

УСКОВ ГЕОРГИЙ МИХАЙЛОВИЧ

**АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Кучерявенко Аида Фатиховна

Официальные оппоненты:

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ, доктор медицинских наук, профессор

Покровский Михаил Владимирович

Заведующий отделом нейрофармакологии имени академика РАМН С.В. Аничкова ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", профессор кафедры фармакологии Российской Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ; доктор медицинских наук, профессор

Шабанов Петр Дмитриевич

Ведущее учреждение: «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и с авторефератом на сайтах: www.volgmed.ru, www.vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Венозные тромбоэмболические осложнения на протяжении длительного времени остаются актуальной проблемой, которая затрагивает врачей всех специальностей (Бокерия Л.А., 2009; Петров В.И., 2014; Heit J.A., 2015). В России тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) становится фатальной (Шелковникова Т.В., 2019). Как писала Родюкова И.С. в своей статье очень часто венозные тромбозы ничем не проявляются в течение длительного времени, что не дает возможности оценить их истинную встречаемость (Родюкова И.С., 2011; Taher A.T., 2018). Высокая распространенность венозных тромбозов связана с возрастающим числом оперативных вмешательств, расширением их объема и продолжительности, ортопедических операций на нижних конечностях по замене суставов, онкологических, аутоиммунных заболеваний, хронической сердечной недостаточностью, а также вирусными и бактериальными инфекциями и др. (Kafeza M., 2017; Afzal A., 2020; Katneni U.K., 2020; Kitano D., 2021). Частым осложнением протекания вирусных и бактериальных инфекций является гиперцитокинемия, связанная с выраженной реакцией иммунной системы, которая характеризуется высвобождением фагоцитарными клетками различных воспалительных цитокинов и химических медиаторов (Katneni U.K., 2020). Данное состояние вызывает повреждение эндотелия легочных сосудов и нарушение всех его защитных функций, так как снижается выделение оксида азота и PGI₂ (простациклин), которое подавляет активацию и адгезию лейкоцитов. Генерация тромбина приводит к образованию фибрина, запуску тромбоцитов и эндотелиальных клеток через PAR-1 рецепторы, что вызывает увеличение количества фактора фон Виллебранда (VWF), усиливает воспаление, вызывая активацию P-селектина, так же инициирует запуск лейкоцитов и гладких мышц эндотелия (Mitchell W.B., 2020). Следовательно, системная дисфункция эндотелия и коагулопатия при вирусных и бактериальных инфекциях ассоциированы с повышением риска летального исхода (Klok F.A., 2020). Таким образом, профилактика тромбообразования занимает центральное место в современной клинической практике. Долгое время для длительной антитромботической терапии пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, а также другими заболеваниями, которые подразумевают постоянное применение антикоагулянтов, был варфарин (Witt D.M., 2016). Однако у него имеется ряд недостатков, которые требуют частого контроля уровня МНО (международное нормализованное отношение) для корректировки дозы. Поэтому, в настоящее время альтернативой применения варфарина являются новые оральные антикоагулянты (НОАКи). Преимущество их состоит в предсказуемом фармакокинетическом профиле, так как они имеют фиксированные дозы, что обуславливает отсутствие необходимости лабораторного контроля их антикоагулянтного эффекта (Lip G.H., 2020). Однако у НОАК также имеются недостатки, которые ограничивают их применение (желудочно-кишечные кровотечения, гастропатии, подкожные кровоизлияния) (Franco Moreno A.I., 2018). Согласно литературным данным соединения с гетероциклической структурой, а именно производные триазола являются

высокоэффективными корректорами коагулопатий. В виду этого, поиск новых соединений, проявляющих антикоагулянтную активность среди триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов, является более чем актуальным.

Тема диссертационной работы была утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (протоколом № 9 от 14.04.2021 г.) и включена в план НИР.

Степень разработанности проблемы.

Антикоагулянтная терапия занимает ведущую роль в вопросах профилактики венозных тромбозов и их осложнений (Kitano D., 2021). Среди средств для предотвращения данной патологии лидирующее место занимают прямые оральные антикоагулянты - ингибиторы IIa и Xa фактора. Оральные антикоагулянты демонстрируют сопоставимую эффективность и значительно более низкий риск кровотечений по сравнению с варфарином (Stanifer J.W., 2020). Однако новая серия антикоагулянтов имеет ряд недостатков, в том числе их низкую пероральную биодоступность и вероятность кровотечения при применении в больших дозах (Udayachalerm S., 2018), а также высокую стоимость данных препаратов (Ройтман Е., 2018). Терапия антикоагулянтными средствами требует особого внимания и своевременного предотвращения нежелательных эффектов, а также возможного повтора тромботических состояний.

Цель исследования. Выполнить поиск антикоагулянтных соединений среди новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов, изучение их механизма действия и антикоагулянтной активности без и в условиях гиперцитокинемии.

Задачи исследования.

1. Провести поиск в ряду новых конденсированных производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов соединений с антикоагулянтной активностью *in vitro* и *ex vivo*.
2. Провести анализ зависимости антикоагулянтной активности от структуры химических соединений в ряду новых конденсированных производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов.
3. Изучить антитромботическое действие активного соединения на различных моделях венозных тромбозов с проведением морфологических исследований *in vivo*.
4. Провести расширенное изучение механизма антикоагулянтного действия наиболее активного соединения.
5. Определить цитотоксичность и величину острой токсичности наиболее активного соединения и рассчитать его условный терапевтический индекс.
6. Изучить антикоагулянтное действие соединения-лидера *in vitro* и *in vivo* в условиях гиперцитокинемии, вызванной липополисахаридом.
7. Исследовать общетоксикологические свойства наиболее активного соединения по методу Irwin S.

Научная новизна исследования. Впервые было изучено влияние новых соединений из групп конденсированных производных ряда триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов на параметры коагулограммы *in vitro* и *ex vivo*. Методом подструктурного анализа изучена зависимость между структурами исследованных соединений, и их способностью ингибировать факторы коагуляционного гемостаза. Показано, что скаффолд [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина является более предпочтительным при поиске веществ с прямой антикоагулянтной активностью, чем скаффолд [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина.

Найдено и изучено новое соединение под шифром HC-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтные свойства *in vitro* и *ex vivo*. Впервые определена антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b на различных моделях венозных тромбозов. Впервые изучен механизм антикоагулянтного действия данного вещества, связанный с ингибированием тромбина. Впервые исследован антикоагулянтный эффект соединения HC-NAR-0273b на различных моделях в условиях гиперцитокинемии, вызванной липополисахаридом *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Результаты выявленной зависимости между антикоагулянтной активностью новых конденсированных производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и их химической структурой могут служить основой для направленного поиска новых антикоагулянтных соединений и дают возможность раскрыть аспекты их механизма действия на патогенетические компонент коагуляционного звена гемостаза. Впервые были получены экспериментальные данные об антитромботической активности соединения HC-NAR-0273b на моделях экспериментальных тромбозов (тромбоз бедренной вены крыс, индуцированный поверхностной аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа; тромбоз нижней полой вены; тромбин-индуцированный тромбоз легочных артерий с проведением морфологических исследований; тромбоз по методу Горога (GTT)). Установлен механизм антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b, связанный с ингибированием Па фактора свертывания (тромбин). В условиях системной воспалительной реакции выявлено усиление антикоагулянтной активности данного вещества, что может свидетельствовать о его влиянии на процессы иммунокоагуляции и, следовательно, внести значительный вклад в предотвращение тромбозов, ассоциированных с вирусными и бактериальными инфекциями.

