

ГАЙДУКОВА КСЕНИЯ АНДРЕЕВНА

**АНТИТРОМБОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
БЕНЗИМИДАЗОЛА, ИМЕЮЩИХ В СТРУКТУРЕ ЭКРАНИРОВАННЫЙ
ФЕНОЛЬНЫЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград – 2020

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ, академик
РАН, доктор медицинских наук, профессор

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, доцент

Кучерявенко Аида Фатиховна

Официальные оппоненты:

Заведующий кафедрой фармакологии
фармацевтического факультета с курсом
фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО
Казанского ГМУ Минздрава России, доктор
медицинских наук, профессор

Зиганшин Айрат Усманович

Заведующий кафедрой фармакологии и
клинической фармакологии Белгородского
государственного национального
исследовательского университета, доктор
медицинских наук, профессор

Покровский Михаил Владимирович

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» (Томский НИМЦ) 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

Приёмная тел./факс: (3822) 41-83-75 / факс: (3822) 41-83-79 (круглосуточно)

e-mail: pharm@tnimc.ru сайт: www.pharmso.ru

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сердечно-сосудистые заболевания на данный момент являются ведущей причиной глобальной инвалидизации и смертности. По данным Всемирной организации здравоохранения в 2018 году было зарегистрировано более 17,9 миллиона смертей в год от заболеваний, связанных с повышением тромбогенного потенциала крови [Чазов Е.И., 2015; Плотников Г.П., 2016; Удут В.В., 2016; Покровский М.В., 2019; Шляхто Е.В., 2019]. Среди них - ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт, нарушение периферического кровообращения, осложнения сахарного диабета и др. [Кубатиев А.А., 2018; Дедов И.И., 2019; Smith S.A., 2015; Kalathottukaren M.T., 2018; McFadyen J.D., 2018]. По данным центров, которые осуществляют контроль заболеваемости и профилактики (Centers for Disease Control and Prevention), средняя продолжительность жизни человека была бы на 10 лет больше при отсутствии высокой распространенности сердечно-сосудистых заболеваний.

Тромбоциты выполняют важную роль в поддержании гемостаза, который требует строго регулируемого взаимодействия системы коагуляции, тромбоцитов и других клеток крови, а также компонентов стенки сосуда в месте ее повреждения [Мазуров А.В., 2011; Suzuki-Inoue K., 2019]. Основными стадиями при образовании тромба являются адгезия, активация, агрегация. Но наиболее важным этапом тромбообразования считается их взаимодействие с эндогенными проагрегантными веществами и молекулами адгезии [Randriamboavonjy V., 2018; Pircher J., 2019].

Также в последние годы сформировалась концепция о важнейшей роли перекисного окисления липидов в патогенезе повышения тромбогенного потенциала крови, что является теоретическим обоснованием использования антиоксидантных средств, в качестве препаратов патогенетической терапии тромбозов [Воронина Т.А., 2012; Rajendran S., 2008; Malekmohammad K., 2019; Pircher J., 2019]. Окислительный стресс связан с увеличением образования активных форм кислорода, которые выполняют ключевую роль в регуляции различных функций клеток и биологических процессов, что приводит к повышенному тромбообразованию [Berger M., 2019; Fuentes E., 2019].

Таким образом, современные представления о механизмах тромбообразования определяют важную роль препаратов, ингибирующих функцию тромбоцитов и процессы перекисного окисления липидов, в профилактике и лечении данных заболеваний [Зиганшин А.У. 2017; Петров, В.И., 2019; Grove E.L., 2015].

Современная антиагрегантная терапия проводится с использованием препаратов, имеющих высокий уровень доказательности [Roffman D.S., 2016; Richman I.B., 2017]. Но, несмотря на их высокую эффективность, антиагрегантные средства обладают рядом побочных явлений, что служит серьезным ограничением при их применении. Наиболее часто проявляются гастропатии, кровотечения, развитие резистентности, тромбоцитопения [Melkonian M., 2017; McFadyen J.D., 2018; Buccheri S., 2019].

Химический класс производных бензимидазола перспективен для разработки потенциальных антиагрегантных средств [Chang Y., 2017; Baldisserotto A., 2019]. В ранее проведенных исследованиях

на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета была выявлена способность производных бензимидазола блокировать процессы агрегации тромбоцитов, а также наличие антиоксидантной активности у представителей данного класса, в молекулярном остове которых присутствуют «ловушки» свободных радикалов [Косолапов В.А., 2012, 2013; Спасов А.А., 2013; Кучерявенко А.Ф., 2016, 2019]. Именно поэтому, поиск новых соединений с антиагрегантной активностью в ряду производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель, является актуальным.

