

УДК 547.398 + 547.583

***ВЛИЯНИЕ АЦИЛГИДРАЗИДОВ 1, 4-ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА  
СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ***

***Колотова Н.В.***

*к.х.н., доцент,*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Пермская  
государственная фармацевтическая академия» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
г. Пермь, Россия.*

***Старкова А.В.***

*д. м. н., доцент,*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Пермская  
государственная фармацевтическая академия» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
г. Пермь, Россия.*

**Аннотация**

Исследовано влияние 11 ацилгидразидов 1, 4-дикарбонных кислот и соли гидразида на гемостаз на коагулометре «АПГ4-02-П». Опыты проводили на цитратной (3,8%) крови (9:1) кроликов. Для определения активности в кювету помещали 50 мкл крови и добавляли 50 мкл 0,2% раствора исследуемого соединения. В контроль, вместо вещества, вносили 50 мкл изотонического раствора хлорида натрия. Препаратом сравнения служили 50 мкл гепарина в концентрации 1 ЕД/мл крови или 50 мкл раствора препарата «Этамзилат» в концентрации 0,2%. Степень влияния соединений на гемостаз определяли по изменению времени свертывания цитратной крови в контроле и опыте. Из 12

исследованных соединений шесть веществ оказывают влияние на гемостаз. Активность соли гидразида превышает действие этамзилата в 1,3 раза. Ацилгидразиды 1, 4-дикарбоновых кислот оказывают разнонаправленное действие на гемостаз в зависимости от природы кислотного и гидразидного фрагментов соединений.

**Ключевые слова:** ацилгидразиды 1, 4-дикарбоновых кислот, антикоагулянтная и гемостатическая активности.

### ***EFFECT OF ACYLHYDRAZIDES 1, 4-DICARBOXYLIC ACIDS ON BLOOD COAGULATION IN ANIMALS***

***Kolotova N.V.***

*Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor,*

*Federal State Budgetary Institution Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation,*

*Perm, Russia.*

***Starkova A.V.***

*Doctor of Medical Sciences, Associate Professor,*

*Federal State Budgetary Institution Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation,*

*Perm, Russia.*

#### **Abstract.**

The effect of 11 acylhydrazides of 1,4-dicarboxylic acids and a hydrazide salt on hemostasis was studied using an APG4-02-P coagulometer. The experiments were performed on citrated (3.8%) blood (9: 1) rabbits. To determine the activity, 50 µl of blood was placed in the cuvette and 50 µl of a 0.2% solution of the test compound was added. In the control, instead of the substance, 50 µl of isotonic sodium chloride

solution was added. As the reference preparation, 50 µl of heparin was used at a concentration of 1 U / ml of blood or 50 µl of a solution of the preparation "Etamsilat" at a concentration of 0.2%. The degree of influence of the compounds on hemostasis was determined by the change in the clotting time of citrated blood in the control and experiment. Of the 12 compounds studied, six substances have an effect on hemostasis. The activity of the hydrazide salt exceeds the action of etamsilate by 1.3 times. Acylhydrazides of 1,4-dicarboxylic acids have a multidirectional effect on hemostasis, depending on the nature of the acid and hydrazide fragments of the compounds.

**Keywords:** acylhydrazides of 1, 4-dicarboxylic acids, direct anticoagulant and hemostatic activity.

Коррекция системы гемостаза имеет большое значение в медицинской практике. Лекарственные препараты, влияющие на гемостаз, применяют в терапии, хирургии, травматологии, онкологии и акушерстве. Однако, все используемые в медицинской практике препараты, влияющие на гемостаз, имеют целый ряд побочных реакций.

Антикоагулянты могут вызывать тромбоз после отмены препарата, приводят к развитию тромбоцитопении и геморрагических осложнений [1- 4]. Современные прямые антикоагулянты для приёма per os имеют целый ряд преимуществ перед пероральными непрямыми антикоагулянтами-антагонистами витамина К [5, 6], но многие из них пока мало доступны для широкого применения в связи с их высокой стоимостью.