Комплексное исследование фармакодинамических свойств вещества HC-NAR-0273b дает возможность провести фармакокинетические и токсикологические исследования с целью разработки инновационного лекарственного препарата для лечения состояний, сопровождающихся повышением тромбообразования без и в условиях гиперцитокинемии.

Методология и методы исследования. В работе использованы современные методические подходы, имеющиеся в ВолгГМУ. Исследования выполнены на кроликах-самцах

породы «Шиншилла», половозрелых самцах мышей и крыс. Антитромбогенные свойства НС-NAR-0273b исследованы в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению антикоагулянтной и антитромботической активности лекарственных средств (Макаров В.А. и др., 2012), с использованием соответствующих методов статистической обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина являются более предпочтительным классом при поиске веществ с прямой антикоагулянтной активностью, чем производные [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина.
2. Соединение НС-NAR-0273b (5,7-диметил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин) оказывает выраженную антитромбиновую активность *in vitro* и *ex vivo*.
3. Вещество НС-NAR-0273b оказывает антитромботическое действие на различных экспериментальных моделях венозных тромбозов: тромбозе нижней полой вены крыс, вызванном ее перевязкой, тромбозе бедренной вены крыс, индуцированного 50% хлоридом железа, тромбин-индуцированном тромбозе на мышах с проведением морфологических исследований, а также на модели тромбоза по Горогу.
4. Антикоагулянтное действие соединения НС-NAR-0273b связано с ингибированием тромбина (IIa фактора свертывания).

Внедрение результатов исследования. Экспериментальные данные по способности новых соединений ингибировать звенья коагуляционного звена гемостаза, а также анализ влияния различных заместителей на уровень антикоагулянтной активности в ряду новых конденсированных производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов используется при синтезе новых соединений в Институте Органического Синтеза Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург) и в Уральском федеральном университете (г. Екатеринбург). В работе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством при университете ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к изучению антикоагулянтной активности веществ.

Работа выполнена в рамках Гранта на исследования (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации, г. Москва, «1» октября 2020 г. № 075-15-2020-777).

Степень достоверности и апробация результатов. Диссертационная работа выполнена на основании исследований, проводимых на различных видах экспериментальных животных, таких как кролики, мыши и крысы. Результаты получены с высокой степенью достоверности. Для выполнения работы использованы современные методы исследования, проведенные на высокотехнологичном оборудовании, в соответствии с рекомендациями по поиску и доклиническому изучению потенциальных антикоагулянтных средств, а также соответствующих критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на конференции MedChem-Russia 2021; XXVI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области 2021; 79 и 80-й открытых научно-практических конференциях молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2021, 2022 гг.; на LXXXIII научно-практической конференции с международным участием, посвященная 125-летию юбилею ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины–2022».

По теме диссертации опубликовано 7 работ (из них 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ).

Личный вклад автора. Автором был проанализирован ряд научных работ отечественных и зарубежных ученых по изучаемой проблеме. Вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: планирование и проведение скрининга, изучение специфической фармакологической активности и механизма антикоагулянтного действия нового конденсированного производного триазоло[1,5-*a*]пиримидина – соединения HC-NAR-0273b. При написании диссертационной работы автором выполнен сбор первичных данных и их анализ, а также статистическая обработка полученных результатов, сформулированы выводы и оформлена рукопись.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 189 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 рисунком и 29 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2-7), обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 27 отечественных и 177 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен литературный обзор 27 отечественных и 177 зарубежных источников. Изложены современные представления о физиологии и патологии коагуляционного звена гемостаза, механизмах тромбообразования, а также последствиях тромботических осложнений. Описана эффективность и побочное действие известных групп антикоагулянтных препаратов, используемых в клинической практике. Представлены различные классы гетероциклических производных, оказывающих влияние на процессы коагуляции. Рассмотрены конденсированные производные триазолопиримидина и триазолотриазина, как потенциально активные вещества для коррекции коагуляционного гемостаза. Сформирована концепция исследования.

Во второй главе диссертации описаны материалы и методы исследования. Объектами исследования явились 42 новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидина и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина. Из них 33 соединения синтезированы в Уральском федеральном университете (г. Екатеринбург) и 9 соединений, синтезированы в институте органического синтеза Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург). Эксперименты были выполнены на 22 кроликах самцах породы "Шиншилла" массой 3,0-3,5 кг, 295 белых беспородных крысах самцах

массой 250,0-300,0 г, 140 белых половозрелых беспородных мышах самцах массой 20,0-25,0 г. Для животных были созданы стандартные условия в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (дата ввода в обращение 1 июля 2016 г.), постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». В виварии поддерживался температурный режим от +18 до +22°C.

Влияние новых соединений на параметры коагулограммы (АЧТВ, тромбиновое время, протромбиновое время) определяли на бедной тромбоцитами плазме крови кроликов *in vitro* и в крови крыс *ex vivo* без и в условиях гиперцитокинемии, с помощью хронометрического метода анализа, на гемокоагулометре «SOLAR» (Белоруссия). Препаратами сравнения были выбраны прямые оральные антикоагулянты дабигатрана этексилат и аписабан.

Статистическая оценка значимости влияния различных структурных параметров на уровень прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины была проведена методом подструктурного анализа¹. В результате на основе базовых структур соединений были сформированы скаффолды изучаемых производных, в которых были обобщены их структурные особенности (рисунок 1).

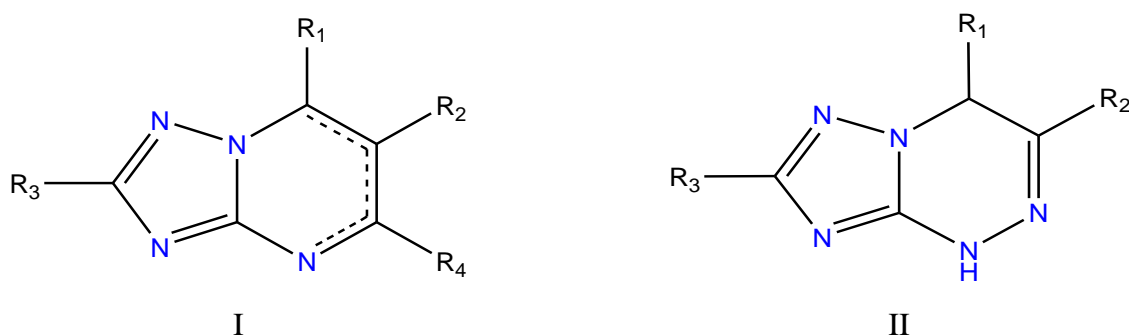


Рисунок 1 - Скаффолды новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина (I) и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины (II)

Изучение цитотоксичности проводили на клетках линии HepG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека), которые культивировались в культуральном флаконе в полной ростовой среде F-12 в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Инкубация тестируемых образцов проводилась в течение 48 ч. Результаты оценивали с использованием планшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan, Австрия). Показателем условной широты терапевтического действия служил условный терапевтический индекс (отношение CC₅₀ к IC₅₀).

Все исследования *in vivo* и *ex vivo* проводили через 2 часа после однократного внутривенного введения животным в дозе эквимолярной препарату сравнения дабигатрану

¹ Исследования были проведены совместно с д.б.н. П.М. Васильевым, за что выражаем благодарность.

этексилату. Для соединения-лидера она составила 5,5 мг/кг. Для расчета ED₅₀ антитромботической активности дозы увеличивали или уменьшали. Исследования проводили на крови животных, которую забирали из брюшной аорты крыс. При проведении данных опытов животных наркотизировали хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 400 мг/кг).

