

КУЗНЕЦОВА ВАЛЕНТИНА АНДРЕЕВНА

**ПОИСК ВЕЩЕСТВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА КРОВИ, СРЕДИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТИЛ-
КСАНТИНА И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИХ ДЕЙСТВИЯ.**

14.03.06. – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград – 2010

Работа выполнена в Государственном общеобразовательном учреждении высшего профессионального образования Волгоградском государственном медицинском университете Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Член-корреспондент РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор А.А. Спасов

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

1. Доктор биологических наук, профессор Г.П. Дудченко
2. Доктор медицинских наук, профессор Ю.С. Макляков

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

НИИ Фармакологии РАМН им. В.В. Закусова.

Защита состоится «__» _____ 2010 года в __ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет (400131, Волгоград, пл. Павших борцов,1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Волгоградского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан «__» _____ 2010 года.

Ученый секретарь Диссертационного Совета
Доктор медицинских наук, профессор

А.Р. Бабаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Повышенная вязкость крови является независимым фактором риска этиологии самых разнообразных заболеваний [Катюхин Л.Н., 2001; Муравьев А.В. и др., 2003; Плотников М.Б., 2004; Петрищев Н.Н., 2004]. Синдром гипервязкости крови наблюдается при ишемической болезни сердца [Алиев О.Б., 2004; Мамонтова Н.В., Киричук В.Ф., 2007; Steinvil A. et al., 2010], артериальной гипертензии [Белоусов Ю.Б. и др., 2001; Шабанов В.А. и др., 2001; Медведев И.Н. и др., 2003], нарушении мозгового кровообращения [Мирзоян Р.С. и др., 2000; Вознюк И.А. и др., 2003], сахарном диабете [Колосова М.В. и др., 2001; Балаболкин М.И. и др., 2005; Максимов Г.В. и др., 2005; Шилов А.М. и др., 2008; Young I. Cho et al., 2008], аутоиммунных состояниях, воспалительных заболеваниях [Фирсов Н.Н. и др., 2003].

Несмотря на то, что за последнее время достигнут значительный прогресс в изучении механизмов гемореологических нарушений арсенал средств фармакологической коррекции незначителен [Плотников М.Б. и др., 1996]. К наиболее эффективным препаратам относятся: пентоксифиллин, клопидогрел, тиклопидин, антагонисты кальция, аспирин, гиполипидемические средства. Однако, недостаточная эффективность и наличие нежелательных эффектов (диспепсические явления, кишечные кровотечения, кожные геморрагии, лейкопения, тромбоцитопения, агранулоцитоз) ограничивают их применение [Петров В.И., 1996; Зборовский А.Б., Тюренков И.Н., 2003].

В проведенных на базе Волгоградского государственного медицинского университета исследованиях было установлено наличие гемореологической активности среди производных ксантина, синтезированных на кафедре фармацевтической химии Башкирского государственного медицинского университета [Науменко Л.В., 2005], что делает данный класс веществ перспективным для поиска среди них новых корректоров гемореологических нарушений. Тема является составной частью научного плана НИР Волгоградского Государственного медицинского университета и утверждена на заседании Специализированного Совета (протокол №7 от 19.03.2008г.).

Целью исследования является изучение действия новых производных ксантина на реологические показатели крови для определения стратегии направленного поиска веществ, выбор наиболее активного соединения и доклиническое изучение его специфической активности.

Для достижения указанной цели представляется необходимым решение следующих задач:

1. Поиск гемореологически активных веществ среди новых производных ксантина с использованием модели экспериментального «синдрома повышенной вязкости» крови *in vitro*.
2. Проведение анализа связи между структурой, физико-химическими свойствами молекул и гемореологической активностью исследуемых соединений.
3. Определение острой токсичности наиболее активных соединений, расчет их терапевтического индекса и выбор наиболее эффективного вещества для доклинического изучения его специфической активности.

4. Исследование влияния соединения, проявляющего наибольшую активность, и препарата сравнения на вязкость крови здоровых доноров и больных с синдромом «повышенной вязкости крови» *in vitro*.
5. Изучение гемореологической активности наиболее активного вещества и препарата сравнения на экспериментальных моделях «синдрома повышенной вязкости крови» (стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет, панкреатэктомированные собаки, адьювантный артрит).
6. Оценка действия наиболее активного вещества и препарата сравнения на параметры микроциркуляции и выживаемость ткани в условиях редуцированного кровообращения.
7. Определение влияния наиболее активного соединения и препарата сравнения на основные гемореологические свойства эритроцитов (влияние на агрегацию и деформируемость красных клеток крови).
8. Изучение действия вещества СУМ-55 на агрегацию эритроцитов в условиях измененного кальциевого гомеостаза.
9. Оценка общепармакологических свойств соединения СУМ-55.

Научная новизна. Впервые получены данные о влиянии на реологию крови синтезированных 7,8 замещенных производных ксантина. Наиболее активными, среди исследованных веществ, оказались N⁷-гидроксипропилзамещенные производные 1,3-диметилксантина.

В ходе работы впервые получены данные о влиянии соединения СУМ-55 на вязкость образцов крови здоровых доноров и больных с «синдромом повышенной вязкости крови», а также на гемореологические показатели животных с экспериментальной патологией. Изучено влияние данного вещества на вязкость крови, агрегацию, деформируемость и заряд мембраны эритроцитов, осмотическую и кислотную устойчивость красных клеток крови, коагулографические параметры. Продемонстрирована мембранотропная активность соединения СУМ-55, которая проявляется в уменьшении микровязкости и увеличении заряда мембраны эритроцитов, что приводит к улучшению деформируемости и снижению агрегации красных клеток крови.

Научно-практическая ценность. Установленные закономерности между структурой, физико-химическими свойствами и гемореологической активностью соединений являются основой для оптимизации поиска и синтеза новых производных ксантина с заданной структурой и уровнем гемореологической активности.

Выраженная гемореологическая активность вещества СУМ-55, превосходящая показатели препарата сравнения определяет перспективность проведения дальнейших фармакологических и токсикологических исследований данного соединения.

Реализация результатов исследования. Выявленные закономерности между структурой, физико-химическими свойствами и гемореологической активностью производных ксантина учитываются при синтезе новых соединений на кафедре фармацевтической химии Башкирского государственного медицинского университета. Результаты работы используются в лекционных курсах на кафедре фармакологии, кафедре фармакологии и биофармации ФУВ, кафедре фармацевтической

химии Волгоградского государственного медицинского университета, на кафедрах фармакологии Ростовского государственного медицинского университета, Саратовского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Среди изученных производных ксантина наиболее гемореологически активными соединениями являются N⁷-гидроксипропил замещенные производные 1,3-диметилксантина.
2. Вещество СУМ-55 обладает выраженной гемореологической активностью, что проявляется в снижении вязкости крови, подавлении процессов агрегации эритроцитов, повышении их осмотической и кислотной резистентности, увеличении деформируемости и заряда мембраны эритроцитов при патологических состояниях, сопровождающихся «синдромом повышенной вязкости» (сахарный диабет, адьювантный артрит).
3. Основу механизма гемореологического действия соединения СУМ-55 составляет увеличение деформируемости и уменьшение агрегации эритроцитов, которые определяются мембранотропными эффектами соединения (увеличение заряда и снижение микровязкости мембраны).

Апробация работы. Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на: 1 международной Пироговской конференции, Москва, 2006; XIII–XIV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2008 – 2009 гг.; 67 открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» – Волгоград, 2009 г.; VII Международной научной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)», Ярославль, 2009 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 3 – в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации

Объем и структура работы. Диссертация изложена на _____ страницах машинописного текста, иллюстрирована 14 рисунками, 38 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы (глава I), материалов и методов исследования (глава II), экспериментальной части (глава III–VIII), обсуждения результатов (глава IX), выводов и списка литературы, включающего ___ отечественных и ___ зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Материалы и методы исследования.

Исследования были выполнены на 20 кроликах (самцы) породы «Шиншилла», весом 4-4,5 кг, образцах крови 5 здоровых доноров и 10 больных с диагнозом, сахарный диабет II типа в период декомпенсации, 230 половозрелых нелинейных белых крысах обоего пола массой 270-320 г и на 48 нелинейных мышах обоего пола массой 18-22 г, 4 собаках-кобелях массой 9-12 кг. Животные содержались в стандартных условиях вивария ВолГМУ на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты проведены с учётом правил лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в Российской Федерации, разработан-

ных в соответствии с Федеральным законом "О лекарственных средствах" N 86-ФЗ от 22.06.1998 (Собрание законодательства Российской Федерации от 29 июня 1998 г., N 26, ст. 3006; от 13 января 2003 г. N 2 ст. 167; от 10 января 2000 г., N 2, ст. 126; от 7 января 2002 г. (Часть I), N 1, ст. 2) и положением о Министерстве здравоохранения Российской Федерации, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 29.04.2002 N 284 (Собрание законодательства Российской Федерации, 6 мая 2002 г., N 18, ст. 1771).