Профилактика и остановка кровотечений имеют важнейшее значение в гематологии, хирургии, травматологии, онкологии и акушерстве, поскольку для прекращения серьезных кровотечений необходимо применение гемостатических средств, которые также обладают рядом недостатков, ограничивающих их применение [7,8].

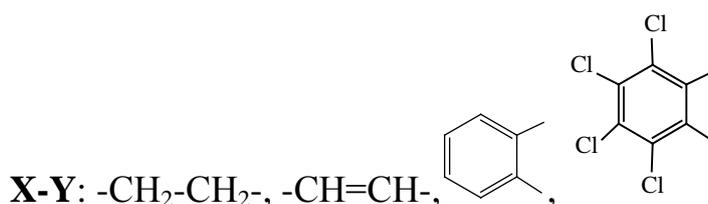
Поиск антикоагулянтов прямого действия и гемостатиков среди монозамещенных гидразидов 1, 4-дикарбоновых кислот является перспективным, так как известно, что некоторые гидразиды 1, 4-дикарбоновых кислот обладают высокой антикоагулянтной и гемостатической активностью [9-13]. Кроме того, 1, 4-дикарбоновые кислоты и многие их производные обладают низкой токсичностью, что объясняется их расщеплением в организме на пировиноградную, бензойную, щавелевую и другие органические кислоты, являющиеся естественными метаболитами нормального обмена веществ. Структура этих соединений обуславливает широкие синтетические возможности. Они отличаются высокой реакционной способностью и разнообразием химических превращений, что позволяет получать широкий спектр разнообразных соединений, обладающих биологической активностью.

Целью нашего исследования является дальнейшее изучение влияния на гемостаз монозамещенных гидразидов 1, 4-дикарбоновых кислот, полученных на кафедре аналитической химии ПГФА, а также выявление зависимости «биологическое действие - структура соединений».

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** Объектами изучения биологической активности явились монозамещенные ацилгидразиды янтарной, малеиновой, фталевой, тетрахлорфталевой кислот и соль 4-аминобензоилгидразида янтарной кислоты. Общая формула исследованных соединений:



где



**R:** ацил-CONHNH- (**ацил:** алифатические, ароматические и гетероциклический заместители, табл.)

**R<sup>1</sup>:** Н, К

Оценка биологической активности в экспериментах на животных осуществлялась в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ: приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт (GLP)) [14], «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А.Н. Миронова [15], Межгосударственный стандарт ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986).

План и протоколы экспериментальных исследований прошли экспертизу на соответствие действующим нормативно-правовым требованиям в области использования лабораторных животных и биологического материала на заседании этического комитета при ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава РФ, протокол № 02/19-о от 30.12. 2019 года.

Для исследования использовались половозрелые кролики «шиншилла», в возрасте 3-4 месяца, массой 3,5 – 4,5 кг, полученные из питомника «Андреевка» Московской области. На всех животных имеются сертификаты и ветеринарные свидетельства. Животные содержались на стандартном пищевом режиме в типовом виварии.

Влияние соединений на гемостаз определялось по действию веществ на изменение времени свертывания крови. Исследования проводили на кафедре физиологии ПГФА с использованием коагулометра «АПГ4-02-П».

Использовалась цитратная (3,8%) кровь кроликов в отношении 9:1. При определении активности исследуемых соединений в кювету помещали 50 мкл крови кроликов и 50 мкл 0,2% раствора исследуемого вещества, в контроле вместо изучаемых соединений добавляли 50 мкл изотонического раствора

хлорида натрия. Препаратами сравнения являлись 50 мкл гепарина (гепарин натрия, раствор для инъекций 5000 МЕ/мл, ОАО «Синтез Россия) в концентрации 1 ЕД/мл крови или 50 мкл раствора препарата «Этамзилат» (дицинон, раствор для инъекций 250 мг/2 мл производитель Лек д.д. Словения) в концентрации 0,2%. Инкубация растворов продолжалась 60 сек, затем добавляли 50 мкл 1% раствора хлорида кальция (Технология-стандарт, Россия), после чего измеряли время свертывания крови.