Исследование антикоагулянтной активности наиболее активных соединений проводили с использованием тромбоэластографа TEG 5000 (Haemostase Corp., США) на крови крыс.

Модель тромбоза нижней полой вены воспроизводили согласно методике Henke P.K. (2007) на белых беспородных крысах-самцах. Соединение HC-NAR-0273b вводили крысам в дозах 5,5; 2,5 и 1,25 мг/кг, а препарат сравнения дабигатрана этексилат – в дозах 12,0; 6,0 и 3,0 мг/кг. Оценку антитромботической активности проводили путем взвешивания изъятых тромбов через 24 часа.

Антитромботическую активность соединения-лидера HC-NAR-0273b исследовали на модели тромбоза бедренной вены крыс, индуцированной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) согласно методу Rettger C. (2005) с использованием ультразвукового аппарата «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург). Соединение HC-NAR-0273b и препарат сравнения вводили в вышеописанных дозах.

При моделировании тромбин-индуцированного тромбоза легких у мышей соединение HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилат вводили в дозах 13,0 и 27,0 мг/кг соответственно. С целью подтверждения наличия тромбов в просветах сосудов проводили морфологические исследование срезов легких².

Global Thrombosis Test (по Горогу) выполняли согласно методу Yamamoto J. (2003) на крови крыс *ex vivo*. Соединение HC-NAR-0273b и препарат сравнения дабигатрана этексилат вводили в дозах 5,5 мг/кг и 12,0 мг/кг соответственно. Полученную нестабилизированную кровь помещали в пробирку Горога без использования стабилизаторов и консервантов крови. В качестве критерия оценки антитромботического действия исследуемого соединения и препарата сравнения фиксировали время окклюзии и время лизиса при помощи программного обеспечения GTTDraw 2.3.

Определение ингибитора фактора Па с использованием хромогена S-2238 *ex vivo* выполняли на крови белых беспородных крысах самцах. Соединение HC-NAR-0273b вводили в дозах 2,5; 5,5 и 11 мг/кг, а препарат сравнения дабигатрана этексилат - в дозах 3,0; 6,0 и 12,0 мг/кг. Анализ выполняли согласно инструкции к набору «Ренапарин – плазма тест». Проводили оценку степени связывания исследуемых веществ с Па фактором.

Исследование влияния на количественный уровень Па фактора изучали на крысах-самцах методом иммуноферментного анализа с использованием набора ELISA Kit for Coagulation Factor II (F2), на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200. Соединение HC-NAR-

² Исследования были проведены совместно с д.м.н. А.В. Смирновым, за что выражаем благодарность.

0273b и дабигатрана этексилат вводили в эквимольных дозах. Пробоподготовку осуществляли согласно инструкции к набору. Проводили измерение уровня Па фактора в плазме интактных крыс контрольной и опытных групп.

Влияния соединения – лидера на разведенное тромбиновое время исследовали с помощью Hemoslot kit теста на бедной тромбоцитами плазме самцов-крыс, которым вводили препарат сравнения дабигатрана этексилат и соединение HC-NAR-0273b в эквимольных дозах. При этом разведенный исследуемый образец смешивали с нормальной пульной бедной тромбоцитами плазмой. Исследование проводили на полуавтоматическом коагулометре Solar (SOLAR, Беларусь) в режиме определения тромбинового времени. При добавлении высокоочищенного тромбина, входящего в состав набора определяли время образования нитей фибрина согласно инструкции.

Изучение влияния соединения HC-NAR-0273b на агрегацию тромбоцитов, стимулированных тромбином, выполняли на цельной крови кроликов *in vitro* на двухканальном импедансном агрегометре ChronoLog - 700. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали тромбин в концентрации 0,5 ед/мл. Запись агрегатограммы выполняли в течение 5 минут.

Изучение влияния соединения-лидера на параметры коагулограммы и тромбоэластограммы *in vitro* и *ex vivo* проводили в условиях гиперцитокинемии согласно вышеописанным методам. В опытах *in vitro* гиперцитокинемию воспроизводили путем инкубации липополисахарида (ЛПС) с цельной кровью до получения опытных образцов бедной тромбоцитами плазмы в конечной концентрации 10 мкМ (Amison R.T., 2017). Соединение HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилат по влиянию на параметры коагулограммы исследовали в диапазоне концентраций 10-0,1 мкМ с расчетом EC₅₀. В опытах *ex vivo* системную воспалительную реакцию создавали внутривенным введением ЛПС в дозе 2 мг/кг (QunFu H., 2014) в хвостовую вену крысы через 2 часа после введения соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения в дозах 5,5 и 12,0 мг/кг соответственно. Забор крови для исследования проводили из брюшной аорты через 4 часа после введения ЛПС и выполняли оценку антикоагулянтной активности.

Исследование соединения-лидера на модели ЛПС-индуцированного тромбоза легких мышей (Cohen J., 2002) выполнялось внутрижелудочным введением раствора исследуемого соединения и препарата сравнения дабигатрана этексилата в дозах 13 и 27 мг/кг за 2 часа до начала эксперимента. С целью моделирования тромбоза в хвостовую вену мыши вводили ЛПС в дозе 20 мг/кг. Через сутки у умерших и выживших животных проводили забор легких для гистологической оценки.

Исследования общетоксических свойств согласно методу (Irwin S., 1964) выполняли на белых беспородных мышках-самцах. Соединение HC-NAR-0273b вводили внутрижелудочно в дозах: 5,5 мг/кг, 55,0 мг/кг, 550,0 мг/кг и 2000,0 мг/кг. За животными наблюдали в течение 4 часов

после введения тестируемого образца. Запись параметров осуществлялась через 30, 60, 120, 180 и 240 минут с момента измерения исходных параметров. Острую токсичность определяли на белых лабораторных мышах-самцах. Тестируемый образец HC-NAR-0273b вводили внутривенно в возрастающих дозах 5,5; 55,0; 550,0; 1200,0 и 2000,0 мг/кг. За особями устанавливали наблюдение в течение 14 дней исследования, с целью выявления отдаленной смертности.

Вариационно-статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия one-way ANOVA с поправкой Бонферрони при помощи программы GraphPad Prism 8.0. Расчет EC₅₀ и ED₅₀ проводили с использованием метода регрессионного анализа (вычисление уравнения регрессии и коэффициента регрессии). Статистическую обработку результатов испытаний по влиянию соединений на выживаемость мышей проводили с помощью критерия хи-квадрат с поправкой Йейтса в программе GraphPad Prism 8.0. С помощью морфометрического метода исследования (с использованием программы «ZEN Pro 2012», CarlZeiss, Германия) проводили гистологическую оценку срезов легких мышей. Статистическая обработка полученных данных при изучении цитотоксического эффекта проводилась с использованием программного обеспечения MARS Data Analysis Software, GraphPad Prism 8.0 и Microsoft Office Excel 2016.

В третьей главе описан поиск соединений с антикоагулянтной активностью в ряду новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов (31 соединение) и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов (11 соединений) по влиянию на параметры коагулограммы в концентрации 100 мкМ *in vitro*. В результате было выявлено 4 наиболее активных соединения под шифрами HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G и KC-786, которые удлиняли показатель тромбинового времени, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат. Для расчета EC₅₀ была изучена их способность удлинять тромбиновое время, в зависимости от концентрации. В результате этого по EC₅₀ антитромбиновой активности *in vitro* исследованные соединения располагаются в следующем порядке: FV-174/Na > KC-G > KC-786 > HC-NAR-0273b > дабигатрана этексилат (таблица 1).

