

**EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ**

УДК: 616.151.5:661.725.852

DOI: 10.18413/2313-8971-2015-1-4-4-8

**Кудрявцев К.В.,
Корокин М.В.,
Якушев В.И.****ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ
НА ПРОЦЕССЫ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРИЖИЗНЕННОЙ МИКРОСКОПИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК**

- 1) кандидат химических наук, доцент кафедры общей химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ул. Ленинские горы, д.1, стр.3. Москва, РФ, 119991. e-mail: kudr@med.chem.msu.ru
- 2) доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии Медицинского института НИУ «БелГУ» ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308005. e-mail: korokin@bsu.edu.ru
- 3) аспирант кафедры фармакологии Медицинского института НИУ «БелГУ» ул. Победы, 85, г. Белгород, РФ, 308005. e-mail: yakushev@bsu.edu.ru

Аннотация. В настоящей статье изложены результаты исследования влияния соединений фенольной природы на процессы формирования тромба на выбранной модели патологии с помощью прижизненной микроскопии и флуоресцентных меток. Статистически значимое положительное влияние на процесс тромбообразования при моделировании FeCl₃ индуцированного тромбоза сосудов микроциркуляторного русла обнаружено при применении соединений KUD259, KUD974 и KUD975 в дозе 3 мг/кг, что выражалось в снижении пикового размера тромба, увеличении времени до достижения пикового размера тромба, уменьшении времени стабильного состояния тромба и снижении процентов окклюзии сосуда по сравнению с животными, у которых моделировали тромбоз без коррекции исследуемыми соединениями. Наиболее активным соединением при моделировании FeCl₃ индуцированного тромбоза сосудов микроциркуляторного русла было соединение с лабораторным шифром KUD259.

Ключевые слова: соединения фенольной природы, тромбоз, FeCl₃, витальная микроскопия, флуоресцентные метки.

**Kudryavtsev K.V.,
Korokin M.V.,
Yakushev V.I.****STUDY THE EFFECT OF COMPOUND OF PHENOLIC NATURE
ON THE FORMATION OF BLOOD CLOTS USING INTRAVITAL
MICROSCOPY AND FLUORESCENT LABELS**

- 1) PhD in Chemistry, Associate professor. Department of general chemistry. Lomonosov Moscow State University. 1, GSP-1, 1-3 Leninskiye Gory St., Moscow, 119991, Russia. e-mail: kudr@med.chem.msu.ru
- 2) Doctor of Medical Sciences, Professor Department of pharmacology Belgorod State National Research University. 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. e-mail: korokin@bsu.edu.ru
- 3) Postgraduate student of the Department of Pharmacology. Belgorod State National Research University 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. e-mail: yakushev@bsu.edu.ru

Abstract. This article presents the results of investigation of phenolic compounds on the formation of a blood clot on the chosen model of pathology using intravital microscopy and fluorescent labels. A statistically significant positive impact on the process of thrombus formation in the simulation FeCl₃ induced microvascular thrombosis found for the compounds KUD259, KUD974 and KUD975 at a dose of 3 mg / kg, which was reflected in the reduction of the peak size of the clot, increasing the time to reach the peak size of the clot. reducing time and steady state thrombus occlusion of the vessel percent decrease compared to the animals in which simulated thrombosis without correcting the test compounds. The most active compound in modeling FeCl₃ induced microvascular thrombosis was a compound to the laboratory code KUD259.

Keywords: phenolic compounds, thrombosis, FeCl₃, vital microscopy, fluorescent labels.