В работе на наличие гемореологической активности исследовали 24 соединения под лабораторным шифром СУМ и С, относящихся к производным ксантина, синтезированных в Башкирском государственном медицинском университете на кафедре фармацевтической химии¹. При проведении экспериментов использовали следующие реактивы: пентоксифиллин («Aventis», Германия); цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия); гепарин («Польфа», Польша); хлорид натрия (х.ч., «Мосреактив», Россия); трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид («Мосреактив», Россия); изотонический раствор натрия хлорида (ЗАО «Рестерс», Россия); нембутал (Россия); стрептозотозин (ICN Biomedicals Inc., USA); наборы для определения глюкозы «Глюкоза-ФКД» (Россия); адьювант Фрейнда (Grand Island Biological Company, USA); ионофор А23187; наборы «Тромбо-тест», «Техпластин-тест», «Тех-Фибриноген-тест», «АПТВ(АЧТВ)-тест» («Технология-стандарт», Россия); флуоресцентные зонды – *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ+) и *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-гексилпиридиния (ДСП-6).

Для поиска соединений, влияющих на гемореологический статус, использовали модель синдрома повышенной вязкости крови *in vitro* (Плотников М.Б. и др., 1996), которая заключается в инкубировании образцов крови при 42,5°C в течение 60 минут. Показателем эффективности веществ являлась концентрация, при которой происходило снижение агрегации эритроцитов на 20% (EC₂₀), рассчитанная методом регрессионного анализа. Острая токсичность исследовалась на мышах при внутрибрюшинном введении, LD₅₀ рассчитывали по Миллеру и Тейтнеру (Беленький М.Я., 1963). В качестве объективного показателя использовали условный терапевтический индекс соединений, являющийся отношением показателя LD₅₀ к EC₂₀. Для выявления QSAR-закономерностей использовали подструктурный анализ и частотный анализ физико-химических параметров соединений². Для этого были рассчитаны липофильные (log P) [Broto P. et al., 1984; Ghose A. K. et al., 1987; Viswanadhan V. N. et al., 1989], стерические (MR) [Иоффе Б. В., 1983; Ghose A. K. et al., 1987; Viswanadhan V. N. et al., 1989] и электронные (заряды на атомах) [Dewar M. J. S. et al., 1985; Минкин В. И. и др., 1997] характеристики изучаемых соединений.

Более углубленно гемореологические свойства соединения СУМ-55 и пентоксифиллина изучались на моделях, сопровождающихся синдромом повышенной вязкости крови, *in vivo* – стрептозотозин-индуцированный (45 мг/кг внутри-

¹ Выражаем благодарность заведующему кафедрой фармацевтической химии Башкирского государственного медицинского университета д.фарм.н, профессору Ф.А. Халиуллину.

² Выражаем искреннюю признательность к.б.н., с.н.с. лаборатории лекарственной безопасности НИИ фармакологии ВолГМУ П.М. Васильеву за помощь в проведении исследования.

венно или внутрибрюшинно) сахарный диабет (Баранов В.Г., 1983); панкреатэктомированные собаки (Галлер Г. и др., 1973); адьювантный артрит (Михайлов В.П. и др., 2003). Крысам с тяжелой формой сахарного диабета (глюкоза >17 ммоль/л) вводили внутривенно раствор соединения СУМ-55 в дозе 6 мг/кг и пентоксифиллина в эквимолярной дозе 4 мг/кг, а контрольной группе – физиологический раствор в аналогичном объеме. Сахарный диабет у собак вызывали удалением поджелудочной железы. Операцию проводили под гексеналовым наркозом (50 мг/кг внутрибрюшинно) в асептических условиях³. Исследование проводили на 7 день после операции, когда концентрация глюкозы в крови собак достигала 23-26 ммоль/л, так как по данным Power C. (1964), инсулин исчезает из крови оперированных животных после удаления поджелудочной железы не сразу и определяется в крови еще в течение 3-4 дней после операции. Исследуемое соединение и препарат сравнения вводили животным внутривенно в эквимолярных дозах – 1,2 мг/кг для соединения СУМ-55 и 0,8 мг/кг для пентоксифиллина. Контрольной группе животных вводился физиологический раствор в аналогичном объеме. Адьювантный артрит вызывали субплантарным введением 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда (Grand Island Biological Company, USA). Проведены две серии исследования, в каждой серии животные были разделены на четыре группы. Первую составили контрольные ложноинъецированные (субплантарно вводили 0,2 мл физиологического раствора). Вторую группу составили контрольные животные с адьювантным артритом. Контрольным группам внутривенно вводился физиологический раствор в аналогичном объеме. Третьей и четвертой группам вводили внутривенно соединение СУМ-55 и пентоксифиллин в эквимолярных дозах 6 мг/кг и 4 мг/кг соответственно. В первой серии изучаемые вещества вводили однократно в фазу хронизации адьювантного артрита (28-е сутки). Во второй серии проводили курсовое введение веществ (двукратное ежедневное внутривенное введение в течение 7 суток). Забор крови у крыс производился из брюшной аорты под легким эфирным наркозом, после введения веществ через 2 часа, а у собак путем венопункции через 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов после введения соединений. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 1:9. Влияние исследуемых соединений на выживаемость кожного лоскута проводили согласно "Методическим рекомендациям по количественной оценке влияния препаратов на жизнеспособность тканей в условиях редуцированного кровообращения" [Любимов Б.И., 1986]. Соединение СУМ-55 вводили внутрибрюшинно два раза в день в течение 3 суток в дозе 6 мг/кг, а препарат сравнения пентоксифиллин в эквимолярной дозе – 4 мг/кг. Контрольной группе вводили физиологический раствор в аналогичном объеме. Формирование некроза происходило в течение 72 часов, после чего лоскут удаляли, определяли длину его выжившей части и по формуле [В.И. Горовой, 1991] проводили расчет антинекротического индекса. Кроме этого, изучали влияние вещества СУМ-55 и препарата сравнения в эквимолярных дозах на скорость кровотока в ткани мозга

³ Оперативное удаление поджелудочной железы проводилось на кафедре оперативной хирургии ВолГМУ, выражаем признательность заведующему кафедрой, профессору А.А. Воробьеву.

здоровых крыс и в каждом лоскуте на питающей ножке (сразу после операции и через 72 часа после нее). Регистрация скорости локального кровотока осуществлялась с помощью ультразвукового доплерографа ММ-Д-К и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.5. (Санкт – Петербург, Россия)⁴. Также провели оценку общепармакологической активности с использованием схемы многотестового наблюдения по С. Ирвину [Irwin S., 1964].

Методы определения гемореологических параметров.

Кажущуюся вязкость крови и вязкость плазмы определяли методом ротационной вискозиметрии со свободно плавающим цилиндром-ротором [Добровольский Н.А., 1989] на анализаторе крови реологическом АКР-2 (Россия) при различных скоростях сдвига. Влияние веществ на агрегацию эритроцитов оценивали по индексу агрегации [Парфенов А.С., 1991]. Величину гематокрита определяли центрифугированием капилляров с образцами крови на Hematocrit Centrifuge GM-70 (Elmi, Латвия) (8000 об/мин, 3 минуты) как отношение протяженности в центрифужном капилляре столбика эритроцитов к столбику плазмы. Индекс эффективности доставки кислорода в ткани рассчитывался как отношение гематокрита исследуемого образца к вязкости крови при высоких скоростях сдвига (300с^{-1}) [Chien S., Lung L., 1987; Stoltz J. et al., 1991]. Деформируемость эритроцитов исследовали методом фильтрации через фильтры Millipore (5 мкм), под отрицательным давлением 80 мм водн.ст., путем вискозиметрии взвеси отмытых эритроцитов [Катюхин Л.Н., 1995] и в проточной микрокамере при фиксированном напряжении сдвига [Муравьев А.В., 2009]. Агрегируемость эритроцитов оценивали методом оптической микроскопии с видеорегистрацией и компьютерной обработкой изображения⁵ [Муравьев А.В. и др., 2003] и фотометрическим методом с помощью полуавтоматического агрегометра типа МА1 (Myrenne, Германия) [Schmid-Schönbein H., 1990]. Изучение микровязкости эритроцитарных мембран проводили на спектрофлуориметре Hitachi MPF-400 (Япония) с использованием зонда ДСП-6. Величину кислотного гемолиза эритроцитов оценивали методом Терского И.А. и Гительсона И.И. (1967). Осмотическую резистентность эритроцитов определяли по концентрации экстрацеллюлярного гемоглобина [Macoto K., 2001]. Заряд мембраны эритроцитов определяли на спектрофлуориметре Hitachi MPF – 400 (Япония) с использованием положительно заряженного зонда ДСМ⁺ [Добрецов В.Г., 1989] и путем измерения электрофоретической подвижности эритроцитов в микрокамере с плоскими хлорсеребряными электродами, созданной на основе камеры Горяева⁶. Фракционирование эритроцитов по возрасту проводили по методу, описанному J. Murphy (1973). Коагуляционный гемостаз оценивали хронометрически, на гемокоагулометре «SOLAR» (Белоруссия) с помощью наборов реактивов производства «Технология – стандарт» (Россия). Таким образом, были определены тромбиновое, протромбиновое, активированное парциальное тромбо-