Таблица 1 - EC₅₀ соединений HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G и KC-786 и препарата сравнения дабигатрана этексилата по влиянию на показатель тромбинового времени крови кроликов *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% пролонгирования тромбинового времени относительно контроля				EC ₅₀ , мкМ
		10 мкМ	5 мкМ	1 мкМ	0,1 мкМ	
1.	Дабигатрана этексилат	302,0±34,4*	176,1±15,3*	42,3±5,6*	1,4±0,4	1,40
2.	HC-NAR-0273b	467,1±14,4**	194,1±10,0**	46,5±6,7*	4,3±1,0	1,25
3.	KC-786	326,9±24,7**	189,3±15,5**	40,6±7,1	12,7±3,4	1,15
4.	KC-G	374,5±22,2**	205,0±10,7**	49,4±2,4**	9,9±1,1	1,04
5.	FV-174/Na	477,1±16,4**	254,8±13,3**	48,0±2,4**	11,0±1,6	0,90

Примечание: * - данные достоверны относительно контроля, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05); # - изменения статистически значимы по отношению к препарату сравнения дабигатрана этексилату, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05); n – число тестируемых животных.

При оценке зависимости антикоагулянтного действия исследованных соединений от химической структуры было показано, что скаффолд [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина является более предпочтительным при поиске веществ с прямой антикоагулянтной активностью, чем скаффолд [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины.

При изучении данных соединений в опытах *ex vivo* антитромбиновое действие было выявлено только у соединения HC-NAR-0273b через 2 часа после внутривенного введения крысам в дозе, эквивалентной препарату сравнения. Данное соединение пролонгировало показатель тромбинового времени в 6 раз относительно контроля. Поэтому соединение HC-NAR-0273b было выбрано для изучения цитотоксичности и величины острой токсичности (LD₅₀).

В результате исследования цитотоксичности было установлено, что для соединения HC-NAR-0273b не характерно статистически значимого влияния на выживаемость клеток линии НерG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) при 48-ми часовой инкубации. Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии цитотоксических свойств у данного вещества (CC₅₀>>100 мкМ). В отличие от него для препарата сравнения дабигатрана этексилата показано выраженное цитотоксическое влияние в концентрациях 1-100 мкМ (CC₅₀ = 5,4 мкМ) (рисунок 2).

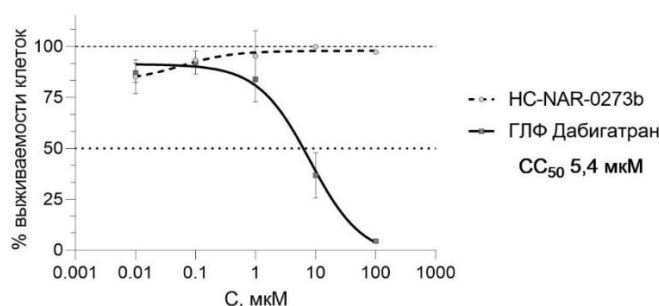


Рисунок 2 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на метаболическую активность (жизнеспособность) клеток линии НерG2 при 48 часовой инкубации в МТТ-тесте. Примечание: ГЛФ – готовая лекарственная форма.

Данные о цитотоксичности соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата позволили рассчитать их условный терапевтический индекс. Для препарата сравнения он

составил 3,8, а для соединения HC-NAR-0273b >>>80,0. Таким образом, по его значению тестируемое соединение превосходит препарат сравнения дабигатрана этексилат в 21 раз.

При изучении острой токсичности было показано, что в опытных группах животных, получавших соединение HC-NAR-0273b в возрастающих дозах, не наблюдалось их гибели. В связи с этим ЛД₅₀ для внутрижелудочного введения данного соединения была определена условно >2000 мг/кг.

Четвертая глава описывает результаты антитромботического действия соединения HC-NAR-0273b на различных моделях венозных тромбозов. На модели тромбин-индуцированной тромбоземболии у мышей соединение HC-NAR-0273b при внутрижелудочном введении в два раза увеличивало количество выживших мышей, по сравнению с группой контроля и было сравнимо по антитромботическому эффекту с ингибитором тромбина дабигатраном этексилатом (таблица 2). Полученные данные подтверждаются морфологическими исследованиями.

Таблица 2 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата при внутрижелудочном введении на выживаемость белых беспородных мышей на модели тромбин-индуцированного тромбоза (40 ед.) (M±m) (n=10)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг ¹	Число умерших животных	Выжившие животные, %
1.	Контроль		7	30,0
2.	Дабигатрана этексилат	27,0	4	60,0*
3.	HC-NAR-0273b	13,0 ²	4	60,0*

Примечание: * – (p<0,01) данные статистически значимы по отношению к контрольной группе животных, хи-квадрат с поправкой Йейтса; ¹ - доза, полученная путем перерасчета с использованием межвидового коэффициента; ² - доза, эквимолярная дозе дабигатрана этексилата 12,0 мг/кг; n – число животных.

На модели тромбоза нижней полой вены соединение HC-NAR-0273b, по способности уменьшать массу тромба, полученного путем перевязки нижней полой вены и, в частности, по величине ED₅₀, превосходит известный антикоагулянт прямого действия дабигатрана этексилат в 2,5 раза (таблица 3).

Таблица 3 - Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата при однократном внутрижелудочном введении на модели тромбоза нижней полой вены (M±m) (n=5)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Масса тромбов, мг	ED ₅₀ , мг/кг
1	Ложно-оперированные крысы	-	0	-
2	Контрольная группа (растворитель)	-	82,3 ± 2,4	
3	HC-NAR-0273b	1,25	50,0 ± 2,6*	1,5
4		2,5	21,2 ± 7,4*	
5		5,5 ²	14,7 ± 3,1*	
6		11,0	0,0*	
7	Дабигатрана этексилат	3,0	57,2 ± 1,8*	3,8
8		6,0	11,0 ± 3,3*	
9		12,0 ¹	1,1 ± 0,9*	

Примечание: * - данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,0001$); ¹ - доза, эквивалентные дозам, используемым для человека в клинической практике, с учетом межвидового коэффициента пересчета; ² – доза, эквимоллярная дозе дабигатрана этексилата; n – количество животных в группе.

На модели тромбоза бедренной вены крыс, индуцированного 50% раствором хлорида железа, соединение HC-NAR-0273b по показателю ED₅₀ антитромботической активности превосходит препарат сравнения в 2,5 раза (таблица 4).

Таблица 4 - Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения при однократном внутрижелудочном введении на модели тромбоза бедренной вены крыс, индуцированного 50% раствором хлорида железа (III) (M±m) (n=5)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии бедренной вены, мин	Δ% пролонгирования времени окклюзии бедренной вены	ED ₅₀ , мг/кг
1	Контроль		9,3 ± 0,2		
2	HC-NAR-0273b	1,25	12,8 ± 0,8	37,1 ± 8,1	1,4
		2,5	18,8 ± 0,3*	101,6 ± 2,7*	
		5,5 ²	24,1 ± 1,0*	158,1 ± 10,8*	
3	Дабигатрана этексилат	3,0	13,3 ± 0,3	42,5 ± 2,7	3,5
		6,0	18,3 ± 1,3*	96,2 ± 13,4*	
		12,0 ¹	29,7 ± 1,5*	219,0 ± 15,9*	

Примечание: * - ($p < 0,05$) данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони; ¹ - доза, эквивалентные дозам, используемым для человека в клинической практике, с учетом межвидового коэффициента пересчета; ² – доза, эквимоллярная дозе дабигатрана этексилата; n – количество животных в группе.

На модели тромбоза по Горогу соединение HC-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении при повышенной турбулентности тока крови вызывало увеличение времени образования тромба в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой и было сравнимо по активности с дабигатраном этексилатом.

