

циальных фосфолипидов, глицирризиновой кислоты, экидистерона и ликопина в опытах на нормальных мышцах и мышцах с вторичным иммунодефицитным состоянием, развивающимся при гепатите, вызванным четыреххлористым углеродом, оказывает иммуностимулирующее действие, превосходящее по своей выраженности эффект известного гепатопротекторного средства фосфоглива.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: РИА «Новая волна». – 2008. – С. 522.
2. Сагдуллаев Ш.Ш., Турсунова Н.В., Гусакова С.Д., Сыров В.Н., Хушбакова З.А., Иноятова Ф.И., Арипов А.Н., Иногамова Г.З. Фармацевтическая композиция с гепатопротекторными свойствами // Патент РУз – UZ IAP 05701, Бюл. №12 (2018).
3. Сыров В.Н., Хушбакова З.А., Комарин А.С., Абидов А.Б., Печеницына Т.В., Арипходжаева Ф.А. Экспериментально-клиническая оценка эффективности применения экидистена при лечении гепатита // Эксперим. и клин. фармакол. – 2004. – №5. – С. 56-59.
4. Сыров В.Н., Гусакова С.Д., Хушбакова З.А., Эгамова Ф.Р., Хидоятова Ш.К., Сагдуллаев Ш.Ш. Гепатозащитная эффективность новой фитоконпозиции из эссенциальных фосфолипидов с глицирризиновой кислотой, экидистероном и ликопином при экспериментальном хроническом гепатите сравнительно с фосфогливом // Хим.-фарм. журн. – 2022. – Т.56, №11. – С. 30-35.
5. Шахмурова Г.А., Сыров В.Н., Батырбеков А.А. Иммунобиологические свойства фитоэкидистероидов. - Т.: “Fan va texnologiya”. – 2016. – С.176.

УДК: 615.212 : 615.273.53 664.48 :547.918+547.582.2 - 07

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСА АСК С МОНОАММОНИЕВОЙ СОЛЬЮ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Хамдамова Н.А., Выпова Н.А., Кузиев Ш.Н., Умарова Г.Б., Юнусова М.Х., Мухамаджонова Г.М., Хамроев С.Х., Уринов С.Д., Ялалова И.Р., Далимова С.Н.
Национальный университет Узбекистана им.Мирзо Улугбека,
Институт биоорганической химии АН РУз

ХУЛОСА

Тадқиқотнинг мақсади. Ацетилсалицил кислота (АСК) ва глицирризин кислотанинг моноаммоний тузи асосида синтезланган супрамолекуляр комплекс ГЛАСнинг антитромбоген таъсирини экспериментал ўрганиши.

Материаллар ва усуллар: тадқиқотда 60 та оқ наслсиз сичқонлардан фойдаланилди. DiMinnoG методи бўйича коллаген/адреналин аралашмаси таъсирида ҳосил бўлган ўпка тромбози модели ҳайвонларга ГЛАС ва солиштирувчи препаратлар – глицирам ва кардиомагнил таъсири *in vivo* ва *ex vivo* таърибларда тадқиқ этилди. ГЛАС препарати ва солиштирувчи препаратларнинг антитромботик фаоллиги спектрофотометрик усул ёрдамида аниқланди. Ўрганилган препаратларнинг қон плазмаси кўрсаткичларига таъсири CYPRESS DIAGNOSTICS фирманинг (Бельгия) маҳсус реактивлар йиғиндиси ёрдамида аниқланди

Натижалар: *in vivo* ва *ex vivo* таърибларда ўпка тромбозли модел ҳайвонларга ГЛАСнинг перорал юборилиши натижасида ҳосил бўлган тромб катталиги, солиштирувчи препаратларга нисбатан сезиларли даражада пасайиши қайд этилди. ГЛАСнинг 5 мг/кг дозаси таъсирида ҳосил бўлган

SUMMARY

The aim of the study. Experimental study of the antithrombotic effect of GLAS, a supramolecular complex synthesized on the basis of acetylsalicylic acid (ASA) and glycyrrhizic acid monoammonium salt.

Materials and methods: 60 white outbred mice were used in the study. The influence of GLAS and comparison drugs - glycyram and cardiomagnyl on the process of thrombus formation was studied. An experimental model of pulmonary thrombosis was created using the Di Minno G method by introducing a collagen/adrenal mixture (0.5 mg/kg and 0.06 mg/kg, respectively) into the tail vein of mice. In *in vivo* and *ex vivo* experiments, the antithrombotic activity of the drugs was determined using a spectrophotometric method. Using a special set of reagents from CYPRESS DIAGNOSTICS (Belgium), the effect of the studied drugs on blood plasma parameters was studied.