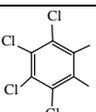
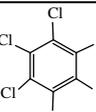
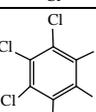
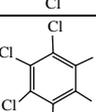
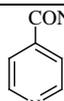
Результаты исследования обработаны способом вариационной статистики по методу Фишера-Стьюдента с помощью программы статистической обработки StatBase [16] и приведены в таблице 1.

Из представленных в таблице 1 результатов исследования видно, что из 12 производных 1, 4-дикарбоновых кислот шесть соединений (2, 4, 5, 6, 7 и 11) оказывают влияние на гемостаз.

Соединения 4, 6, и 11 проявили прямое антикоагулянтное действие. Для соединений 2, 5 и 7 характерен гемостатический эффект. Активность калиевой соли 4-аминобензоилгидразида янтарной кислоты (соединение 2) превышает действие этамзилата в 1,3 раза, кальциевая соль также обладает данной активностью, тогда как натриевая и аммониевая соли неактивны, а 4-аминобензоилгидразид янтарной кислоты обладает антикоагулянтным действием [9]. Гемостатическим эффектом обладают 4-аминобензоилгидразиды фталевой [10], цитраконовой, тетрахлорфталевой кислот [11, 13] и кальциевая соль 4-аминобензоилгидразида малеиновой кислоты [9].

Таблица 1 - Влияние ацилгидразидов 1, 4-дикарбоновых кислот на время свертывания крови животных.

| № п/п | X-Y                                 | R1  | R2 | Время свертывания, с контроль | Время свертывания, с опыт | % изменения свертываемости | Количество животных | p                |
|-------|-------------------------------------|---|----|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|------------------|
| 1     | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub> CO(NH) <sub>2</sub>  | H  | 124,1±2,74                    | 135,7±5,63                | -9,3                       | 10                  | >0,05            |
| 2     | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - | 4-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO(NH) <sub>2</sub> | K  | <b>122,3±1,81</b>             | <b>95,7±2,46</b>          | <b>+21,7</b>               | <b>10</b>           | <b>&lt;0,001</b> |
| 3     | -CH=CH-                             | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub> CO(NH) <sub>2</sub>  | H  | 135,7±3,97                    | 147,1±5,39                | -8,4                       | 10                  | >0,05            |

|         |   |   |   |                   |                    |               |           |                  |
|---------|---|---|---|-------------------|--------------------|---------------|-----------|------------------|
| 4       | -CH=CH-   | 4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO(NH) <sub>2</sub>               | H | <b>125,7±3,97</b> | <b>149,0±5,15</b>  | <b>-18,5</b>  | <b>10</b> | <b>&lt;0,01</b>  |
| 5       | CH=CH   | 2-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO(NH) <sub>2</sub>               | H | <b>129,8±3,31</b> | <b>110,4±2,17</b>  | <b>+14,9</b>  | <b>10</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| 6       | CH=CH   | 3-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO(NH) <sub>2</sub>               | H | <b>137,9±3,25</b> | <b>154,3±4,45</b>  | <b>-11,9</b>  | <b>10</b> | <b>&lt;0,05</b>  |
| 7       |  | 3-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO(NH) <sub>2</sub>               | H | <b>148,3±3,52</b> | <b>134,4±3,08</b>  | <b>+9,4</b>   | <b>10</b> | <b>&lt;0,02</b>  |
| 8       |  | 4-<br>CH <sub>3</sub> CONHC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO(NH) <sub>2</sub>       | H | 131,9±2,74        | 133,0±4,80         | -0,8          | 10        | >0,05            |
| 9       |  | CH <sub>3</sub> CONHNH  | H | 126,8±3,54        | 127,1±6,65         | -0,2          | 10        | >0,05            |
| 10      |  | CF <sub>3</sub> CONHNH  | H | 108,6±3,77        | 115,2±6,65         | -6,1          | 10        | >0,05            |
| 11      |  | 3-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH                            | H | <b>126,0±2,69</b> | <b>135,8±3,42</b>  | <b>-7,8</b>   | <b>10</b> | <b>&lt;0,05</b>  |
| 12      |  |  | H | 123,4±5,20        | 132,5±6,96         | -7,4          | 10        | >0,05            |
| Эталоны | Гепарин   |   |   | <b>145,7±9,64</b> | <b>618,3±55,88</b> | <b>-324,4</b> | <b>10</b> | <b>&lt;0,001</b> |
|         | Этамзилат   |   |   | <b>144,1±7,83</b> | <b>121,0±7,20</b>  | <b>+16</b>    | <b>10</b> | <b>&lt;0,05</b>  |

