показателей использовали t-критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде среднего арифметического и его статистической ошибки ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ ). Расхождения между группами сравнения считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  и близкими к статистически значимым при  $0,05 < p < 0,1$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспресс-оценка тромбоцитарного звена гемостаза показала, что из двух метаболитов фенсукцинала только  $\beta$ -ФЭСА при изолированном субхроническом введении (18 мг/кг м.т.) оказывал влияние на функциональную активность кровяных пластинок, вызывая сокращение времени АТ (ВАТ) и повышение степени АТ в плазме крови крыс (табл. 1). Вместе с тем, изменения данных показателей не выходили за пределы физиологической нормы [9].

Следовательно, ни  $\beta$ -ФЭСА, который способен ускорять АТ при изолированном поступлении в организм, ни тем более 2-ГФСА (17 мг/кг м.т.), инертный по отношению к функции тромбоцитов (табл. 2), при их возможном образовании в процессе биотрансформации антидиабетического средства, производного янтарной кислоты, по-видимому, не могут влиять на его антиагрегационные свойства в отношении тромбоцитов плазмы крови.

При анализе коагулограмм у крыс, получавших как  $\beta$ -ФЭСА, так и 2-ГФСА от-

мечены однонаправленные сдвиги ряда гемостазиологических показателей (табл. 1 и табл. 2). Так, при изолированном введении метаболитов зарегистрирована тенденция к сокращению АПТВ ( $0,05 < p < 0,1$ ), сочетающаяся в случае воздействия 2-ГФСА с уменьшением ЧТВ ( $p < 0,05$ ) и ВР ( $0,05 < p < 0,1$ ). Изменения показателей происходили в пределах физиологической нормы, но при этом статистически выражались (кроме ЧТВ) тенденцией к статистически значимому отклонению.

Известно, что сокращение АПТВ характеризует ускоренное образование активного комплекса протромбиназы (фактор Va + фактор Ха + Ca<sup>2+</sup>) по внутреннему механизму коагуляции, в котором основная роль принадлежит мембранному фосфолипиду тромбоцитов (тромбоцитарный фактор 3 — ТФ<sub>3</sub>), служащему катализатором протромбинформирования. Этот механизм запускается внутри поврежденных кровеносных сосудов, где на фосфолипидах мембран форменных элементов (преимуще-

Т а б л и ц а 1

**Показатели состояния тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза у крыс при субхроническом пероральном введении  $\beta$ -фенилэтилсукцинамида**

Показатель	Контроль (n = 8)	$\beta$ -ФЭСА, 18 мг/кг (n = 8)
Время АТ, с	21,0 ± 0,7	14,0 ± 1,1*
Степень АТ, %	76,4 ± 4,4	117,6 ± 6,8*
АПТВ, с	32,8 ± 2,3	27,2 ± 1,5**
АПТВ <sub>индекс</sub> , %	110,1 ± 7,3	131,4 ± 6,7**
ЧТВ, с	84,3 ± 5,1	74,5 ± 5,1
ВР, с	58,0 ± 4,0	51,2 ± 2,3
ПВ, с	24,8 ± 0,8	17,8 ± 1,1*
ПО	1,52 ± 0,05	1,09 ± 0,07*
МНО	1,66 ± 0,06	1,11 ± 0,08*
ТВ, с	29,4 ± 2,1	24,2 ± 1,7**
ТИ, %	81,2 ± 6,5	97,2 ± 6,5**

Примечание. \* — статистически значимые различия с контролем ( $p < 0,05$ );

\*\* — отклонение стремится к значимому по отношению к контролю ( $0,05 < p < 0,1$ );

АТ — агрегация тромбоцитов; АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время; ВР — время рекальцификации; МНО — международное нормализованное отношение; ПВ — протромбиновое время; ТВ — тромбиновое время; ТИ — тромбиновый индекс.

ственно тромбоцитов) активується плазменний фактор XII [10]. Плазменні фактори VIII, IX, XI, XII і прекаліккреїн учащують тільки во внутрішньому механізмі зсвертывання крові, а потому АПТВ вельма чутливо до змін їх активності, но не залежить від дефіциту тромбоцитів или їх функціональної спроможності [11].

Обнаруженні нами зміни в коагулограмах підопитних крис указують також на стимулююче дієвство метаболітів фенсукцинала на реакції зовнішнього (внесудистого) механізму коагуляційного гемостаза.