Results: in *in vivo* and *ex vivo* experiments, with oral administration of GLAS to model animals with pulmonary thrombosis, a significant decrease in thrombus size was noted compared to comparison drugs. A 61% reduction in thrombus weight was observed at a GLAS dose of 5 mg/kg. It has been shown that GLAS has a pronounced anticoagulant effect compared to glycyram and

тромб массаси 61% камайиши кузатилади. Бундан ташқари, ГЛАС глицирам ва кардиомагнлга нисбатан яққол намоён бўладиган антикоагулловчи таъсирга эгаллиги ва шу орқали қонни коагулловчи потенциали, фибриноген миқдорини камайтириши, қонни қуюлиши вақтини (АЧТВ) узайтириши хусусиятини намоён қилиши исботланди.

Хулоса. ГЛАС препарати сезиларли даражада кузатиладиган антитромботик таъсирга эга эканлиги ва бу таъсир қонни плазма гемостази кўрсаткичларини ўзгариши орқали намоён бўлиши исботланди.

Калим сўзлар: глицирризин кислотанинг моноаммоний тузи, ацетил салицил кислота, гемостаз, ўпка тромбози, адреналин, коллаген, антитромбоген таъсир.

Тромбообразование играет ключевую роль в развитии различных сердечно-сосудистых осложнений. В патогенезе ишемических болезней человека и других нарушений кровоснабжения органов и тканей, значительное место занимают воспалительные и атеросклеротические повреждения сосудов с нарушением целостности интимы, замедление кровотока, дисбаланс свертывающей и противосвертывающей системы, нарушение реологических параметров крови. При нарушениях реологических параметров крови агрегационное состояние тромбоцитов и эритроцитов играет ведущую роль. При повреждении эндотелия сосудов различной этиологии происходит формирование тромба и вследствие этого – критическое сужение просвета сосуда или его полное закрытие (частичная или полная окклюзия) [1,9].

В качестве тромболитиков и средств профилактики тромбообразования в настоящее время применяются лекарственные средства, оказывающие влияние на разные звенья системы гемостаза как раздельно, так и в различных сочетаниях [5,7].

Наиболее широко используемым антиагрегантом продолжает оставаться аспирин, блокирующий циклоксигеназный путь активации тромбоцитов. Несмотря на то, что с открытием различных механизмов активации тромбоцитов и их агрегации в последние годы начали внедряться антиагреганты с другими, отличными от аспирина механизмами действия, ни один из них практически не может его заменить, либо из-за серьезных побочных эффектов, либо в связи с чрезвычайно высокой стоимостью.

Наряду с многими положительными качествами, касающимися эффективности, доступности по цене, возможности в большинстве случаев достаточно продолжительного применения, аспирин имеет и ряд существенных недостатков. К числу последних относится способность аспирина подавлять репаративные процессы в слизистых оболочках, в частности, в слизистой оболочке желудка, и, как следствие, возникновение эрозии и язвы. Кроме того, АСК угнетает антиагрегационную активность сосудистой стенки [3,4].

cardiomagnyl, manifested by a decrease in blood coagulation potential, a decrease in fibrinogen content and an increase in blood clotting time (APTT).

Conclusion. *A pronounced antithrombotic effect of the drug GLAS has been proven, which is manifested by changes in blood plasma hemostasis parameters.*

Keywords: *glycyrrhizic acid monoammonium salt, acetylsalicylic acid, hemostasis, pulmonary artery thrombosis, adrenaline, collagen, antithrombotic effect.*

В настоящее время оптимальным решением этой проблемы считается применение кишечнорастворимых форм АСК (Аспирин Кардио, Кардиомагнл, Тромбопол и др.), снижающих побочное действие АСК на желудочно-кишечный тракт. В связи с этим, весьма актуальным является создание эффективных и достаточно безопасных антиагрегантов для широкого применения, в частности, для использования в качестве средств профилактики тромбообразования.

Известно, что в патогенезе многих, заболеваний нарушения в системе гемостаза сочетаются с изменениями в сосудистой стенке (8). Взаимосвязь и взаимозависимость этих изменений обуславливают усиление патологического процесса с развитием тяжелых осложнений. Поэтому в лечении такого рода патологии необходимо применение как средств, корректирующих гемостаз, так и оказывающих нормализующее влияние на эндотелиальные клетки сосудов. В ранее проведенных исследованиях нами было показано, что супрамолекулярный комплекс ГЛАС, состоящий из АСК и моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты (глицерам), обладает выраженным антиагрегантным и антиоксидантным свойствами [2,6].