⁴ Исследования проводили на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолГМУ, выражаем признательность заведующему кафедрой д.м.н., профессору И.Н. Тюренкову.

⁵ Выражаем искреннюю благодарность д.б.н., профессору кафедры медико-биологических основ спорта Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского А.В. Муравьеву за помощь в проведении экспериментов.

⁶ Искренне благодарим за помощь в проведении исследований д.б.н., доцента кафедры анатомии Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского И.А. Тихомирову.

пластиновое, каолиновое время, содержание фибриногена и растворимых фибрин-мономерных комплексов [Баркаган З.С., Момот А.П., 1999]. Изучение тканевой микроциркуляции проводили с использованием ультразвукового доплерографа ММ-Д-К и рабочей компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.5. (Санкт – Петербург, Россия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни и ANOVA (Newman-Keuls test) с использованием табличного редактора Microsoft Excel и пакета прикладных программ «Statistika 6.0» [Гланц С., 1998] с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения.

Результаты экспериментов и их обсуждение.

В результате поиска среди 24 производных ксантина (табл. 1) были выявлены наиболее активные соединения под лабораторными шифрами СУМ-55 и СУМ-57, которые по величине EC_{20} превосходили пентоксифиллин в 8,8 раза и 9,9 раза соответственно. Однако вещество СУМ-55 оказалось менее токсичным, чем соединение СУМ-57 и препарат сравнения и по широте терапевтического действия в 11,9 раза превосходило пентоксифиллин (табл. 2).

Таблица 1.

Влияние производных ксантина в концентрации 100 мкМоль/л на индекс агрегации эритроцитов крови (in vitro) (M±m).

Шифр соединения	Индекс агрегации эритроцитов (Δ%)	Шифр соединения	Индекс агрегации эритроцитов (Δ%)
СУМ 55	-37,49±4,65*	С-84	-6,09±1,8*
СУМ 57	-33,53±4,96*	С-135	-4,73±0,7*
С-39	-12,86±1,2*	С-55	-4,71±5,9
С-64	-11,97±1,5*	С-65	-3,83±0,8
С-42	-11,84±3,3*	С-44	-3,22±1,4*
С-52	-11,63±3,3*	С-37	-2,90±3,7
С-47	-11,50±4,3	СУМ 28	-2,00±2,30
С-54	-11,27±4,5	СУМ 62	-0,98±2,25
С-62	-11,07±2,0*	С-43	0,76±3,79
С-60	-11,00±2,9*	С-132	2,43±11,8
С-48	-9,79±5,7	С-49	2,50±9,6
С-38	-9,61±1,1*	Пентоксифиллин	-16,08±2,23*
С-57	-9,44±3,4		

Примечание: * – данные достоверны по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p < 0,05$). Отрицательные значения свидетельствуют о снижении индекса агрегации эритроцитов, положительные – о повышении индекса агрегации эритроцитов

Таблица 2.

Показатели острой токсичности (LD_{50}), эффективной концентрации (EC_{20}) и условного терапевтического индекса соединений СУМ-55, СУМ-57 и пентоксифиллина.

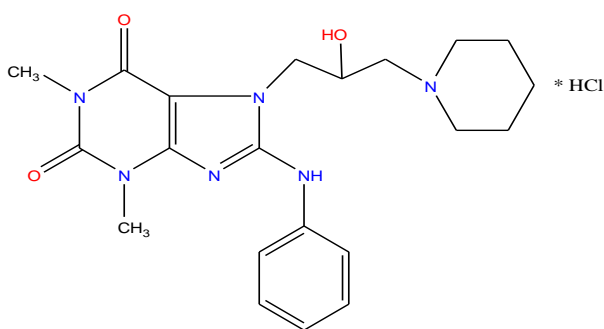
Шифр соединения	LD_{50} (мМоль/кг)	EC_{20} (мМоль/л)	УТИ (y.e.)
СУМ-55	0,512	0,022	22,86
СУМ-57	0,249	0,020	12,46
Пентоксифиллин	0,379	0,197	1,92

Примечание: УТИ – условный терапевтический индекс ($УТИ = LD_{50} / EC_{20}$)

При анализе взаимосвязи между структурой и гемореологической активностью производных ксантина было выявлено, что для проявления данного вида биологической активности имеет значение строение заместителей в N⁷ положении. Наиболее активными, среди исследованных веществ оказались N⁷-гидроксипропилзамещенные производные 1,3-диметилксантина СУМ-55 и СУМ-57.

В результате частотного анализа зависимости гемореологической активности производных ксантина от их физико-химических характеристик была выявлена корреляция высокой гемореологической активности с высокой липофильностью и молекулярной рефракцией, средней величиной полярности. Солевой остаток должен характеризоваться субмаксимальным показателем липофильности, низкой молекулярной рефракцией и полярностью, что соответствует показателям гидрохлоридов.

Таким образом, в результате поиска потенциальных корректоров синдрома повышенной вязкости крови среди изучаемых соединений самым активным оказалось вещество 1,3-диметил-7-(2-гидрокси-3-пиперидинопропил)-8-фениламиноксантина гидрохлорид (СУМ-55, патент РФ №2344137):



На первом этапе исследовали влияние вещества СУМ-55 и пентоксифиллина на вязкость образцов крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом *in vitro*. В результате было показано, что после добавления изучаемых веществ показатели вязкости крови здоровых доноров не имели достоверных отличий от контроля. Вещество СУМ-55, при добавлении к образцам крови больных сахарным диабетом, нормализует вязкость крови во всем диапазоне скоростей сдвига, не уступая по активности препарату сравнения. Это свидетельствует о влиянии соединений, как на процессы агрегации, так и на деформируемость эритроцитов. Следует отметить, что наибольшую активность соединения СУМ-55 и пентоксифиллин демонстрируют в концентрации 100 мкМоль/л (рис. 1). Причем наблюдается четкая зависимость величины гемореологического эффекта от концентрации. Полученные данные подтверждаются снижением индекса агрегации эритроцитов.

При изучении гемореологического статуса у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом (СД), панкреатэктомированных собак (ПЭС) и крыс с адьювантным артритом (АА) был выявлен ряд изменений. Показатель вязкости крови достоверно возрастал во всем диапазоне скоростей сдвига. Повышение вязкости крови при высоких скоростях на 35% (СД), 32% (ПЭС) и на 7% (АА), а при низких скоростях на 58% (СД), в 2 раза (ПЭС) и на 22% (АА) по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$), что по-видимому связано со снижением деформируемости эритроцитов и повышением их агрегируемости. Это подтверждается достоверным увеличением индекса агрегации эритроцитов как у животных с экспериментальным сахарным диабетом, так и с адьювантным артритом.