Пятая глава посвящена изучению механизма антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b. В таблице 5 приведены значения ED₅₀ данного соединения и препарата сравнения по способности связывать тромбин на хромогенном субстрате S-2238 в тестах *in vivo* при однократном внутрижелудочном введении.

Таблица 5 - ED₅₀ соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата по способности связывать фактор IIa на хромогенном субстрате S-2238 в тесте *in vivo* (M±m) (n=5)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза мг/кг	Уровень свечения	% связывания с фактором IIa	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Бедная тромбоцитами плазма + HC-NAR-0273b	2,5	0,36±0,01	0	9,9
		5,5	0,31±0,01	44,7	
		11,0	0,25±0,03	67	
2.	Бедная тромбоцитами плазма + дабигатрана этексилат	3,0	0,46±0,03	0	8,1
		6,0	0,33±0,02	25	
		12,0	0,28±0,01	64,5	

Примечание: S1 - S5 плазма-калибратор; n – число животных.

С использованием метода иммуноферментного анализа показана способность соединения HC-NAR-0273b достоверно связывать Па фактор. При однократном внутривенном введении данного соединения в дозе 5,5 мг/кг среднее значение связывания с тромбином составило 401,4 нг/мл, что в два раза превосходит контрольные значения (рисунок 3).

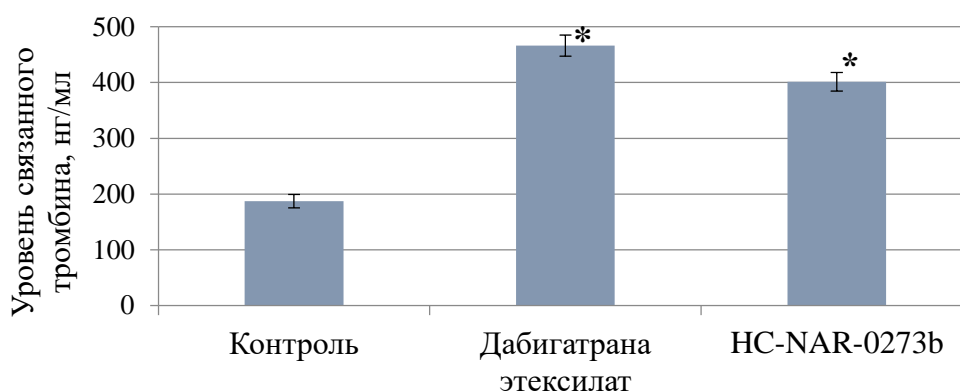


Рисунок 3 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата в эквимоллярных дозах на уровень связанного тромбина методом иммуноферментного анализа *in vivo*

Исследование влияния соединения HC-NAR-0273b на показатель разведенного тромбинового времени с помощью Hemoclot теста показало, что даже при разведении плазмы животных, получавших данное соединение пулированной плазмой, сохранялась его антикоагулянтная активность. При внутривенном введении соединения HC-NAR-0273b в дозе 5,5 мг/кг происходило достоверное удлинение тромбинового времени относительно контрольных значений в плазме, разведенной в 8 раз на 30,5% и разведенной в 20 раз на 19,2% соответственно (таблица 6).

Таблица 6 - Исследование влияния соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на показатель разведенного тромбинового времени в тесте Hemoclot (M±m) (n=15)

№ п/п	Тестируемый образец	Регистрация разведенного тромбинового времени, сек	
		Разведение пульной плазмой (pool plasma) в 8 раз	Разведение пульной плазмой (pool plasma) в 20 раз
1	Контроль	23,9 ± 0,1	24,5 ± 0,4
2	HC-NAR-0273b	31,2 ± 0,8*	29,2 ± 0,5*
3	Дабигатрана этексилат	38,8 ± 1,6*	36,6 ± 0,8*

Примечание: * - данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$).

Соединение HC-NAR-0273b достоверно, относительно контроля, изменяло параметры тромбоэластограммы. Так, данное вещество через 2 часа после внутривенного введения в дозе 5,5 мг/кг удлиняло показатель R (время образования первых нитей фибрина) в 1,4 раза, что также подтверждает его антикоагулянтное действие.

Исследование влияния соединения HC-NAR-0273b на агрегацию тромбоцитов под действием тромбина, позволило также сделать заключение о его влиянии на количество образующегося тромбина. Препарат сравнения дабигатрана этексилат в концентрации 100 мкМ блокировал тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 100%. При этом соединение HC-NAR-0273b снижало уровень амплитуды агрегации тромбоцитов на 64,3% (рисунок 4).

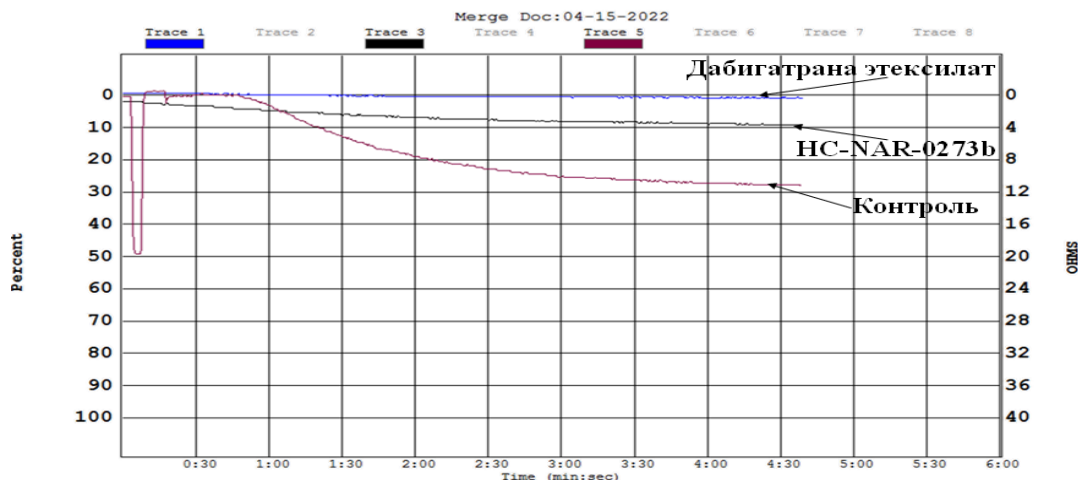


Рисунок 4 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата в концентрации 100 мкМ на тромбин-индуцированную агрегацию цельной крови кроликов на агрегометре Chronolog - 700 (Chronolog, США)

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что соединение HC-NAR-0273b проявляет антикоагулянтную активность, связанную с ингибированием Па фактора.

В шестой главе описано изучение антикоагулянтной активности соединения HC-NAR-0273b в условиях гиперцитокинемии. В литературе описано (Mehta P., 2020), что пациенты с тяжелой вирусной и бактериальной инфекцией имеют высокий риск венозных тромбоэмболических осложнений, так как иммунные механизмы коагулопатий связаны с высвобождением цитокинов и тканевого фактора при альвеолярном повреждении, что влечет за собой генерацию тромбина и депрессию фибринолиза. Одним из схожих с цитокиновым штормом патологических состояний является сепсис. Известно, что экзогенный липополисахарид через Толл-подобный рецептор 4 вызывает высвобождение и экспрессию тканевого фактора на поверхности клеток, что может привести к сепсису (Yang, X., 2019; Zhang, H., 2020). Поэтому мы изучили влияние соединения HC-NAR-0273b на процессы коагуляции и воспаления в условиях гиперцитокинемии *in vitro* и *in vivo*, вызванной липополисахаридом.