Целью настоящего исследования явилось изучение антитромботического действия ГЛАС на модели острой тромбоэмболии, индуцированной коллагеном/адреналином.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение антитромботического эффекта препарата ГЛАС проведено на белых беспородных мышцах-самцах половозрелого возраста массой 20-22 г с использованием модели генерализованного коллаген-адреналинового тромбоза по методу DiMinnoG. и др. [10]. Для создания модели легочного тромбоза в хвостовую вену мышцей вводили смесь растворов коллагена и адреналина (0,5 мг/кг и 0,06 мг/кг соответственно) в течении 10 сек. Контрольная группа животных получала растворитель в том же объеме. За 2 часа до введения тромботического агента мышам внутривенно вводили ГЛАС в дозе 5,0 мг/кг и препа-

раты сравнения, в качестве которых были выбраны: глицерам в дозе 10 мг/кг, кардиомагнил в дозе 15 мг/кг. В качестве критерия образования тромбов фиксировали количество погибших животных, проводили макроскопический осмотр легких погибших и выживших мышей через сутки после введения тромботического агента и исследуемых препаратов. Для изучения антитромботической активности выживших животных забивали декапитацией и забирали капельно кровь в эпиндорфы без стабилизатора по 50 мкл. Исследовали также показатели плазменного гемостаза: протромбиновое время (ПВ), сек, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), сек, рекальцификация плазмы (РП), сек, фибриноген (Ф) с помощью наборов фирмы CYPRESS DIAGNOSTICS, Бельгия, г/дл. на коагулометре HumaClot Junior – Одноканальный коагулометр – HUMAN GmbH, Германия.

Для определения антитромботической активности [12] свежие тромбы (50 мкл) заливали 0,5 мл физ. раствором и ставили в термостат при 37°C. Через 1 час измеряли антитромботическую активность по развитию окраски, о которой судили по адсорбции супернатанта (сгусток + физ. раствор) на спектрофотометре (марка METASH UV-5100) при 410 нм. и температуре 22-24°C (АА = окраска супернатанта опыта/окраска супернатанта контроля). После инкубации повторно образовавшийся сгусток взвешивали. Плотность сгустка представлялась как масса оставшегося сгустка в мг. Ингибирование или инду-

цирование сгустка (ИС) рассчитывали следующим образом: СИС (%) = (масса сгустка у контроля – масса сгустка опыта) / (массу сгустка контроля) x 100.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены результаты влияния введения смеси коллагена и адреналина на выживаемость мышей. В группе контрольных животных наблюдалась гибель примерно 90% мышей. При этом были отмечены характерные признаки нарушения дыхательной функции легких: наблюдалось увеличение частоты и поверхностный характер дыхания, выраженный экзофтальм, и изменение цвета радужной оболочки. Также наблюдался парез задних конечностей: мыши не двигались даже в ответ на толчки, не были способны отдергивать задние лапы при сильном нажатии. Визуально наблюдались тетанические судороги, животные принимали характерную позу, при которой задние лапы были выпрямлены и отведены назад. В течение 15 минут мин после введения тромботических агентов животные погибали от удушья.

При предварительном, за 2 часа до введения тромбогенных агентов профилактическом введении препаратов ГЛАС, Глицирам и Кардиомагнила количество погибших животных составляло по сравнению с контролем 30, 40 и 40% соответственно. Остальные животные пережили тромботическую провокацию, вызванную смесью коллаген/адреналин.

Таблица 1

Количество погибших животных через 24 часа после введения ГЛАС, Глицирама и Кардиомагнила у мышей с моделью легочного тромбоза (M±m, n=5)

Варианты эксперимента	Дозы, мг/кг	Вес жив., г	Количество животных		
			Взяты в эксперимент	Погибшие	
				шт.	%
интактные	-	20±0,2	10	0	0
Контрольные К)		20±0,2	10	9	90
К+ГЛАС	5	20±0,2	10	3	30
К+Глицирам	10	20±0,2	10	4	40
К+Кардиомагнил	15	20±0,2	10	4	40

Как видно из представленных данных таб.1 ГЛАС в изученной дозе предотвращал гибель 70 % животных, двигательная активность которых полностью восстанавливалась через 1,0-2,5 мин. Остальные 30% животных, которые погибли в результате эксперимента при визуальном наблюдении, были более активны, наблюдалось уменьшение выраженности двигательных нарушений, при этом внешние проявления генерализованного тромбоза развивались постепенно (в течение 3-5 мин) в отличие от контрольной группы. Действие тромбогенных агентов в группах мышей на фоне кардиомагнила и глицирама было аналогично.