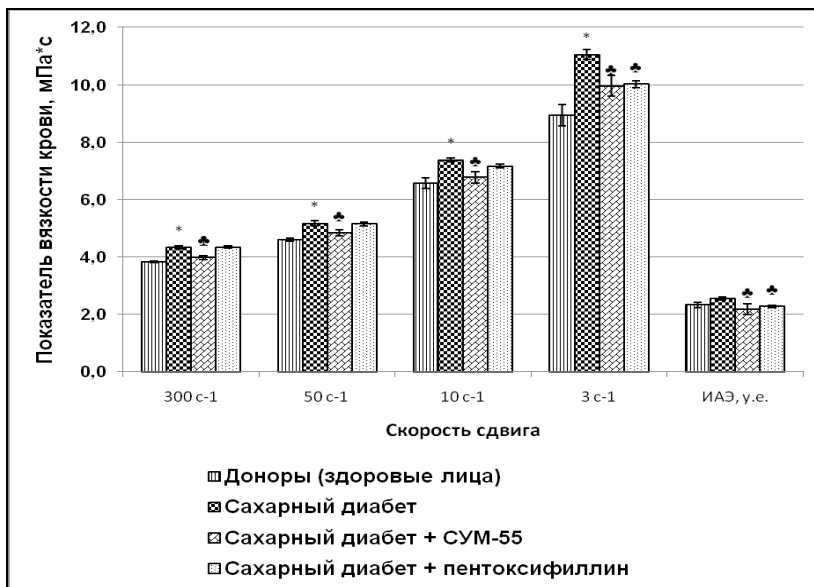


Рис. 1. Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина в концентрации 100 мкМоль/л на вязкость образцов крови больных сахарным диабетом.

*-данные достоверны по отношению к показателям вязкости контрольных образцов крови, парный критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

* -данные достоверны по отношению к показателям вязкости крови больных сахарным диабетом, парный критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

Деформация эритроцитов является существенным фактором, определяющим выживание клеток, эффективность кровотока и оксигенацию тканей, хотя в свою очередь непосредственно зависит от мембранных свойств эритроцитов [Mohandas N. et al., 1983; Manno S. et al., 2005]. В проведенном нами исследовании с использованием вискозимитрических и фильтрационных методов было установлено снижение деформируемости эритроцитов крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом и адьювантным артритом. Так при скоростях сдвига 300 с^{-1} наблюдается достоверное увеличение вязкости взвеси отмытых эритроцитов по отношению к контрольной группе на 6% (СД) и на 35% (АА). При низких скоростях сдвига данный показатель составил 22% (СД) и 38% (АА), что в свою очередь может свидетельствовать о снижении вязкостноэластических свойств мембраны эритроцитов. Также было выявлено достоверное снижение скорости фильтрации эритроцитов на 67% при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и на 39% при адьювантном артрите ($p < 0,05$). Данные изменения могут приводить к уменьшению доставки кислорода в ткани, что и подтверждается достоверным уменьшением индекса доставки кислорода тканям на 11% у животных с адьювантным артритом.

При изучении механических свойств красных клеток крови было показано, что степень осмотического гемолиза увеличивалась в 2 раза, а показатель кислотной устойчивости снижался на 21% у крыс со стрептозотоциновым диабетом, у крыс с адьювантным артритом в 2,4 раза и на 28% соответственно (данные достоверны по отношению к интактному контролю). Известно, что снижение отрицательного заряда эритроцитов свидетельствует об изменении реологических свойств крови, определяя повышение агрегируемости эритроцитов и тромбообразования [Крылов В.Н. и др., 2005; Stolts J.F. et. al., 1991]. Так, у крыс с экспериментальным сахарным диабетом и адьювантным артритом выявлено достоверное снижение заряда мембран эритроцитов на 45% ($p < 0,05$).

Однако на агрегацию эритроцитов влияют не только степень деформируемости и поверхностный заряд мембран эритроцитов, но и концентрация в плазме высокомолекулярных белков, в первую очередь фибриногена, а также некоторых

глобулинов [Мчедлишвили Г.И., 1991; Гуцин А.Г. и др. 2000; Marton Z. et al., 2001; Szapali L. Et. al.,2003]. В ходе экспериментов было выявлено, что формирование экспериментального сахарного диабета и адьювантного артрита приводило к изменению показателей свертывания крови. Так, отмечается достоверное повышение содержания фибриногена в плазме на 72% (СД) и 42% (АА) ($p < 0,05$), что позволяет предположить о возникновении агрегации эритроцитов преимущественно по «мостиковому» типу. Тромбиновое время уменьшалось на 38% (СД) и 17% (АА) (данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс), а величина растворимых фибрин-мономерных комплексов увеличивалась на 89% (СД) и 76% (АА). Все это может свидетельствовать о повышении свертываемости крови у экспериментальных животных.

Исследуемое соединение и препарат сравнения, вводимые внутривенно крысам со стрептозотоциновым сахарным диабетом, приводили к снижению вязкости крови во всем диапазоне скоростей сдвига. Так, при скорости сдвига 300 с^{-1} соединение СУМ-55 достоверно снижало вязкость крови на 13%, а препарат сравнения недостоверно уменьшал данный показатель на 1,4% (табл. 3). При низких скоростях сдвига исследуемое вещество снижало показатель вязкости крови на 32% (данные статистически достоверны), при этом превышая активность пентоксифиллина на 24%. Полученные данные подтверждаются достоверным снижением индекса агрегации эритроцитов под действием соединения СУМ-55 на 15%.

Таблица 3.

Влияние вещества СУМ-55 и пентоксифиллина в эквимоллярных дозах (при однократном внутривенном введении) на вязкость крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом (стрептозотозин 45 мг/кг при внутривенном введении) ($M \pm m$, $n=6$).

Группы животных	Показатель вязкости крови (мПа*с) при скорости сдвига:				ИАЭ, у.е.
	300 с^{-1}	50 с^{-1}	10 с^{-1}	3 с^{-1}	
Контроль (интактные животные)	$3,80 \pm 0,08$	$5,10 \pm 0,12$	$7,46 \pm 0,22$	$9,19 \pm 0,24$	$2,13 \pm 0,06$
Стрептозотоциновый диабет	$5,13 \pm 0,16^*$	$7,22 \pm 0,31^*$	$11,05 \pm 0,62^*$	$14,58 \pm 0,52^*$	$2,39 \pm 0,05^*$
Стрептозотоциновый диабет + СУМ-55 (6 мг/кг)	$4,43 \pm 0,18^*$	$5,48 \pm 0,23^*$	$7,38 \pm 0,35^*$	$9,67 \pm 0,65^*$	$1,98 \pm 0,07^*$
Стрептозотоциновый диабет + пентоксифиллин (4 мг/кг)	$5,06 \pm 0,15$	$7,08 \pm 0,08$	$9,77 \pm 0,24$	$13,12 \pm 0,37$	$2,12 \pm 0,05^*$

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе крыс, со стрептозотозин-индуцированным сахарным диабетом ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни.

Примечание: n-количество животных в группе; ИАЭ – индекс агрегации эритроцитов.

Соединение СУМ-55 после внутривенного введения панкреатэктомированным собакам снижало вязкость крови при всех скоростях сдвига. Через 30 минут после введения соединения СУМ-55 происходило достоверное снижение вязкости крови при скоростях сдвига 30 с^{-1} и 3 с^{-1} на 55% и 69% соответственно. Пентоксифиллин при тех же скоростях сдвига снижал данный показатель на 52% и 68%. К первому часу эксперимента вязкость крови собак с экспериментальным сахарным диабетом при высокой скорости сдвига снижалась на 36%, а при низкой – на 65% под влиянием вещества СУМ-55, а для пентоксифиллина этот показатель составил 36% и 73% соответственно. Максимальную активность изучаемое соединение проявило к третьему часу, снижая вязкость образцов крови на 41%, 61% и 74% во всем диапазоне скоростей сдвига, в то время как действие пентоксифиллина несколько снижалось.

Изучаемые вещества проявили значительное влияние на показатели вязкости крови и у крыс с адьювантным артритом. Соединение СУМ-55 после однократного введения крысам с адьювантным артритом приводило к статистически значимому снижению вязкости крови при высокой скорости сдвига на 12% и на 11% при низкой скорости сдвига, превышая при этом активность пентоксифиллина на 4% и 7% соответственно (данные статистически достоверны по отношению к группе крыс с адьювантным артритом). После курсового введения соединения СУМ-55 и пентоксифиллина происходило недостоверное снижение показателя вязкости крови при скорости сдвига 300 с^{-1} . При минимальной скорости 3 с^{-1} изучаемое соединение превышало активность препарата сравнения на 13%. Уменьшение вязкости крови при низкой скорости сдвига свидетельствует о выраженном влиянии соединения СУМ-55 на агрегационный компонент вязкости, что подтверждается достоверным снижением индекса агрегации эритроцитов на 20% (рис. 2). Для пентоксифиллина оно составило лишь 9% ($p < 0,05$).