Взаимосвязь эндотелиальной дисфункции и окислительного стресса продемонстрирована во многих экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, включая клинические исследования на человеке [2]. Вследствие этого одним из рациональных подходов к разработке новых эндотелиопротекторных лекарственных препаратов может быть использование органических соединений, обладающих антиоксидантными свойствами. Помимо этого, разрабатываемые соединения должны обладать приемлемыми физико-химическими свойствами, характерными для лекарственных соединений – так называемым ADMET-профилем. Активные ингредиенты с неприемлемыми ADMET-свойствами не смогут проявить необходимый физиологический эффект *in vivo*. В настоящем исследовании разработаны соединения нового класса, для некоторых представителей которого ранее была продемонстрирована антиоксидантная активность на примере модельной системы пероксидного окисления липидов (ПОЛ) [1], и которые содержат привилегированную подструктуру – структурный фрагмент гетероциклического тиацетамида [6].

Для проведения виртуального поиска мишеней использовались несколько доступных на некоммерческой основе онлайн-сервисов. В качестве первичной оценки использовался предсказатель активности от компании Molinspiration [5]. Был использован классификатор, базирующийся на таких возможных классах активностей, как активность по отношению к GPCR-рецепторам, модуляция ионных каналов, ингибирование киназ, активность к ядерным рецепторам, протеазная активность и общая ферментная активность. Результаты виртуального поиска мишеней позволили выделить соединения фенольной природы, селективно ингибирующие аргиназу II и тромбин. Далее был проведен обширный 100К скрининг по поиску соединений, являющихся одновременно ингибиторами Аргиназы II и тромбина. Найден ряд малых молекул с $pIC_{50} > 5$ [4].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния синтезированных соединений фенольной природы, содержащих непосредственно связанные гетероатомные и гетероциклические структурные фрагменты под лабораторными шифрами KUD259, KUD970, KUD971, KUD972, KUD973, KUD974, KUD975 и KUD976 на процессы тромбообразования с использованием комплекса витальной микроскопии и флуоресцентных меток.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МД-4711.2015.7 и Министерства образования и науки РФ (соглашение №14.578.21.0012, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI57814X0012)

Экспериментальная часть.

Эксперимент по оценке влияния соединений фенольной природы на процессы тромбообразования с использованием флуоресцентных меток проводился на модели тромбоза ветви сосуда микроциркуляторного русла m.cremaster самцов мышей C57BL на модели тромбоза, индуцированного аппликацией раствора $FeCl_3$, с проведением анализа клинико-функциональных особенностей сосудистой окклюзии и интравитального изучения механизма тромбообразования.

Для моделирования тромбоза ветви сосуда микроциркуляторного русла m.cremaster животных наркотизировали (хлоралгидрат 300 мг/кг), переводили на управляемое дыхание путем интубации трахеи и подключения к аппарату искусственной вентиляции легких, катетеризировали яремную вену для введения флуоресцентных меток, проводили хирургическое выделение фрагмента сосуда микроциркуляторного русла m.cremaster.

Оперативное вмешательство выполняли с применением стереомикроскопа для диссекции Leica M60. 10% раствор $FeCl_3$ наносили на фильтровальную бумагу в концентрации 0.3-0.8 М и осуществляли аппликацию на участок отпрепарированного сосуда. Длительность аппликации составляла 5 минут [3].

Сразу после завершения аппликации в яремную вену вводили флуоресцентные маркеры для маркирования тромбоцитов Rhodamine 6G в дозе 3 мг на мышью массой 20-22 грамм, DiOC6 (dihexaoxacarbocyanine iodide) в дозе 3 мг на мышью массой 20-22 грамма.

Изучение процессов формирования тромба производили с помощью комплекса витальной микроскопии на основе микроскопа Carl Zeiss Examiner Z1 с модулем Vivo DSC, камеры Hamamatsu C9300 и управляющими блоками производства компании 3i, Нидерланды.

Оценку параметров образования тромба и их изменений под действием исследуемых соединений производили с помощью компьютерной программы SlideBook 5.0.