В следующей серии исследований проводили определение антитромботической активности изучаемых препаратов (таблица 2). В контрольной группе животных окраска супернатанта снизилась

на 17% по отношению к интактной группе животных. В опытных группах животных на фоне препарата ГЛАС окраска супернатанта увеличилась на 100%, на фоне препарата Глицирам на 73% и на фоне Кардиомагнила на 67% по отношению к контролю. Антитромботическая активность в контроле составляла 0,83, при введении препаратов ГЛАС, Глицирама и Кардиомагнила антитромботическая активность увеличилась и стала равной соответственно 2,0, 1,44 и 1,34.

В контрольной группе животных под влиянием тромбогенных агентов произошло индуцирование тромба на +70 %. На фоне исследуемых препаратов по отношению к контрольной группе животных наблюдалось ингибирование сгустка (на -60,9% под влиянием ГЛАС, на 59,8 % глицирама и -41,3% кар-

Антитромботическая активность через 24 часа после введения ГЛАС, Глицирама и Кардиомагнила у мышей с моделью легочного тромбоза (M±m, n=5)

Тесты	Интакт	Контроль	ГЛАС 5 мг/кг	Глицирам 10мг/кг	Кардиомагнил 15 мг/кг
Адсорбция супернатанта 410 нм, о.е.	0,640±0,05	0,533±0,046*	1,07±0,102* **	0,924±0,072* **	0,889±0,062* **
Антитромботическая активность, о.е.		0,83	2,00	1,73	1,67
Вес сгустка, мг	16,0±1,6	27,1±0,22*	10,6±1,0* **	10,9±1,0* **	15,9±1,3 * **
Индукция или ингибирование сгустка, %		+ 70	-60,9	-59,8	-41,3

Примечание: *p<0,01 по отношению к интактной группе; **p<0,01 по отношению к контрольной группе; то же в таблице 3.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что все изученные соединения, введенные в организм экспериментальных животных за 2 часа до введения тромботического агента, проявляют антитромботическое действие. Среди изученных препаратов наибольшим антитромботическим действием обладал ГЛАС.

При изучении антикоагулянтной активности исследованных препаратов (таблица 3) было установлено, что состояние плазменного гемостаза при действии изученных препаратов не вызывало достоверного изменения ПВ. Показано, что через 24 часа после введения тромботического агента в контрольной группе животных АЧТВ уменьшилось на 35%. На фоне введенных препаратов ГЛАС, Глицирама и Кардиомагнила в 2,0; 1,4 и 2,3 раза соответственно. По сравнению с контролем. Время рекальцификации плазмы (РП) в контрольной группе сократилось в 1,46 раза по отношению к интактной группе (56,4±3,6 сек.) введение исследованных препаратов увеличивало время рекальцификации плазмы в 6,0, 3,3 и 5,5

раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Содержание фибриногена (Ф) в контрольной группе увеличилось в 1,49 раза по отношению к интактным животным. Все исследованные препараты достоверно снижали содержание этого показателя. Эти результаты указывают, что применение всех препаратов способствует уменьшению коагуляционного потенциала крови, которое проявлялось снижением уровня фибриногена с 604,6±44 до 175,7±15 г/дл (p<0,05), увеличением времени свертывания крови и АЧТВ, причем выраженным антикоагулянтным действием обладает ГЛАС.

Таким образом, оценка состояния плазменного гемостаза показала, что исследуемые препараты не увеличивали тромбопластиновое время, но удлиняли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), что указывает на некоторое ингибирование гемостатических реакций по внутреннему пути возможно, из-за снижения факторов свертывания крови, таких как VIII, IX, XI, XII, Ф и vWF.