Значения EC_{50} антитромбиновой активности исследуемого соединения и препарата сравнения в условиях гиперцитокинемии *in vitro* представлены в таблице 7. По данному параметру соединение HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилат были сравнимы. Но при этом в условиях цитокиновой интоксикации по EC_{50} антитромбиновой активности исследуемое соединение и препарат сравнения превосходили таковую на интактной крови в 1,6 и 1,8 раза

соответственно. По условному терапевтическому индексу при гиперцитокинемии соединение HC-NAR-0273b превосходит дабигатрана этексилат в 18 раз.

Таблица 7 - EC₅₀ соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата по влиянию на показатель тромбинового времени крови кроликов в условиях гиперцитокинемии *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% пролонгирования тромбинового времени относительно контроля				EC ₅₀ , мкМ
		10 мкМ	5 мкМ	1 мкМ	0,1 мкМ	
1.	Дабигатрана этексилат	292,0 ± 0,6*	208,6 ± 0,7	51,7 ± 0,5*	16,3 ± 0,2*	0,76
2.	HC-NAR-0273b	354,1 ± 6,5**	234,1 ± 4,2**	56,3 ± 1,1*	8,4 ± 1,6	0,78

Примечание: * - данные достоверны относительно контроля, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05); # - изменения статистически значимы по отношению к препарату сравнения дабигатрана этексилату, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05); n – число тестируемых животных.

Данные о способности тестируемых образцов пролонгировать тромбиновое время без и в условиях гиперцитокинемии *ex vivo* представлены на рисунках 5 и 6. В условиях системной воспалительной реакции соединение HC-NAR-0273b при однократном внутривенном введении проявляет более выраженное антитромбиновое действие, чем в ее отсутствие, что свидетельствует о возможном действии данного вещества на воспалительные компоненты крови и прокоагулянтные пути, вызванные воспалением.

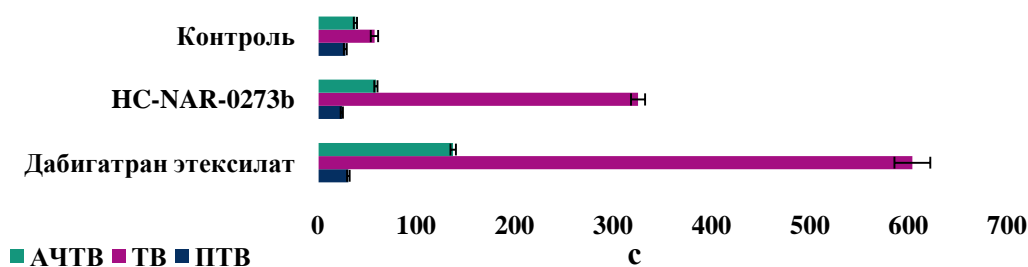


Рисунок 5 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на параметры коагулограммы крови intactных крыс

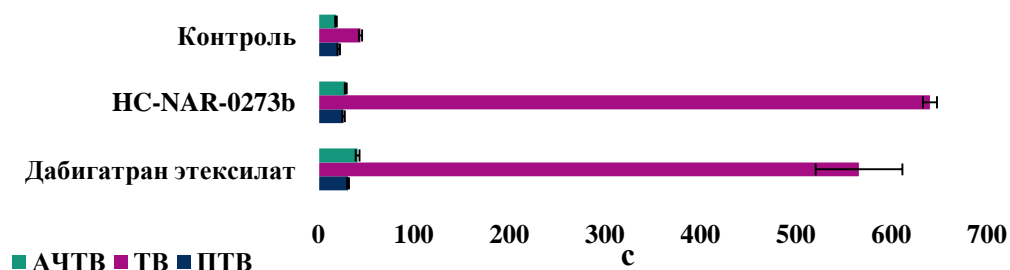


Рисунок 6 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на параметры коагулограммы крови крыс при гиперцитокинемии

При исследовании влияния соединения HC-NAR-0273b на параметры тромбоэластограммы в условиях системной воспалительной реакции, вызванной внутривенным введением липополисахарида, было показано, что оно изменяет их параметры в сторону гипокоагуляции более выражено, чем в опытах на intactных крысах (рисунок 7).

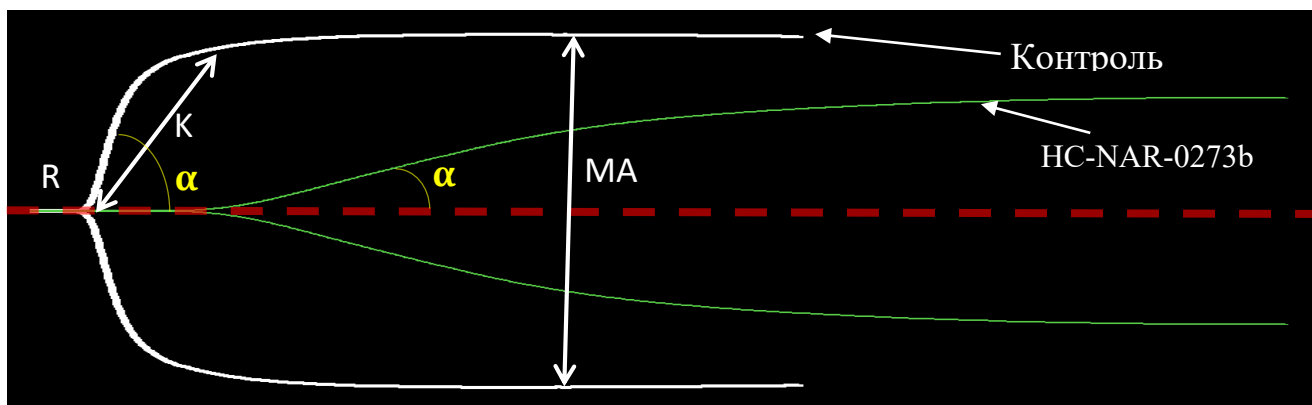


Рисунок 7 - Влияние соединения HC-NAR-0273b на время образования первых нитей фибрина в условиях гиперцитокинемии.

Примечание: R - время образования первых нитей фибрина; K - время образования стабильного сгустка; Угол α - скорость образования сгустка; MA - максимальная амплитуда, характеризующая функциональную активность тромбоцитов

На модели тромбозмболии легких мышей, вызванной внутривенным введением ЛПС, через сутки в контрольной группе животных отмечалась 100% гибель. Соединение HC-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении в дозе 5,5 мг/кг за 2 часа до моделирования тромбоза увеличивало выживаемость мышей, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат в 1,3 раза (рисунок 8).