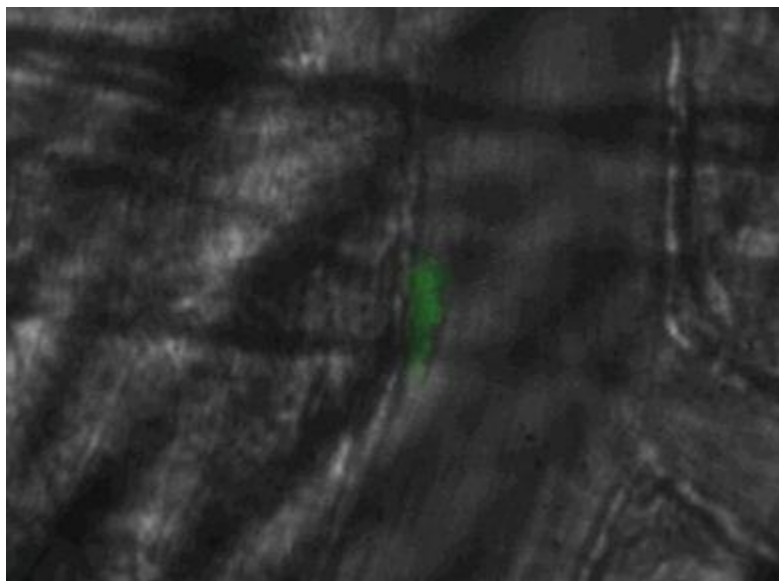


Рисунок 1. Накопление флуоресцентного красителя в месте формирования тромба после воздействия раствором FeCl₃. Место накопления красителя выделено зеленым цветом, X80

Figure 1. The accumulation of the fluorescent dye at the site of thrombus formation after exposure to a solution of FeCl₃. Place the accumulation of the dye highlighted in green, X80

Для оценки влияния исследуемых соединений на образование тромба проводили исследование пика размера тромба, времени до формирования максимального размера тромба и времени стабильного состояния тромба до начала процессов регрессии и реканализации, процент окклюзии сосуда через 10 минут после начала исследования.

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия

оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты и обсуждение:

Результаты исследования влияния исследуемых соединений на образование тромба проводили исследование пика размера тромба, времени до формирования максимального размера тромба и времени стабильного состояния тромба до начала процессов регрессии и реканализации, процент окклюзии сосуда через 10 минут после начала исследования представлены в табл. 1 и на рис. 2.

Таблица 1

Изменение пика размера тромба, времени до наступления пика размера тромба и времени стабильного состояния тромба при моделировании тромбоза, индуцированного аппликацией раствора FeCl₃ на фоне введения соединений KUD259, KUD970, KUD971, KUD972, KUD973, KUD974, KUD975 и KUD976 (M \pm m)

Table 1

Changing the size of the peak of the thrombus, the time before the onset of the peak size of the blood clot and the clot time a stable state in the modeling of thrombosis induced by FeCl₃ solution applique on the background of administration of the compounds KUD259, KUD970, KUD971, KUD972, KUD973, KUD974, KUD975 and KUD976 (M \pm m)

Группа животных	Пик размера тромба, усл. ед.	Время до наступления пика размера тромба, сек.	Время стабильного состояния тромба, сек
Интактные	0	0	0
Модель тромбоза	6855,1 \pm 965,2	133,3 \pm 6,0	278,0 \pm 16,4
KUD-259 (3 мг/кг)	2661,1 \pm 596,2*	191,8 \pm 9,1*	69,5 \pm 6,*8
KUD-970 (3 мг/кг)	6862,1 \pm 827,8	136,8 \pm 5,8	119,7 \pm 11,0*
KUD-971 (3 мг/кг)	7113,5 \pm 652,6	126,2 \pm 6,0	125,7 \pm 5,5*
KUD-972 (3 мг/кг)	7500,4 \pm 485,5	128,5 \pm 4,4	144,3 \pm 13,0*
KUD-973 (3 мг/кг)	6391,9 \pm 834,7	157,0 \pm 5,2*	90,8 \pm 6,8*
KUD-974 (3 мг/кг)	3596,5 \pm 668,2*	183,0 \pm 10,3*	90,4 \pm 9,2*
KUD-975 (3 мг/кг)	2356,2 \pm 259,2*	172,9 \pm 9,1*	83,1 \pm 11,7*
KUD-976 (3 мг/кг)	8951,2 \pm 672,7	134,5 \pm 5,6	86,4 \pm 8,0*