р по отношению к контролю

В то же время есть данные, что 4-аминобензоилгидразиды итаконовой и диметилмалеиновой кислоты, калиевая, аммониевая и кальциевая соли 4-аминобензоилгидразидов фталевой кислоты неактивны [11, 12].

Положение аминогруппы в бензольном кольце гидразидов малеиновой кислоты (соединения 5 и 6) оказывает влияние на гемостаз. Так 2-аминобензоилгидразид малеиновой кислоты (соединение 5) проявляет гемостатическое действие аналогичное активности этамзилата, а перенос аминогруппы в положение 3 (соединение 6) приводит к появлению антикоагулянтной активности. Известно, что 2-аминобензоилгидразид и кальциевая соль гидразида янтарной кислоты обладают гемостатическим действием [9], тогда как для кальциевой и магниевой соли 2-

аминобензоилгидразида фталевой кислоты характерен антикоагулянтный эффект, а калиевая и натриевая соли неактивны [12].

3-Нитробензоилгидразид тетрахлорфталевой кислоты (соединение 11) проявил антикоагулянтную активность, такое же производное янтарной кислоты неактивно [9].

Изоникотиноилгидразид тетрахлорфталевой кислоты (соединение 12) не оказывает статистически достоверного влияния на гемостаз, в то же время известно, что аналогичные гидразиды фталевой и янтарной кислот проявляют антикоагулянтное действие, гидразиды итаконовой, малеиновой и диметилмалеиновой кислот неактивны [9, 11-13], а для изоникотиноилгидразида цитраконовой кислоты обнаружено гемостатическое действие, превышающее активность этамзилата [13].

Феноксиацетилгидразиды янтарной и малеиновой кислот (соединения 1 и 3) не оказывают влияния на гемостаз, тогда как такой же гидразид тетрахлорфталевой кислоты обладает значительным гемостатическим действием [12].

Ацетилгидразид- и трифторацетилгидразид тетрахлорфталевой кислоты (соединения 9 и 10) не оказывают влияния на гемостаз, но известно, что такие гидразиды янтарной, малеиновой, цитраконовой и фталевой кислот оказывают разнонаправленные действия на свертываемость крови [9, 10, 12, 13].

Выводы.

1. Ацилгидразиды 1, 4-дикарбоновых кислот оказывают разнонаправленное действие на гемостаз в зависимости от природы кислотного и гидразидного фрагментов соединений.
2. Среди исследуемых веществ обнаружено соединение, гемостатический эффект которого превышает действие этамзилата.
3. Перспективным является дальнейшее исследование влияния структуры ацилгидразидов 1,4-дикарбоновых кислот на гемостаз.