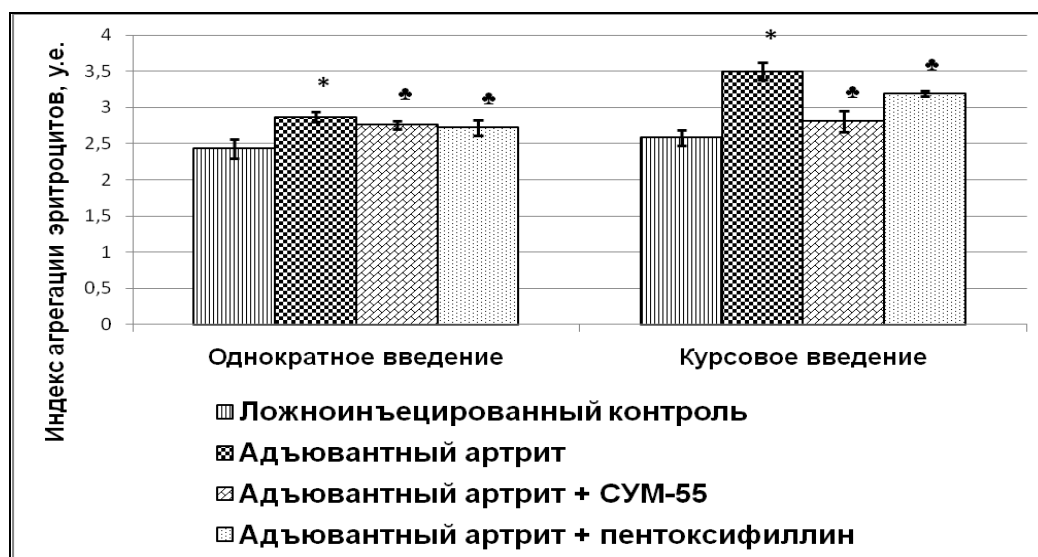


Рис. 2. Влияние изучаемых веществ на индекс агрегации эритроцитов крови крыс с адьювантным артритом при однократном и курсовом внутривенном введении.

Таким образом, исследуемое соединение СУМ-55 снижало вязкость крови при всех скоростях сдвига у животных с экспериментальной патологией, оказывая воздействие, как на деформационный, так и на агрегационный компоненты показателя.

Вискозиметрическим и фильтрационным методами было установлено улучшение деформируемости эритроцитов крови крыс с экспериментальной патологией. Вещество СУМ-55 у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом при скорости сдвига 300 с^{-1} достоверно снижало вязкость эритроцитарной взвеси на 10%, в то время как пентоксифиллин практически не проявил данного вида активности. Максимальную активность (27%) соединение СУМ-55 продемонстрировало при скорости сдвига 3 с^{-1} , превышая активность пентоксифиллина при аналогичной скорости сдвига на 16% ($p < 0,05$). Полученные данные подтверждаются достоверным увеличением скорости фильтрации эритроцитов в 2 раза под влиянием соединения СУМ-55, которое на 7% превышает по активности пентоксифиллин.

Улучшение деформационных способностей эритроцитов после введения изучаемых соединений наблюдается и на модели адьювантного артрита у крыс. Соединение СУМ-55 после однократного введения приводило к снижению вязкости эритроцитарной взвеси больных животных при скоростях сдвига 300 с^{-1} и 3 с^{-1} на 6% и 8% соответственно. Полученные данные носили достоверный характер по сравнению с группой крыс с адьювантным артритом. При этом активность изучаемого вещества была сопоставима с показателями пентоксифиллина. Таким образом, соединение СУМ-55 при однократном введении приводило к усилению деформационных возможностей эритроцитов, что подтверждается повышением скорости фильтрации эритроцитов на 51% под действием вещества СУМ-55 ($p < 0,05$), которое превосходило по активности препарат сравнения на 17%. После семидневного введения соединения СУМ-55 максимальное снижение вязкости эритроцитарной взвеси происходило при скорости сдвига 3 с^{-1} и составило 19%, то есть на 6,5% больше, чем показатель пентоксифиллина (данные достоверны по отношению к группе крыс с адьювантным артритом). Скорость фильтрации эритроцитов после курсового введения вещества СУМ-55 увеличилась на 77%, а пентоксифиллина – на 62%.

При стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете соединение СУМ-55 проявило выраженное влияние на механические свойства эритроцитов. Так, исследуемое соединение достоверно увеличивало осмотическую резистентность эритроцитов на 51%, не уступая по активности препарату сравнения (50%) (табл. 4). Устойчивость эритроцитов к действию 0,1н соляной кислоты под влиянием соединения СУМ-55 и пентоксифиллина увеличивалась недостоверно. Интенсивность флуоресценции положительно заряженного зонда ДСМ⁺ вещество СУМ-55 повышало на 58%, пентоксифиллин на 41% ($p < 0,05$), что может свидетельствовать об увеличении электроотрицательности мембран эритроцитов.

Изучаемое соединение, вводимое однократно крысам с адьювантным артритом, увеличивало осмотическую и кислотную резистентность эритроцитов на 38% и 37% соответственно, а после курсового введения – на 33% и 37%, не уступая по активности препарату сравнения.

При экспериментальном сахарном диабете и адьювантном артрите соединение СУМ-55 оказывало нормализующее влияние на коагуляционный статус животных сопоставимое с препаратом сравнения.

Таблица 4.

Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина в эквимолярных дозах (при однократном внутривенном введении) на механические свойства эритроцитов крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом (стрептозотоцин 45 мг/кг при внутривенном введении) ($M \pm m$, $n=6$).

Группы животных	ОРЭ, %	КРЭ, сек	СФЭ, мл/мин	АПФ, мм
Контроль (интактные животные)	26,17±1,16	68,33±5,85	2,55±0,29	220,7±7,02
Стрептозотоциновый диабет	53,96±3,79*	53,67±3,99*	0,83±0,09*	120,9±2,02*
Стрептозотоциновый диабет + СУМ-55 (6 мг/кг)	26,39±1,86*	59,50±0,99	1,92±0,14*	190,1±1,80*
Стрептозотоциновый диабет + Пентоксифиллин (4 мг/кг)	26,88±1,14*	54,83±3,03	1,87±0,15*	170,7±1,37

Обозначения:

ОРЭ – осмотическая резистентность эритроцитов (%гемолиза), КРЭ – кислотная резистентность эритроцитов ($T_{1/2}$ максимальной амплитуды гемолиза – сек.), СФЭ – скорость фильтрации взвеси эритроцитов (мл/мин), АПФ – амплитуда пика флуоресценции зонда ДСМ⁺ (мм).

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни.

Примечание: n-количество животных в группе.

Определяющая роль в обеспечении адекватного кровоснабжения принадлежит системе микроциркуляции. Состоятельность указанного процесса зависит от структуры и количества микрососудов, реологических свойств крови, ее тромбогенного потенциала [Мчедlishvili Г.И., 1996]. Поскольку в ранее проведенных исследованиях было выявлено, что соединение СУМ-55 обладает выраженными гемореологическими свойствами и не уступает по активности препарату сравнения, была предпринята попытка изучить его влияние на параметры микроциркуляции и выживаемость ткани в условиях редуцированного кровообращения.

Действие вещества СУМ-55 и пентоксифиллина на микроциркуляцию оценивали по изменению скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии после их внутривенного введения. В результате было установлено, что соединение СУМ 55 вызывало повышение скорости мозгового кровотока от исходного уровня в среднем на 34%, а пентоксифиллин – на 23% ($p \geq 0,05$).

Далее с использованием ультразвукового доплерографа была изучена микроциркуляция в каждом лоскуте в условиях редуцированного кровообращения. На первом этапе исследуемые соединения и физиологический раствор вводили животным сразу после выкраивания кожного лоскута. У животных получавших соединение СУМ-55 уже к 10 минуте исследования отмечается увеличение скорости кровотока на 56%. Максимальные изменения скорости тканевого кровотока наблюдались через 20-40 минут после введения соединения СУМ-55 и препарата сравнения. Однако уже к 50 минуте исследования, в группе животных получавших пентоксифиллин, происходит значительное снижение данного показателя по сравнению с группой животных получающих СУМ-55.

На втором этапе проводилось исследование микроциркуляции в кожном лоскуте через 72 часа после операции. Исходная скорость кровотока у крыс с некробиотическими изменениями кожного лоскута достоверно снижалась на 30% по сравнению с данными, полученными сразу после операции по выкраиванию кожного лоскута. У животных, которым вводили соединение СУМ-55, уже к 10 минуте отмечается статистически достоверное увеличение скорости тканевого кровотока на 52%, а к 20 минуте на 71,4%. Максимальное увеличение скорости кровотока наблюдалось через 40 минут. У животных, получавших пентоксифиллин, к 10 минуте исследования, было зарегистрировано увеличение скорости тканевого кровотока на 34%. К 40 минуте данный показатель максимально увеличился на 74% ($p < 0,05$).