При ізолюванні введенні метаболітів обнаружено скорочення ПВ, зменшення ПО і МНО в плазмі крові підопитних крис порівняльно з контролем (см. табл. 1 і табл. 2). Зниження цих показателів не виходило за межі коливань фізіологічної норми, но було більш вираженим при дієвстві  $\beta$ -ФЭСА ( $p < 0,05$ ) порівняльно з 2-ГФСА ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Оба активированих механізму формировації протромбінази зв'язані з висвобожденієм тромбопластина (фактор III) із субендотеліа пошкоджених тканин в плазмі. Цей фактор разом з фактором VII в присутстві  $Ca^{2+}$  активує фактор X,

входящий в состав активной протромбиназы, под влиянием которой протромбин преобразуется в тромбин [11]. Обнаруженные нами изменения, вызванные воздействием обоих метаболитов, в целом отражают активацию факторов протромбинового комплекса (II — протромбин, V, VII, X). Из этих факторов только фактор VII участвует во внесудистом механизме зсвертывання крові, а потому зміни іменно його активності могло впливати на довготність ПВ. Вместе с тем, одночасне скорочення АПТВ і ПВ, виявлене при введенні обох метаболітів, може бути обумовлено підвищенням активності факторів X, V, II, на котрих замикаються оба механізму гемоконгуляції [12].

Стимулююче дієвство  $\beta$ -ФЭСА на утворення активної протромбінази і превращення протромбіна в тромбін, очевидно, відражалось на прискоренні ТВ і підвищенні ТИ ( $0,05 < p < 0,1$ ), що, однак, происходило в межах фізіологічної норми (табл.1). Зсуви такої напрямленості свідечують про підвищення активності процесу фібріноутворення, то єтьє кінцевого етапу зсвертывання крові, що може бути зв'язано також з збільшенням вмісту фібріногена в плазмі крові. Установ-

Т а б л и ц а 2  
Показатели состояния тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза у крис при субхроническом пероральном введении 2-гидроксифенилсукцинамида

Показатель	n	Контроль	n	2-ГФСА, 17 мг/кг
Время АТ, с	10	20,6 ± 0,7	7	21,0 ± 1,3
Степень АТ, %	10	78,7 ± 3,9	7	76,4 ± 7,7
АПТВ, с	9	36,3 ± 2,4	7	30,9 ± 1,4**
АПТВ <sub>индекс</sub> , %	9	99,8 ± 6,7	7	115,1 ± 6,4
ЧТВ, с	10	84,9 ± 4,3	7	67,4 ± 2,0*
ВР, с	8	56,6 ± 2,3	7	49,8 ± 2,4**
ПВ, с	8	25,5 ± 0,7	7	23,1 ± 1,1**
ПО	8	1,56 ± 0,04	7	1,42 ± 0,07**
МНО	8	1,70 ± 0,06	7	1,52 ± 0,09**
ТВ, с	10	25,7 ± 2,2	7	34,0 ± 1,6*
ТИ, %	10	95,4 ± 8,0	7	68,6 ± 3,3*

Примечание. Как в табл. 1.

лено, що 2-ГФСА, в отличие от  $\beta$ -ФЭСА, способен снижать скорость фибринообразования, что характеризовалось пролонгированным ТВ и уменьшением ТИ ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). Такого рода изменения можно трактовать как проявления антикоагулянтного действия соединения в фазе III. В данном случае основным фактором, обуславливающим сокращение ТВ, очевидно, являлась гипо- или дисфибриногенемия, а также возможное накопление в кровотоке продуктов деградации фибриногена/фибрина, обладающих антитромбиновой активностью

Ранее, при введении антидиабетическо-

го средства в эффективной дозе, мы отмечали торможение образования протромбиназы по внутреннему механизму гемокоагуляции. Учитывая, что 2-ГФСА и  $\beta$ -ФЭСА при изолированном поступлении вызывают изменения показателей, характеризующих повышение активности внешнего механизма свертывания крови, можно предположить, что и само лекарственное средство сможет вызвать подобные изменения, реализуемые за счет аддитивного действия двух его метаболитов, что, однако, не повлияет на его способность к снижению коагуляционного потенциала крови.

## ВЫВОДЫ

1. Метаболит фенсукцинала — 2-гидроксибензилсукцинамид при субхроническом введении в дозе 17 мг/кг массы тела не оказывает влияния на агрегационную способность тромбоцитов, но способен заметно тормозить реакции фазы фибринообразования, что является проявлением антикоагулянтной активности данного соединения.
2. Субхроническое введение другого метаболита фенсукцинала —  $\beta$ -фенилэтилсукцинамида в дозе 18 мг/кг приводит к повышению активности тромбоцитарного звена гемостаза в виде усиления агрегации тромбоцитов,

а также росту общего коагуляционного потенциала крови за счет интенсификации реакций всех трех фаз коагуляционного каскада, однако при этом изменения укладываются в пределы физиологической нормы для крыс.

3. Оба метаболита оказывают влияние на активность внесосудистого механизма свертывания крови, что в какой-то мере может отразиться на проявлении гемостазиологических эффектов антидиабетического средства производного сукцината, имеющего признаки антикоагулянтной активности.