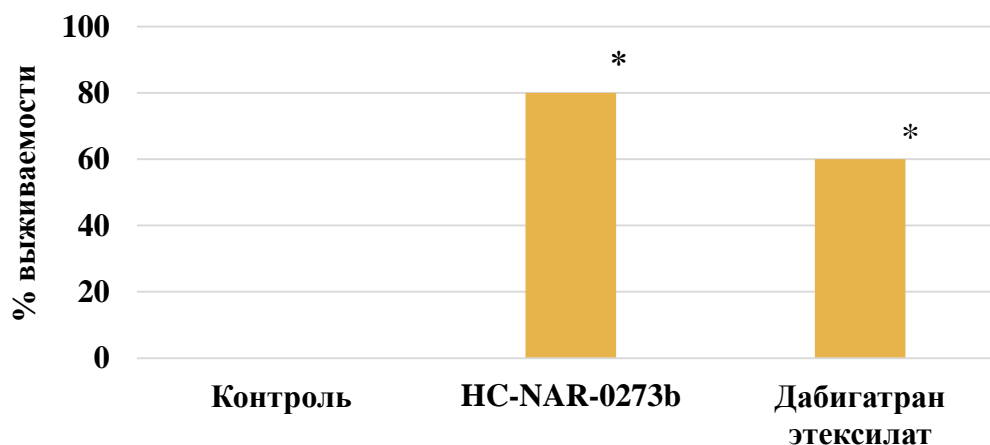
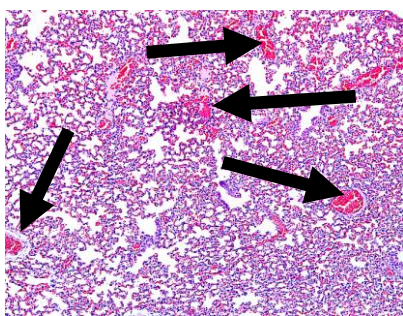


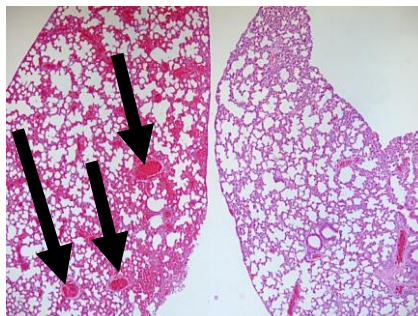
Рисунок 8 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на выживаемость белых беспородных мышей на модели ЛПС-индуцированного тромбоза в дозе 2 мг/кг

* – ($p < 0,01$) данные статистически значимы по отношению к контрольной группе животных, хи-квадрат с поправкой Йейтса.

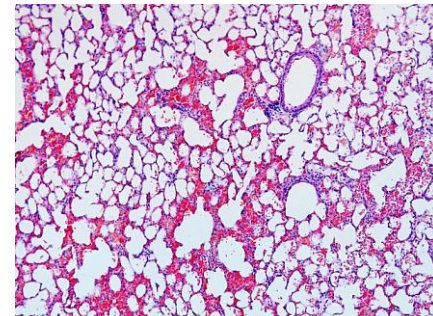
Согласно результатам морфологического исследования, однократное введение препарата сравнения дабигатрана этексилата и соединения-лидера при остром ЛПС-индуцированном повреждении легких слабо способствовало восстановлению нарушенного кровообращения в легочной ткани, но защищало альвеолы от острого повреждения. При этом наибольшим потенциалом обладало соединение HC-NAR-0273b (рисунок 9).



Контрольная группа



Дабигатрана этексилат



НС-NAR-0273b

Рисунок 9 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей контрольной группы (А) и группы мышей, получавших соединение НС-NAR-0273b (Б), на модели тромбин-индуцированного тромбоза легких. Окраска гематоксилин-эозином. Общее увеличение $\times 100$; На рисунке стрелками указаны тромбы.

Исходя из вышеизложенного, усиление антикоагулянтного действия соединения НС-NAR-0273b в условиях системной воспалительной реакции указывает на возможное наличие у него противовоспалительной активности. Следовательно, данное вещество может внести существенный вклад, влияя на патогенетические звенья иммунокоагуляции и тем самым, снижая риск развития тромбозов, в том числе, и в условиях вирусных и бактериальных инфекций.

В седьмой главе описано исследование общетоксических свойств соединения НС-NAR-0273b по методу Irwin S. В результате проведенного исследования при однократном внутрижелудочном введении соединения НС-NAR-0273b было выявлено, что соединение не влияет на двигательную, мышечную координацию, и на реактивность животных. Также соединение НС-NAR-0273b не оказывает влияния на нервно-мышечную возбудимость, изменения эмоционального поведения животных, а также не приводит к проявлению синдрома Штраубе, тремора, судорог и парезов. Не отмечено влияние данного вещества и на вегетативную систему.

Восьмая глава посвящена обсуждению полученных результатов. Результатом поиска соединений с антикоагулянтной активностью в ряду новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов по влиянию на параметры коагулограммы *in vitro* было выявлено четыре наиболее активных вещества под шифром НС-NAR-0273b, FV-174/Na, КС-G и КС-786, удлиняющих показатель тромбинового времени. В качестве препарата сравнения был исследован ингибитор Па фактора (тромбин) дабигатрана этексилат. Для расчета EC_{50} была изучена способность 4 активных соединений и препарата сравнения удлинять показатель тромбинового времени, в зависимости от концентрации. Далее была проведена оценка зависимости антикоагулянтного действия от химической структуры соединений. Показано, что скаффолд [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина является более предпочтительным при поиске веществ с прямой антикоагулянтной активностью, чем скаффолд [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина.

При изучении данных соединений в опытах *ex vivo* антитромбиновое действие было выявлено только у соединения НС-NAR-0273b через 2 часа после внутрижелудочного введения крысам в дозе эквимольной препарату сравнения дабигатрану этексилату, поэтому оно было выбрано для дальнейшего исследования.

Для соединения HC-NAR-0273b не характерно наличие статистически значимого цитотоксического воздействия на клетки линии HepG2 при 48-ми часовой инкубации в диапазоне концентраций 0,01-100 мкМ, в отличие от препарата дабигатрана этексилата. По показателю условного терапевтического индекса соединение HC-NAR-0273b превышает препарат сравнения в 21 раз. Согласно результатам исследований острой токсичности соединения HC-NAR-0273b на мышах при однократном внутривенном введении с учетом классификации токсичности по И.В. Березовской (2003) изучаемое вещество, может быть отнесено к 4 классу малотоксичных соединений.

В результате проведенных экспериментов установлена высокая антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b на различных моделях венозного тромбоза при однократном внутривенном введении. На модели тромбин-индуцированной тромбоза у мышей соединение HC-NAR-0273b в два раза увеличивало количество выживших мышей, относительно группы контроля и было сравнимо по антитромботическому эффекту с ингибитором тромбина дабигатраном этексилатом. На моделях тромбоза нижней полой вены и тромбоза бедренной вены, индуцированного хлоридом железа, соединение HC-NAR-0273b по величине ED₅₀, превосходит известный антикоагулянт прямого действия дабигатрана этексилат в 2,5 раза. Также данное соединение при однократном внутривенном введении в тест-системе Горога увеличивало время процесса образования тромба в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой, не вызывая при этом лизис тромба.

Проведено экспериментальное изучение механизма антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b. В результате проведенного исследования была доказана его способность связывать тромбин на хромогенном субстрате S-2238 в тестах *in vivo*. Также возможность соединения HC-NAR-0273b увеличивать уровень связанного тромбина была подтверждена количественным методом с использованием иммуноферментного анализа. Уровень связанного тромбина под действием данного вещества увеличивался в 2,2 раза по сравнению с данными, полученными в контроле.

Исследование влияния соединения HC-NAR-0273b на разведенное тромбиновое время с помощью Hemosclot kit теста показало, что даже при разведении плазмы животных, получавших данное соединение пулированной плазмой в 8 и 20 раз, сохранялась его антикоагулянтная активность. Также соединение HC-NAR-0273b через два часа после внутривенного введения изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции, подтверждая его антикоагулянтное действие. Таким образом, на основании изучения механизма антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b можно заключить, что он связан с ингибированием IIa фактора.

В результате проведенных исследований было показано, что соединение HC-NAR-0273b на животных с системной воспалительной реакцией изменяет параметры коагулограммы и тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции более выражено, чем в опытах на интактных крысах. Также на модели ЛПС-индуцированного тромбоза легких соединение HC-NAR-0273b увеличивало выживаемость мышей, превосходя препарат сравнения в 1,3 раза. Исходя из полученных результатов, усиление антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b в

условиях системной воспалительной реакции может внести существенный вклад, влияя на патогенетические звенья иммунокоагуляции.