Полученные данные подтверждаются результатами исследований по изучению способности изучаемых веществ повышать выживаемость кожного лоскута в условиях редуцированного кровообращения, в ходе которых было установлено, что в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор, некроз кожного лоскута составил 54%, а соединение СУМ-55 и пентоксифиллин (статистически достоверно) увеличивали выживаемость кожного лоскута на питающей ножке на 39,8% и 31% соответственно (рис. 3).

Таким образом, соединение СУМ-55 и пентоксифиллин усиливают тканевой кровоток в условиях нормы и патологии, вызванной некробиотическим изменением тканей. При этом вещество СУМ-55 по своей активности превосходит пентоксифиллин. Полученные данные позволяют утверждать, что исследуемое соединение улучшает микроциркуляцию ткани в условиях редуцированного кровоснабжения.

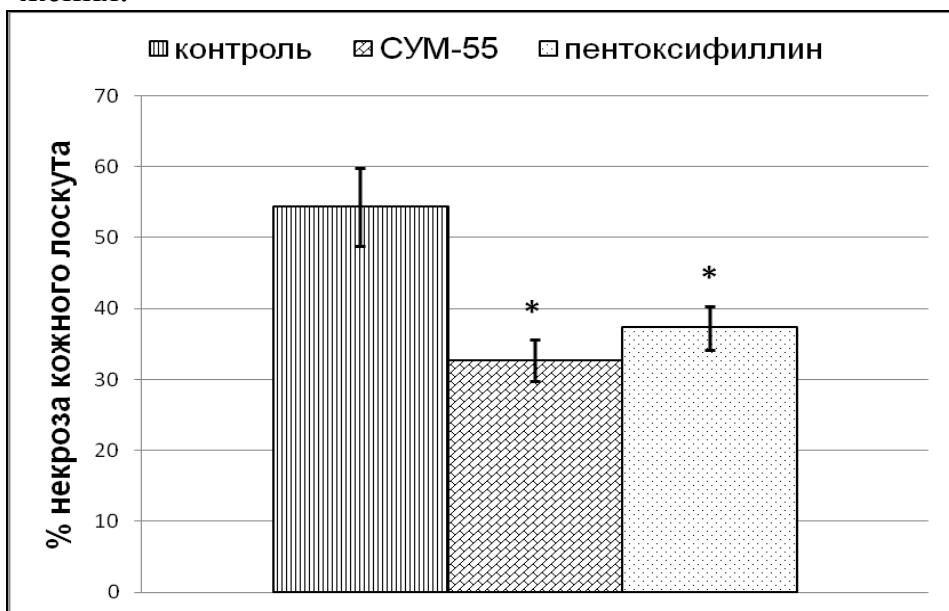


Рис. 3. Влияние вещества СУМ-55 (6 мг/кг) и пентоксифиллина (4 мг/кг) на выживаемость кожного лоскута в условиях редуцированного кровообращения.

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе крыс, получавших физиологический раствор, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

С целью изучения механизма гемореологического действия соединения СУМ-55 и пентоксифиллина было исследовано их влияние на основные микро-реологические параметры (агрегацию и деформируемость эритроцитов, заряд мембран и вязкостноэластические свойства красных клеток крови, а также на агрегацию эритроцитов при увеличении концентрации внутриклеточного Ca^{2+}).

При микроскопическом исследовании было обнаружено статистически значимое увеличение показателя агрегации эритроцитов крови крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом в 3 раза по сравнению с интактными животными, при этом средний размер агрегата значимо увеличивался в 2 раза (табл. 5). После введения соединения СУМ-55 наблюдали снижение показателя агрегации эритроцитов на 57% и размера агрегатов на 37% по сравнению с группой диабетических крыс, получавших физиологический раствор (данные сопоставимы с показателями пентоксифиллина).

Таблица 5.

Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина в эквимоллярных дозах (при двукратном ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 5 суток) на показатели агрегации эритроцитов крыс с экспериментальным сахарным диабетом (стрептозотозин 45 мг/кг при внутрибрюшинном введении) ($M \pm m$, $n=10$).

Группы животных	Показатель агрегации	Среднее число эритроцитов в агрегате
Контроль (интактные животные)	0,022±0,009	2,96±0,41
Стрептозотоциновый диабет	0,070±0,022*	6,10±0,94*
Стрептозотоциновый диабет + СУМ-55 (6 мг/кг)	0,030±0,018*	3,82±0,49*
Стрептозотоциновый диабет + Пентоксифиллин (4 мг/кг)	0,030±0,013*	3,61±1,47*

* - данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$);

* - данные достоверны по отношению к группе крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Примечание: n-количество животных в группе.

Кроме того, фотометрическим методом с использованием автоматического агрегометра Murgene было обнаружено статистически значимое увеличение степени агрегации эритроцитов, у крыс с сахарным диабетом по отношению к интактным животным после высокосдвигового вращения (M) и в условиях низкосдвигового вращения (M1). Так при скорости сдвига 600 c^{-1} степень агрегации в двух интервалах времени – 5 и 10 секунд (M_5 и M_{10}) увеличивалась более чем в 2 раза. При низкой скорости – 3 c^{-1} также в двух временных интервалах (M_{15} и M_{10}) данный показатель увеличивался на 65% и 79% соответственно.

Исследуемое соединение и препарат сравнения, вводимые внутрибрюшинно крысам со стрептозотоциновым сахарным диабетом, приводили к снижению степени агрегации эритроцитов. Соединение СУМ-55 при скорости сдвига 600 c^{-1} снижало степень агрегации на 26% и 42% (M_5 и M_{10}), а препарат сравнения на 2% и 17% (M_5 и M_{10}). С уменьшением скорости сдвига до 3 c^{-1} влияние соединения СУМ-55 на данный показатель уменьшилось и составило 7% и 31% соответственно временным интервалам – 5 и 10 секунд. Пентоксифиллин снижал степень агрегации эритроцитов на 3% и 20% (M_{15} и M_{10}) ($p > 0,05$).

Нарушение деформируемости эритроцитов, в немалой степени, зависит от эластичности мембраны эритроцитов, первичную роль в которой играет спектрин, и микровязкостью мембраны, которая характеризует сопротивление скорости де-

формации [Мищук И.И. и др., 1993; Катюхин Л.Н., 1995; Hardeman M.R. et al., 2003].

При экспериментальном синдроме повышенной вязкости крови, смоделированном методом теплового воздействия, наблюдается достоверное увеличение вязкости отмытых эритроцитов при всех скоростях сдвига. При добавлении исследуемых веществ в прогретые образцы крови кроликов в концентрациях 100, 10, 1 мкМоль/л было обнаружено дозозависимое снижение вязкости эритроцитарной суспензии. Наибольшее влияние на данный показатель соединения оказывают при низких скоростях сдвига, где определяющую роль играет вязкость самой мембраны и клеточная геометрия.

Помимо этого выявлено, что соединение СУМ-55 увеличивает скорость фильтрации эритроцитарной суспензии на 24%, превышая при этом активность препарата сравнения на 4% (данные статистически достоверны по отношению к прогретому контролю). Улучшение деформируемости эритроцитов под действием изучаемых соединений подтверждается данными, полученными с использованием проточной микрокамеры. Соединение СУМ-55 достоверно, по отношению к группе крыс с сахарным диабетом, увеличивало деформируемость красных клеток крови, о чем свидетельствует повышение индекса удлинения эритроцитов на 70% (рис. 4), превышая показатель пентоксифиллина на 24%.