Примечание: * - $p < 0,05$ – в сравнении с группой животных "модель тромбоза"

Результаты исследования влияния соединений фенольной природы на процессы формирования тромба на выбранной модели патологии с помощью прижизненной микроскопии и флуоресцентных меток позволили установить в разной степени выраженное положительное влияние на формирование тромба у исследуемых соединений под лабораторными шифрами KUD259, KUD970, KUD971, KUD972, KUD973, KUD974, KUD975 и KUD976. Статистически значимое положительное влияние на процесс тромбообразования при моделировании FeCl₃ индуцированного тромбоза

сосудов микроциркуляторного русла обнаружено при применении соединений KUD259, KUD974 и KUD975 в дозе 3 мг/кг, что выразалось в снижении пикового размера тромба, увеличении времени до достижения пикового размера тромба, уменьшении времени стабильного состояния тромба и снижении процентов окклюзии сосуда по сравнению с животными, у которых моделировали тромбоз без коррекции исследуемыми соединениями. Наиболее активным соединением в данном фрагменте исследования следует признать соединение с лабораторным шифром KUD259.

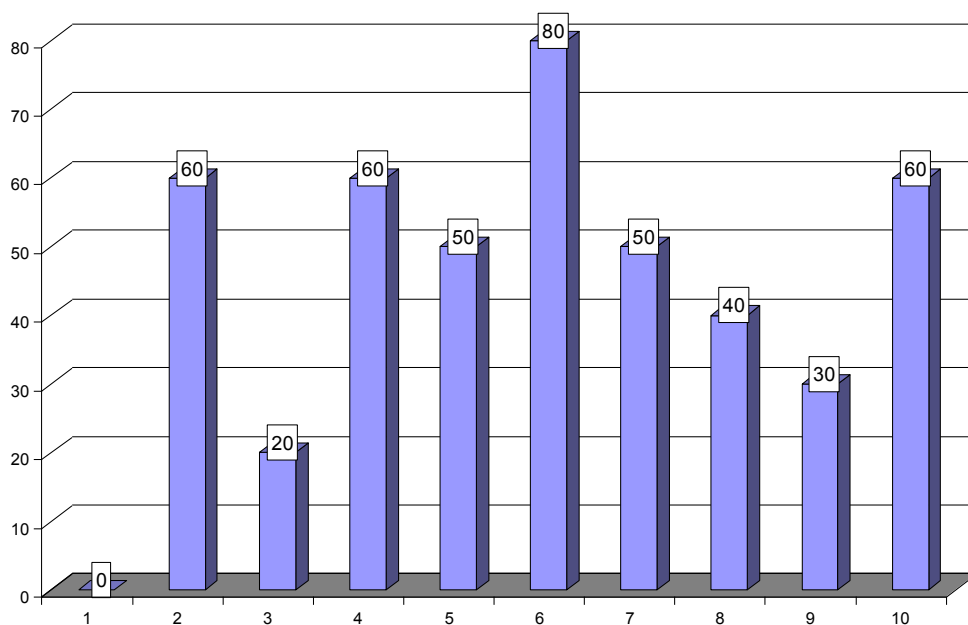


Рисунок 2. Процент окклюзии сосуда микроциркуляторного русла при моделировании тромбоза, индуцированного аппликацией раствора FeCl₃ на фоне введения соединений KUD259, KUD970, KUD971, KUD972, KUD973, KUD974, KUD975 и KUD976

Figure 2. The percentage of vessel occlusion of the microvasculature in the modeling of thrombosis induced by FeCl₃ solution applique on the background of administration of the compounds KUD259, KUD970, KUD971, KUD972, KUD973, KUD974, KUD975 and KUD976