Коагулограмма через 24 часа после введения препаратов ГЛАС, Глицирам и Кардиомагнил мышей с моделью легочного тромбоза (M±m, n=5)

Тесты	Интакт	Контроль	ГЛАС 5 мг/кг	Глицирам 10мг/кг	Кардиомагнил 15 мг/кг
Протромбиновое время, (ПВ), сек	9,4±1,0	9,3±1,0	10,0±1,0	10,5±1,0	9,7±0,8
АЧТВ, сек	35,3±2,0	23,1±4,2*	56,2±4,4 * **	74,0±6,6 * **	123,4±11,1* **
Рекальцификация плазмы, сек	56,4±3,6	38,5±2,6*	164,6±13,0* **	128,9±11,0* **	112,7±18,0* **
Фибриноген, мг/дл	405,8±34,0	604,6±44,0*	275,7±15,0 * **	233,3±20,0* **	265,3±21,0 * **

Примечание: *p<0,01 по отношению к интактной группе; **p<0,01 по отношению к контрольной группе

Полученные результаты коагулограммы позволяют предположить, что антитромботическое действие препарата ГЛАС направлено против образования фибринового сгустка, опосредуется подавлением активности прокоагулянтных протеаз при взаимодействии между фибриногеном и тромбином, а также ингибированием активации тромбоцитов, поскольку

в состав препарата входит АСК и Глицирам, последний по данным литературы [11,13] является ингибитором тромбина, а в наших исследованиях проявил выраженную антитромботическую активность. Полученные результаты исследований *in vivo* и *ex vivo* на модели адреналин-коллагенового легочного тромбоза, проливают свет на механизмы, лежащие

в основе антитромботического действия препарата ГЛАС.

Таким образом, изучение антитромботической активности препарата ГЛАС имеет важное значение для разработки новых антиагрегантных и антитромбогенных лекарственных средств, применяющихся в терапии состояний, сопровождающихся повышенным тромбогенным состоянием крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айнетдинова Д.Х., Удовиченко А.Е., Сулимов В.А. Роль антитромбоцитарной терапии в первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний // Эффективная фармакотерапия в кардиологии и ангиологии. – 2007. – №2. – С. 36–41.
2. Далимова С.Н., Юнусова М.Х., Умарова Г.Б., Кузиев Ш.Н. Мухамаджанова Г.М., Зиямухамедова С.А., Хамроев С.Х. Изучение кардиопротекторных свойств препарата, созданного на основе местного растительного сырья // Журнал теоретической и клинической медицины. 2020, №1 - С. 6-9 ISSN 2091-5853
3. Кудряшова О.Ю., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Генетические основы индивидуальной чувствительности к антитромбоцитарным препаратам // Кардиология – 2005. – № 9. – Т.45. – С. 85–89.
4. Ушкалова Е.А. Аспиринорезистентность: механизмы развития, методы определения и клиническое значение // Фарматека. – 2006. – № 13 (128). – С. 35 – 41.
5. Шалаев С.В. Антитромбоцитарные средства в лечение острых коронарных синдромов // Фарматека.– 2003.– № 312.– С. 94–97.
6. Юнусова М.Х., Позиллов М.К., Далимова С.Н., Кузиев Ш.Н., Умарова Г.Б., Мухамаджанова Г.М., Гафуров М.Б., Хамроев С.Х., Хамдамова Н.А., Дадахоннова М.Б., Мухамедова М.Дж. Изучение влияния супрамолекулярных комплексов на процессы перекисного окисления липидов и активность митохондриальных ферментов клеток сердечной мышцы при экспериментальном миокардите // Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. – С. 38-44
7. Antithrombotic Trialists Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients // BMJ.– 2002.– V. 324.– P. 71–86
8. Bauer, E.M. Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation / E.M. Bauer et al // Cardiovasc Res. – 2010. – № 88. – P. 471-481.
9. Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, Ortel TL. Venous thromboembolism: a public health concern. Am J Prev Med. 2010;38(4 Suppl): S495-S501.
10. DiMinno G.S. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol / G.S. DiMinno // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1983. - V. 225. - P. 57-60
11. Selyutina, O. Y., & Polyakov, N. E. /Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier—from physicochemical properties to biomedical applications: a modern insight on the ancient drug.// International journal of pharmaceutics.- 2019- V.559. P.271–279
12. Jun-Hui Choi,1 Kyung-Je Kim,2 and Seung Kim1 / Comparative Effect of Quercetin and Quercetin-3-O-β-d-Glucoside on Fibrin Polymers, Blood Clots, and in Rodent Models//biochem molecular toxicology- V. 30, 11, 2016 548-558.
13. Nakata N., Kira Y., Yabunaka Y., Takaoka K. Prevention of venous thrombosis by preoperative glycyrrhizin infusion in a rat model. J Orthop Sci. 2008;13(5):456–462.