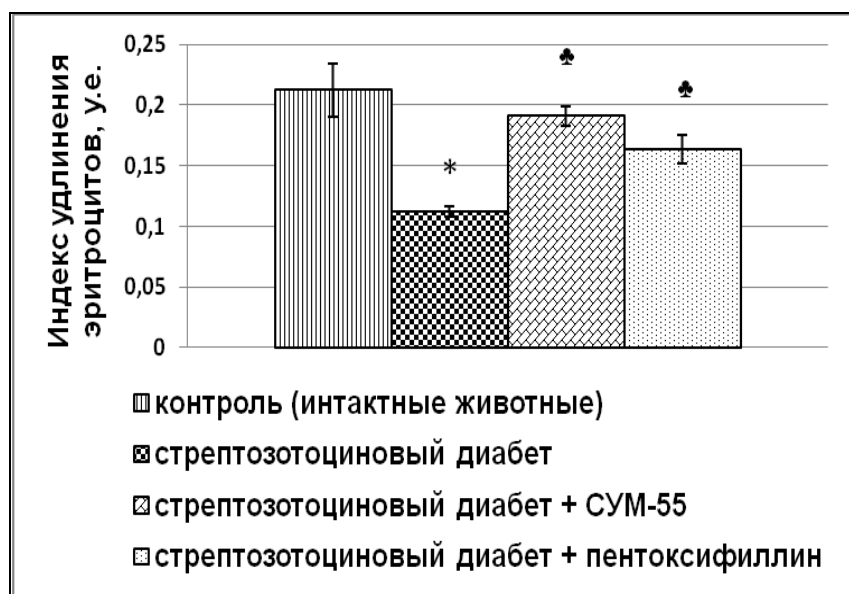


Рис. 4. Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина в эквимольных дозах на индекс удлинения эритроцитов крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$);

** – данные достоверны по отношению к группе крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Соединение СУМ-55 и пентоксифиллин снижали показатель анизотропии зонда ДСП-6 в концентрациях 100 мкМоль/л, 10 мкМоль/л, 1 мкМоль/л, что свидетельствует об уменьшении микровязкости мембраны эритроцитов. При этом изучаемое соединение превышает по активности препарат сравнения и демонстрирует дозозависимый эффект.

Известно, что в обеспечении суспензионной стабильности крови немаловажную роль играет величина заряда эритроцита. Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина на интенсивность флуоресценции зонда ДСМ⁺ в суспензии эритроцитов изучали в концентрациях 10; 100; 1000 мкМоль/л. Вещество СУМ-55 в концентрации 10 мкМоль/л повышает интенсивность флуоресценции зонда в

суспензии эритроцитов на 70%, достоверно превышая показатели пентоксифиллина. В концентрации 100 мкМоль/л соединение СУМ-55 и пентоксифиллин увеличивали данный показатель в 2 раза и на 37% соответственно (данные достоверны по отношению к контролю для соединения СУМ-55). При увеличении концентрации до 1000 мкМоль/л интенсивность флуоресценции возрастала у обоих веществ, при этом соединение СУМ-55 по активности превосходило пентоксифиллин на 67% (данные достоверны по отношению к контролю).

Величина электрофоретической подвижности красных клеток крови определяется двумя основными факторами: толщиной слоя гликокаликса эритроцитов и средним эффективным радиусом сегмента полимера. Старение эритроцитов сопровождается изменением состава мембранных белков, гликокаликс претерпевает многочисленные структурные перестройки, уменьшается содержание фосфолипидов и холестерина без изменения содержания мембранных белков, т.е. снижается соотношение липид:белок, уменьшается деформируемость эритроцитов, что приводит к усилению элиминации их при прохождении через капилляры [Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1981].

После фракционирования эритроцитов было выявлено, что электрофоретическая подвижность и дзета-потенциал "старых" эритроцитов достоверно снижены на 45% по сравнению с "молодыми" (табл. 6). Соединение СУМ-55 увеличивало электрофоретическую подвижность и дзета-потенциал "старых" эритроцитов на 48%, превышая по своей активности пентоксифиллин на 17% ($p < 0,05$).

Таблица 6.

Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина в концентрации 100 мкМоль/л на электрофоретическую подвижность (V) и заряд (ζ) мембраны эритроцитов ($M \pm m$, $n=6$).

Группы	V, мкм*с ⁻¹ *см	ζ , мВ
Контроль («молодые» эритроциты)	1,90±0,22	26,66±3,04
Контроль («старые» эритроциты)	1,04±0,04*	14,55±0,60*
Соединение СУМ-55	1,54±0,14*	21,52±1,94*
Пентоксифиллин	1,37±0,08*	19,10±1,14*

* – данные достоверны по отношению к значениям «молодых» эритроцитов, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

* – данные достоверны по отношению к значениям «старых» эритроцитов, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Примечание: n – количество животных в группе.

Показатель агрегации эритроцитов после инкубации с кальциевым ионофором A23187 статистически значимо повышался в 2 раза, а средний размер агрегатов на 68%. Соединение СУМ-55 достоверно по отношению к пробам, проинкубированным только с ионофором, снижало показатель агрегации эритроцитов на 37%, в то время как пентоксифиллин недостоверно снижал данный показатель на 13%. Средний размер агрегатов после инкубации с изучаемым веществом уменьшался на 40%, при этом соединение СУМ-55 превышало активность препарата сравнения на 14% ($p < 0,05$).

Повышение уровня Ca^{2+} в эритроцитах в результате инкубации клеток с кальциевым ионофором A23187 (3,0 мкМ) существенно стимулировало агрегацию клеток. Так при скорости сдвига 600 с⁻¹ степень агрегации в двух интервалах вре-

мени – 5 и 10 секунд (M_5 и M_{10}) достоверно увеличивалась более чем в 5 раз. При низкой скорости – 3 с^{-1} также в двух временных интервалах (M_{15} и M_{10}) данный показатель увеличивался на 93% и практически в 3 раза соответственно ($p < 0,05$) (табл. 7).

Соединение СУМ-55 при высокосдвиговом вращении снижало степень агрегации эритроцитов, по сравнению с пробами, проинкубированными только с ионофором, на 70% ($p < 0,05$) и 62% (M_5 и M_{10}), а препарат сравнения на 33% ($p < 0,05$) и 42% (M_5 и M_{10}). При уменьшении скорости сдвига до 3 с^{-1} влияние соединения СУМ-55 на показатель агрегации эритроцитов незначительно уменьшилось и составило 62%, 60% ($p < 0,05$) соответственно временным интервалам – 5 и 10 секунд. В то время как препарат сравнения недостоверно снижал агрегацию эритроцитов на 38% и 46% соответственно.

Таблица 7.

Влияние соединения СУМ-55 и пентоксифиллина в концентрации 100 мкМоль/л на показатели агрегации эритроцитов, полученные фотометрическим методом в стадии после высокосдвигового вращения (M) и в условиях низкосдвигового вращения ($M1$), при увеличении пула внутриклеточного Ca^{2+} под действием кальциевого ионофора A23187 (3,0 мкМ) ($M \pm m$, $n=10$).

Группа	M_{15}	M_5	M_{10}	M_{10}
Контроль	$2,00 \pm 0,60$	$0,20 \pm 0,11$	$3,22 \pm 0,98$	$0,55 \pm 0,26$
Ионофор A23187	$3,87 \pm 0,68^*$	$1,05 \pm 0,31^*$	$9,10 \pm 1,56^*$	$2,88 \pm 1,03$
СУМ-55 + ионофор A23187	$1,46 \pm 0,55$	$0,32 \pm 0,18^*$	$3,62 \pm 1,09^*$	$1,08 \pm 0,43$
Пентоксифиллин + ионофор A23187	$2,38 \pm 0,55$	$0,70 \pm 0,26^*$	$4,92 \pm 0,55$	$1,68 \pm 0,57$

* – данные достоверны по отношению к контрольной группе контроля, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$);

* – данные достоверны по отношению к группе с добавлением ионофора, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Примечание: n – количество животных в группе;

M_{15} и M_{10} – степень агрегации эритроцитов в условиях низкосдвигового вращения через 5 и 10 секунд соответственно;

M_5 и M_{10} – степень агрегации эритроцитов в стадии после высокосдвигового вращения через 5 и 10 секунд соответственно.

При изучении общепармакологических свойств соединения СУМ-55 после однократного внутрибрюшинного введения в диапазоне доз от 6 мг/кг до 96 мг/кг не были выявлены изменения в функциональном состоянии вегетативной нервной системы и эмоциональном статусе подопытных животных. Первые токсические эффекты (статистически недостоверное уменьшение ипсилатерального сгибательного рефлекса, вертикальной двигательной и поисковой активности) наблюдали после введения 48 мг/кг вещества СУМ-55. В максимально вводимой дозе 96 мг/кг эти проявления нарастают. Происходит угнетение рефлексов, мышечного тонуса, двигательной и поисковой активности, а также снижение температуры тела. Полученные данные не противоречат ранее проведенным экспериментам по изучению острой токсичности вещества СУМ-55 ($LD_{50}=229,8 \text{ мг/кг}$), по показателю которой данное соединение относится к классу малотоксичных (по классификации К.К. Сидорова).