**Библиографический список:**

1. Blommel M.L., Blommel A.L. // Am. J. Health Syst. Pharm. -2011.-Vol. 68 (16). - pp. 1506 – 1519.
2. Mak K.-H. // European heart journal. -2011. -Vol. 32. -pp. 20-22.
3. Alam Hasan B., Chen Z., Miller D. // Ibid. -2004. -Vol.56 (5).-pp. 974–983.
4. Р.М. Тихилов, Ю.М. Стойко, М.Н. Замятин и др. Профилактика тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии: Методические рекомендации / Под ред. акад. РАМН Ю.Л. Шевченко. – М., 2006. 20 с.[R.M. Tikhilov, Yu.M. Stoyko, M.N. Zamyatin et al. Prevention of thromboembolic complications in traumatology and orthopedics: Guidelines/Ed. Academy RAMS Yu.L. Shevchenko. - M., 2006. 20 s.].
5. Krahn A.D., Skanes A.C. et al. Values and Preferences of Physicians and Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation Who Receive Oral Anticoagulation Therapy for Stroke Prevention. Can. J. Cardiol. 2016 Jun.;32(6):747-53.
6. Battistoni et al. Reducing Cardiovascular and Cancer Risk: How to Address Global Primary Prevention in Clinical Practice. Clin. Cardiol. 2015 Jun.;38(6):387-94.
7. Бояринцев В.В., Назаров В.Б., Фрончек Э.В. и др. Доклиническая оценка эффективности местных гемостатических препаратов (экспериментальное исследование) // Медицина катастроф. -2010. -№3.-С.23-25. [Boyarintsev V.V., Nazarov V.B., Fronchek E.V., Samoilov A.S., Yudin A.B., Kovalenko R.A.//Disaster Medicine. -2010. - N. 3.-P.23-25].
8. Pusateri A., Mc. Carthy S., Gregory K. // Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care. -2003. -Vol.54.- pp. 177–182.
9. Сыропятов Б.Я., Колотова Н.В., Долженко А.В. Влияние на гемостаз производных янтарной и малеиновой кислот //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. -2012. -№5. - С.31-36. [Syropyatov B.Ya., Kolotova N.V., Dolzhenko A.V. Influence on hemostasis of derivatives of

succinic and maleic acids. // Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry. -2012. -№5. - S.31-36.].

10. Колотова Н.В., Старкова А.В. Влияние ряда производных 1, 4-дикарбоновых кислот на время свертывания крови // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.-2020.-№4 (30).-С.43-47.[Kolotova N.V., Starkova A.V. Influence of a number of derivatives of 1, 4-dicarboxylic acids on the time of blood coagulation//Issues of drug quality assurance -2020.- No. 4 (30) .-P.43-47].

11. Старкова А.В. Поиск и изучение новых антикоагулянтов прямого действия: дис. ... док. мед. наук: 14.03.06 / Старкова А.В. – Челябинск, 2020. -186 с.

12. Сыропятов Б.Я., Колотова Н.В. Влияние на гемостаз производных фталевых кислот //Сб.: «Инновации в науке»: м-лы XVIмеждунар. заоч. науч.-практ. конф. (28 января 2013 г.). с. 139 -147. [Syropyatov B.Ya., Kolotova N.V. Influence on the hemostasis of phthalic acid derivatives//Sat.: "Innovations in Science": mLxviInternational. zaoch. scientific-practical. conf. (January 28, 2013). from. 139 -147.].

13. Сыропятов Б.Я., Колотова Н.В. Влияние производных цитраконовой кислоты на гемостаз //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии- 2015. -№6. - С.54-56. [Syropyatov B.Ya., Kolotova N.V. Effect of citraconic acid derivatives on hemostasis // Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry - 2015.- No. 6.- S.54-56.].

14. ESC Clinical Practice Guidelines. CVD prevention in clinical practice. Eur. Heart J. (2016);37:2315–2381.

15. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Москва, Гриф и К, 2012, ч.1. 197с. [Mironov A.N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Moscow, Grif & K, 2012, part 1. 197s.].

16. Прозоровский В.В. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. //Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7. Вып. 3-4. С. 2090-2120. [Prozorovsky V.V.//Psychopharmacology and biological narcology. 2007. VOL. 7. No. 3-4. S. 2090-2120.].

*Оригинальность 83%*