В результате изучения общетоксических свойств соединения НС-NAR-0273b не влияет на двигательную активность и координацию животных, не вызывает изменения эмоционального поведения животных, тремора, судорог и парезов. Не отмечено влияние данного вещества и на вегетативную систему.

Заключение. В ряду производных триазола выявлено соединение НС-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтную активность, связанную с ингибированием тромбина (Па фактор). При этом антикоагулянтное действие данного вещества усиливается в условиях системной воспалительной реакции, что свидетельствует о влиянии данного соединения на патогенетические звенья иммунокоагуляции, что может внести значительный вклад в предотвращение тромбозов, ассоциированных с вирусными и бактериальными инфекциями.

Выводы

1. Производные [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина являются более перспективным классом при поиске веществ с прямой антикоагулянтной активностью, чем производные [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины.
2. В результате экспериментального скрининга среди 42 производных триазоло[1,5-*a*]пиримидина и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины было выявлено соединение НС-NAR-0273b, проявляющее высокую антикоагулянтную активность в опытах *in vitro* и *ex vivo*.
3. Наиболее значимым, положительно влияющим на уровень прямой антикоагулянтной активности соединения НС-NAR-0273b является включение в структуру двух тиофен-2-ил групп.
4. Исследуемое соединение НС-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении крысам оказывает выраженное антитромботическое действие на модели тромбоза нижней полой вены и модели тромбоза бедренной вены, индуцированной 50% раствором хлорида железа, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат в 2,5 раза.
5. На модели тромбин-индуцированной тромбоэмболии легких соединение НС-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении также, как и препарат сравнения дабигатрана этексилат в 2 раза относительно группы контроля повышает выживаемость мышей. Гистологические исследования легочной ткани показали, что данное соединение замедляет процесс образования внутрисосудистых фибриновых тромбов.
6. На фоне повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога соединение НС-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении приводит к повышению времени образования тромба в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой, при этом, не оказывая влияния на процесс фибринолиза.

7. Соединение HC-NAR-0273b, по способности связывать тромбин на хромогенном субстрате S-2238 в тестах *in vivo*, по показателю ED₅₀ равно ингибитору тромбина дабигатрану, а также при проведении иммуноферментного анализа увеличивает уровень связанного тромбина в 2,2 раза по сравнению с контрольными значениями, что указывает на связь механизма антикоагулянтного действия с ингибированием IIa фактора.
8. Исследуемое соединение изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции и снижает на 64,2% агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином.
9. Соединение HC-NAR-0273b по сравнению с антитромбиновой активностью на интактных животных проявляет более выраженное действие в условиях гиперцитокинемии, вызванной липополисахаридом, что свидетельствует о возможном подавлении прокоагулянтных путей, вызванных воспалением.
10. В условиях системной воспалительной реакции на модели тромбоза легких, индуцированного внутривенным введением липополисахарида соединение HC-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении, увеличивало выживаемость мышей, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат в 1,3 раза.
11. Соединение HC-NAR-0273b не проявляет цитотоксического действия на клетках линии HepG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) при 48-ми часовой инкубации в диапазоне концентраций 0,01-100 мкМ, в отличие от препарата дабигатрана этексилата, для которого показано выраженное цитотоксическое влияние в концентрациях 1-100 мкМ и по условному терапевтическому индексу превосходит препарат сравнения в 21 раз.
12. Величина ЛД₅₀ для внутрижелудочного введения соединения HC-NAR-0273b составила > 2000 мг/кг, что позволяет отнести соединение HC-NAR-0273b к классу малотоксичных соединений (4 классу токсичности).

Практические рекомендации

1. Созданная методология поиска соединений с антикоагулянтной активностью может быть использована при синтезе и направленном поиске новых антикоагулянтных соединений.
2. Полученные данные антикоагулянтной активности соединения HC-NAR-0273b, связанной с блокированием IIa фактора без и в условиях гиперцитокинемии, следует учитывать при проведении фармакокинетических и токсикологических исследований с целью детализации фармакотерапевтического эффекта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ:

1. Savateev K. V., Fedotov V. V., Rusinov V. L., Kotovskaya S. K., Spasov A. A., Kucheryavenko A. F., Vasiliev P. M., Kosolapov V. A., Sirotenko V. S., Gaidukova K. A., **Uskov G. M.** Azolo[1,5-a]pyrimidines and Their Condensed Analogs with Anticoagulant Activity // *Molecules* (Basel, Switzerland). 2022. - 27(1). – С. 274.
2. Спасов А. А., Кучерявенко А. Ф., Сиротенко В. С., Гайдукова К. А., **Усков Г. М.** Влияние прямых оральных антикоагулянтов на систему гемостаза при бактериальном сепсисе // *Вестник ВолГМУ*. 2022. – 1(81).
3. Spasov A. A., Kucheryavenko A. F., Sirotenko V. S., Gaidukova K. A., **Uskov G. M.** Antiplatelet Activity of Riamilovir under Conditions of Lipopolysaccharide Intoxication // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2022. – 173(1), - С. 41–45.
4. Спасов А. А., Кучерявенко А. Ф., Сиротенко В. С., Гайдукова К. А., **Усков Г. М.** Антикоагулянтная активность нового производного пиримидина без и в условиях гиперцитокинемии // *Кардиологический вестник*. 2022. – 17. – С. 32.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

5. **Усков Г. М.** Влияние нового конденсированного производного пиримидина на параметры коагулограммы // *Материалы XXVI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области*, 2021.
6. **Усков Г. М.**, Гайдукова К. А. Изучение влияния новых производных азолоазинов на активность тромбина крови кроликов в условиях гиперцитокинемии // *Материалы 79-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины»*. 2021. – С. 353-354.
7. Русинов В. Л., Котовская С. К., Саватеев К. В., Мочульская Н. Н., Спасов А. А., Кучерявенко А. Ф., Васильев П. М., Сиротенко В. С., Гайдукова К. А., **Усков Г. М.** Поиск новых антикоагулянтных соединений среди аналогов пуриновых оснований // *Материалы конференции 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «MEDCHEM-RUSSIA»*. 2022. – С. 92.
8. Сиротенко В. С., Гайдукова К. А. **Усков Г. М.** Антитромботическая активность нового конденсированного производного триазолопиримидина // *Материалы LXXXIII Ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2022»*. 2022.
9. **Усков Г. М.** Антитромботическая активность производного триазолопиримидина на различных моделях венозных тромбозов // *Материалы 80-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины»*. 2022.

Перечень сокращений и условных обозначений

ЛПС – липополисахарид

НОАК – новые оральные антикоагулянты

ПТВ – протромбиновое время

ТВ – тромбиновое время

УТИ – условный терапевтический индекс

СС₅₀ – средний показатель цитостатического эффекта (выживаемости клеток)

ED₅₀ – эффективная доза, в которой исследуемое вещество влияет на блокирование процессов коагуляции на 50%

FIIa – тромбин (активированный фактор II)

ЕС₅₀ – эффективная концентрация, в которой вещество пролонгирует тромбиновое время на 50%

LD₅₀ – средняя доза, вызывающая гибель половины животных испытываемой группы

УСКОВ ГЕОРГИЙ МИХАЙЛОВИЧ

**АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать _____ г. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.
Печать трафаретная. Печ. л. 1,0. Тираж 120 экз. Заказ № ____.

Издательство Волгоградского государственного технического университета.
400005, г. Волгоград, просп. им. В.И. Ленина, 28, корп. №7.