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Dedov II, Shestakova MV. Saharnyj diabet, *Moskva*, 2005:209-222.
2. Dzugkoeva FS, Dzugkoev SG, Hetagurova LG. *Fundamental'nye issledovaniya* 2008; 8:105-106.
3. Balabolkin MI. *Kardiologija* 2000; 10:74-87.
4. Arikawa E, Cheung C, Sekirov T, et al. *J Physiol Pharmacol* 2006; 84(8-9):823-833.
5. Gorbenko NI. Patogenetychne obg'runtuvannja efektyvnosti pohidnogo jantarnoi' kysloty — fensukcynalu v terapii' cukrovogo diabetu ta jogo sudynnyh uskladnen' (eksperymental'ne doslidzhennja), *Harkiv*, 2004:36 p.
6. Palagina IA, Kudria MY, Ustenko NV. *Toxicology Letters* 2008; 180(1):S241.
7. Instrukcija po primeneniju nabora dlja jekspresocenki trom-bocitarnogo gemostaza (agreskrin-test), 2010:4 p.
8. Men'shikov VV. Laboratornye metody issledovaniya v klinike: spravochnik, *Moskva*, 1987:155-157.
9. Trahtenberg IM, Sova RE, Sheftel' VO, Onikienko FA. Problema normy v toksikologii (sovremennye predstavlenija i metodicheskie podhody, osnovnye parametry i konstanty), *Moskva*, 1998:204 p.
10. Zubairov DM. Molekuljarnye osnovy svertyvaniya krovi i tromboobrazovaniya, *Kazan'*, 2000:364 p.
11. Tret'jakova OS. *Zdorov'e Ukrainy* 2010; 3:51-61.
12. Romanovskaja VN, Starosel'skaja AN, Zhavoronkov LP. *Bjul Jekspirim Biologii i Medicyny* 2012; 153(3):286-289.
13. Shiffman F. Patofiziologija krovi, *Moskva*, 2000:520 p.

## СТАН ТРОМБОЦИТАРНО-КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ У ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ МЕТАБОЛІТІВ ПОХІДНОГО БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ

Палагіна І. А., Кудря М. Я.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків  
admin@ipep.com.ua

Встановлено, що метаболіти першої фази біотрансформації антидіабетичного засобу — похідного бурштинової кислоти діють на різні ланки тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу. 2-гідроксифенілсукцинамід (2-ГФСА) за умов субхронічного введення викликає гальмування процесу утворення фібрину, що може бути ознакою антикоагулянтної активності сполуки. Інший метаболіт —  $\beta$ -фенілетилсукцинамід ( $\beta$ -ФЭСА) здатний посилювати агрегацію тромбоцитів та підвищувати коагуляційний потенціал крові. Обидва метаболіти чинять дію на позасудинний механізм згортання крові. Виявлені прояви активності 2-ГФСА і  $\beta$ -ФЭСА можуть визначати гемостазіологічні ефекти лікарського засобу, який має антикоагулянтні властивості.

К л ю ч о в і с л о в а : гемостаз, агрегація тромбоцитів, коагуляція, метаболіти антидіабетичного засобу.

## СОСТОЯНИЕ ТРОМБОЦИТАРНО-КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МЕТАБОЛИТОВ ПРОЗВОДНОГО ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

Палагіна І. А., Кудря М. Я.

ГУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,  
г. Харків  
admin@ipep.com.ua

Установлено, что метаболиты первой фазы биотрансформации антидиабетического средства — производного янтарной кислоты действуют на различные звенья тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза. 2-гидроксибензилсукцинамид (2-ГФСА) при субхроническом введении вызывает торможение процесса фибринообразования, что может служить признаком антикоагулянтной активности соединения. Другой метаболит —  $\beta$ -фенилэтилсукцинамид ( $\beta$ -ФЭСА) способен усиливать агрегацию тромбоцитов и повышать коагуляционный потенциал крови. Оба метаболита оказывают влияние на внесосудистый механизм свертывания крови. Обнаруженные проявления активности 2-ГФСА и  $\beta$ -ФЭСА могут предопределять гемостазиологические эффекты лекарственного средства, обладающего антикоагулянтными свойствами.

К л ю ч е в ы е с л о в а : гемостаз, агрегация тромбоцитов, коагуляция, метаболиты антидиабетического средства.

## STATE OF THROMBOCYTE-COAGULATION HEMOSTASIS IN RATS UNDER INFLUENCE OF METABOLITES OF SUCCINIC ACID DERIVATIVES

I. A. Palagina, M. Ya Kudrya

SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv  
admin@ipep.com.ua

It was found that metabolites of the first phase of biotransformation of anti-diabetic agent — succinic acid derivative act on the various links in thrombocyte and coagulation hemostasis. The 2-hydroxyphenylsuccinamide (2-HPSA) under subchronic administration causes the inhibition of the fibrin forming that may be a sign of anticoagulant activity of the compound. Another metabolite —  $\beta$ -phenylethylsuccinamide ( $\beta$ -PESA) is able to enhance aggregation of thrombocytes and increase the potential for blood coagulation. Both metabolites influence the out-vascular blood clotting mechanism. Detected activity manifestations 2-HPSA and  $\beta$ -PESA hemostatic effects may define the hemostatical effects of the drug with the anti-coagulation properties.

К e y w o r d s : hemostasis, aggregation of thrombocytes, coagulation, anti-diabetic medicine metabolites.