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что все изученные вещества, относящиеся к 7,8-замещенным производным ксантина, проявили гемореологическую активность различной степени выраженности. Реологическая активность соединений в значительной степени зависит от их химической структуры. Наиболее выраженное ингибирующее действие на агрегацию эритроцитов проявляют N⁷-гидроксипропилзамещенные производные 1,3-диметилксантина. Высокоактивные соединения характеризуются высокой липофильностью и молекулярной рефракцией, средней величиной полярности.

По результатам скрининга выявлено наиболее активное соединение СУМ-55, которое обладает высокой эффективностью, низкой токсичностью и по широте терапевтического действия превосходит пентоксифиллин.

Высокая гемореологическая активность соединения СУМ-55 подтверждается результатами, полученными в исследованиях *in vitro* на образцах крови больных сахарным диабетом. Было показано, что вещество СУМ-55 снижает вязкость крови во всем диапазоне скоростей сдвига, оказывая корректирующее действие, как на процессы агрегации, так и на деформируемость мембраны эритроцитов. Исследования, проведенные на экспериментальных моделях, сопровождающихся синдромом гипервязкости крови, подтвердили наличие выраженного гемореологического эффекта у соединения СУМ-55. Так, было выявлено, что соединение СУМ-55 оказывает корректирующее влияние на гемореологический статус животных (снижает вязкость крови и агрегацию эритроцитов, улучшает деформируемость эритроцитов, их устойчивость к осмотическому и кислотному гемолизу) как при однократном, так и при курсовом введении. Кроме того, соединение СУМ-55 улучшает микроциркуляцию в тканях в условиях нормы и патологии, что подтверждается увеличением выживаемости кожного лоскута в условиях редуцированного кровообращения, усилением кровотока в головном мозге интактных крыс и кожном лоскуте на питающей ножке.

Проведенное исследование механизмов действия изучаемых веществ, продемонстрировало, что в основе гемореологической активности лежит влияние на основные микрореологические свойства эритроцитов: агрегацию и деформируемость, которые определяются мембранотропными эффектами соединений (влияние на заряд и микровязкость мембраны).

Таким образом, гемореологическая активность, проявленная соединением СУМ-55, позволяет предположить перспективность дальнейшего изучения фармакологических свойств этого соединения с целью создания на его основе нового препарата, превосходящего по активности пентоксифиллин.

ВЫВОДЫ.

1. Соединения, относящиеся к N⁷, C⁸ производным ксантина, обладают гемореологической активностью различной степени выраженности.

2. Наиболее выраженное ингибирующее действие на агрегацию эритроцитов проявляют N⁷-гидроксипропилзамещенные производные 1,3-диметилксантина. Высокоактивные соединения характеризуются следующими физико-химическими параметрами: высокой липофильностью и молекулярной рефракцией, средней величиной полярности.

3. Соединение СУМ-55 превышает пентоксифиллин по показателю гемореологической активности (EC_{20}) в 8,8 раза. Кроме того, оно оказалось наименее токсичным, а по широте терапевтического действия в 11,9 раза превосходит пентоксифиллин.

4. В исследованиях *in vitro* на образцах крови больных сахарным диабетом вещество СУМ-55 снижает вязкость крови во всем диапазоне скоростей сдвига, оказывая корректирующее действие как на процессы агрегации, так и на деформируемость мембраны эритроцитов.

5. На моделях экспериментальной патологии, сопровождающихся развитием синдрома «повышенной вязкости крови» (стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет, панкреатэктомированные собаки, адьювантный артрит), соединение СУМ-55 в дозе 6 мг/кг оказывает выраженное действие на гемореологический статус животных (уменьшает вязкость крови и агрегацию эритроцитов, увеличивает их деформируемость и устойчивость к осмотическому и кислотному гемолизу) как при однократном, так и при курсовом введении.

6. Соединение СУМ-55 увеличивает выживаемости ткани в условиях редуцированного кровообращения на 39,8%, улучшает микроциркуляцию в кожном лоскуте на питающей ножке, усиливая скорость кровотока на 71%.

7. Соединение СУМ-55 оказывает нормализующее действие на микрореологические свойства эритроцитов: снижает агрегацию и достоверно улучшает деформируемость (увеличение индекса удлинения эритроцитов на 70% и микровязкости эритроцитарных мембран на 49%), повышает поверхностный отрицательный заряд мембраны красных клеток крови, что проявляется в увеличении электрофоретической подвижности на 48% и усилении флуоресценции зонда ДСМ⁺.

8. Вещество СУМ-55 приводит к уменьшению процессов агрегации эритроцитов при увеличении пула внутриклеточного Ca^{2+} в среднем на 40%, превышая по активности препарат сравнения.

9. При экспериментальном изучении общепармакологических свойств соединения СУМ-55 показано, что после шестнадцатикратного увеличения терапевтической дозы наблюдается уменьшение ректальной температуры, горизонтальной двигательной и исследовательской активности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. **Изучение влияния соединений СУМ-55 и С-83 на агрегацию и деформабельность клеточных элементов крови // Вестник РГМУ. – М., 2006. – №2 (49). – С.385-386 (соавт. Котов В.Н., Науменко Л.В.).**

2. Поиск гемореологически активных соединений среди тиетанил и оксипропил замещенных производных ксантина // Тез. докл. XIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. Изд-во ВолГМУ. 2008. – С.96-98 (соавт. Науменко Л.В., Шабалина Ю.В.).

3. Оценка параметров микроциркуляции головного мозга крыс под влиянием соединения С-83 и пентоксифиллина // Материалы IV Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (С Международным участием). – Москва, 2009. – С.177-178 (соавт. Спасов А.А., Науменко Л.В., Халиуллин Ф.А., Клен Е.Э.).

4. Гемореологическая активность новых производных этилксантина *in vitro* // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сборник научных трудов. Выпуск 64. – Пятигорск, 2009. – С.501-502 (соавт. Науменко Л.В., Спасов А.А., Шабалина Ю.В., Халиуллин Ф.А.).
5. Изучение гемореологических свойств нового производного ксантина при адьювантном артрите у крыс // Материалы XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2009. – С.741 (соавт. Спасов А.А., Науменко Л.В., Халиуллин Ф.А.).
6. Влияние соединения СУМ-55 на жизнеспособность ткани в условиях редуцированного кровообращения // Материалы VII Международной научной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)» - Ярославль, 2009. – С.23 (соавт. Спасов А.А., Науменко Л.В., Халиуллин Ф.А.).
7. Фармакологическое исследование нового класса гемореологических средств // Материалы VII Международной научной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)»- Ярославль, 2009. – С.131 (соавт. Спасов А.А., Науменко Л.В., Халиуллин Ф.А., Анисимова В.А.).
8. Изучение выживаемости ткани под влиянием соединения СУМ-55 // Материалы 67-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 2009. – С. 182-183 (соавт. Науменко Л.В.).
9. Гемореологическая активность производного ксантина, соединения СУМ-55 // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции с молодежной научной школой «Химия и медицина, Орхимед 2009» – Уфа, 2009. С. 235-236 (соавт. Науменко Л.В., Спасов А.А., Халиуллин Ф.А., Назипов Н.М.).
- 10. Синтез и фармакологическая активность дигидрохлоридов 3-(2,2,2-трихлор-1-гидроксиэтил)имидазо[1,2-*a*]-бензимидазола // Химико-фармацевтический журнал. – М., 2009. – Том 43, №9. – С. 9-12 (соавт. Анисимова В. А., Спасов А.А., Косолапов В.А., Толпыгин И.Е., Поротиков В.И., Кучерявенко А.Ф., Тибирькова Е.В., Ельцова Л.В.).**
11. Влияние соединения СУМ-55 на микроциркуляцию тканей в условиях редуцированного кровообращения // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. №2. 2009. С. 27-29 (соавт. Науменко Л.В., Халиуллин Ф.А., Спасов А.А., Тюренков И.Н.).
- 12. Синтез и антиагрегантная активность 8-аминозамещенных 1-алкил-3-метил-7-(тиетанил-3)ксантинов // Химико-фармацевтический журнал. – М., 2009. – Том 43, №12. – С.7-9 (соавт. Шабалина Ю.В., Халиуллин Ф.А., Спасов А.А., Науменко Л.В.).**
13. Влияние соединения СУМ-55 на электрофоретическую подвижность эритроцитов: исследования *in vitro* // Материалы XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2010. – С.688 (соавт. Науменко Л.В., Спасов А.А., Муравьев А.В., Халиуллин Ф.А.).