Примечание: 1 – Интактные; 2 – модель тромбоза; 3 – KUD259; 4 – KUD970; 5 – KUD971; 6 – KUD972; 7 – KUD973; 8 – KUD974; 9 – KUD975; 10 – KUD976; * - $p < 0,05$ – в сравнении с группой животных "модель тромбоза"

Результаты ранее проведенных нами *in vitro* исследований подтвердили, что полученные соединения обладают наномолярной ингибирующей активностью в отношении Аргиназы II и тромбина. Таким образом, в настоящем исследовании показано, что полученные в результате компьютерного моделирования и высокопроизводительного скрининга из библиотеки соединений фенольной природы активные хиты, обладают выраженным действием на процессы формирования тромбов в эксперименте *in vivo*.

Литература

1. Пат. RU2473540 Российская Федерация, МПК C07C 323/18; A61K 31/095; A61P 39/06. Амиды 2-(2-гидроксифенилтио) уксусной кислоты, обладающие антиоксидантной активностью, и способ их получения / Кудрявцев К.В., Берберова Н.Т., Осипова В.П., Антонова Н.А.; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВПО АГТУ – Заявл. 2011122906/04, 06.06.2011; опубл. 27.01.2013. Бюл. № 3.

2. Higashi, Y. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications / Y. Higashi, T. Maruhashi, K. Noma // Trends Cardiovasc. Med. – 2014. – V. 24. – P. 165-169.

3. Jose, A. D. Critical Review of Mouse Models of Venous Thrombosis / Jose A. Diaz, Andrea T. Obi, Daniel D. Myers Jr. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2012. – Mar. 32(3). – P. 556-562. Doi:10.1161/ATVBAHA.111.244608.

4. Kudryavtsev Konstantin V. [et al.] Synthesis of novel bridged dinitrogen heterocycles and their evaluation as potential fragments for the design of biologically active compounds. *Tetrahedron*, Pergamon Press Ltd. (United Kingdom). – 2014. – Vol. 70. – № 43. DOI 7854-7864.

5. Molinspiration WebME Molecule Editor [Электронный ресурс] URL: <http://www.molinspiration.com/docu/webme/> (дата обращения 01.12.2015 г.).

6. Song, Y. Heterocycle-thioacetic acid motif: a privileged molecular scaffold with potent, broad-ranging pharmacological activities / Y. Song, P. Zhan, X. Liu // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19. – P. 7141-7154.

References

1. Pat. RU2473540 Russian Federation, IPC C07S 323/18; A61K 31/095; A61P 39/06. Amides of 2- (2-hydroxyphenylthio) acetic acid derivatives having antioxidant activity, and a method for their preparation.

Kudryavtsev K.V., Berberova N.T., Osipova V.P., Antonova N.A. Posted 01.27.2013. Bull. No. 3.

2. Higashi Y., Maruhashi T., Noma K. Trends Cardiovasc. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. *Med. V.* 24. (2014): P. 165-169.

3. Jose A. Diaz, Andrea T. Obi, Daniel D. Myers Jr. Critical Review of Mouse Models of Venous Thrombosis. *Arteriosclerosis. Thrombosis, and Vascular Biology*. Mar. 32(3). (2012): P. 556–562. Doi:10.1161/ATVBAHA.111.244608.

4. Kudryavtsev Konstantin V. [et al.] Synthesis of novel bridged dinitrogen heterocycles and their evaluation as potential fragments for the design of biologically active compounds. *Tetrahedron*, Pergamon Press Ltd. (United Kingdom). Vol. 70. № 43 (2014). DOI 7854-7864.

5. Molinspiration WebME Molecule Editor [Electronic resource] URL: <http://www.molinspiration.com/docu/webme/> (date of the application 01.12.2015).

6. Song Y., Zhan P., Liu X. Heterocycle-thioacetic acid motif: a privileged molecular scaffold with potent, broad-ranging pharmacological activities. *Curr. Pharm. Des.* Vol. 19. (2013): P. 7141-7154.