Степень разработанности. Одной из проблем современной кардиологии является потребность в высокоэффективных препаратах для лечения и профилактики тромбообразования с минимальными побочными эффектами [Михайлова И. Е., 2014]. Уже длительное время на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ продолжается поиск высокоактивных соединений в ряду бензимидазола. Среди производных данной группы описано много соединений с антиагрегантной [Кучерявенко А.Ф., 2016], а также антиоксидантной активностью [Kosolapov V.A. 2019]. Так, было показано, что при введении в структуру бензимидазола диоскифенильного фрагмента, происходит повышение антитромбогенной активности [Спасов А.А., 2013]. В предварительных исследованиях было показано, что при изменении диоскифенильного фрагмента на дитретбутильный в структуре бензимидазолов в положение R1 происходит повышение как антиагрегантной, так и антиоксидантной активности [Алексеева А.А., 2007; Bergani A., 2018]. Таким образом, является целесообразным поиск новых соединений в ряду бензимидазола, с включенным в структуру экранированным фенольным заместителем, на наличие антиагрегантной и антиоксиданной активности.

Цель исследования. Поиск ингибиторов агрегации тромбоцитов среди новых производных бензимидазола, содержащих встроенный дитретбутильный заместитель, и изучение их антитромбогенной активности.

Задачи исследования.

1. Провести поиск соединений, проявляющих высокую антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo* среди новых производных бензимидазола, имеющих в своей структуре молекулярный остов в виде экранированного фенольного заместителя.
2. Изучить зависимость антиагрегантной и антиоксидантной активности в ряду производных бензимидазола от расположения дитретбутильного радикала.
3. Исследовать влияние наиболее активного соединения на тромбогенный потенциал крови и тромбогенез крыс в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда.
4. Изучить механизм антиагрегантного действия наиболее активного соединения.
5. Провести анализ величины острой суточной токсичности соединения, проявляющего наибольшую антиагрегантную активность, рассчитать его условно-терапевтический индекс (УТИ) и исследовать общетоксикологических свойств.

Научная новизна исследования. Впервые установлено наличие высоких антиагрегантных и антиоксидантных свойств производных бензимидазола, представленных такими молекулярными остовами, как *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолы, *N*-9-дитретбутил-4-

гидроксифенил бензимидазолы и *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолы. В ходе проведенного исследования было выявлено соединение под шифром РУ-1144, у которого наблюдается выраженное антиагрегантное действие, превосходящее препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и антиоксидантное действие сравнимое с препаратом сравнения – дибунолом. Впервые проведено изучение влияния соединения РУ-1144 на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз в тестах *in vitro* и *in vivo*, изучена антитромботическая активность на различных моделях артериальных и венозного тромбозов, а также при экспериментальном некоронарогенном инфаркте миокарда.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлено наличие сочетанной антиагрегантной и антиоксидантной активности при включении в структуру бензимидазола экранированного фенольного заместителя. Проведено исследование способности соединения РУ-1144 ингибировать процесс образования тромбов в сонной артерии крыс при аппликации хлорида железа (III) и воздействия электрического тока, при моделировании экспериментального некоронарогенного инфаркта миокарда, на моделях клеточного тромбоза легочных артерий и тромбоза глубоких вен. Соединение-лидер РУ-1144 проявляет менее выраженное действие на длительность кровотечения при сравнении с показателями препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Установлено, наличие у данного соединения комбинированного антитромбоцитарного механизма действия.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленных задач были выбраны современные высокоинформативные методические подходы, входящие в арсенал Волгоградского государственного медицинского университета. В данном исследовании использовались кролики-самцы породы «Шиншилла», а также половозрелые беспородные самцы мышей и крыс. Изучение антитромботических свойств соединения РУ-1144 выполнено согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению антиагрегантной и антитромботической активности лекарственных средств [Макаров В.А., 2012] и следующим методам [Сакаев М.Р., 2000; Kurz K.D., 1990; Guglielmi G., 1991; Ryu S.K., 2006; Henke P.K., 2007; Gratacap M., 2009; Yamamoto J., 2014; Mohamed A.R., 2014; Rao M.L., 2014], с использованием методов статистической обработки полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные бензимидазола, представленные молекулярным остовом - экранированным фенольным заместителем - *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолов, *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов и *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолов, являются перспективным классом соединений для поиска новых высокоэффективных антиагрегантных средств.
2. Соединение РУ-1144 оказывает выраженную антиагрегантную активность в тестах исследования агрегации тромбоцитов *in vitro*, индуцированных такими агонистами, как аденозиндифосфат (АДФ), арахидоновая кислота, коллаген и фактор активации тромбоцитов (ФАТ), в тестах *in vivo* ингибирует P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов, влияя на продукты циклооксигеназного каскада, снижает уровень TxB₂ и повышает количество 6-кето-простагландина F_{1α}.

3. Изученное вещество РУ-1144 оказывает антитромботическое действие *in vivo* на моделях артериальных тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и воздействием электрического тока, системного адреналин-коллагенового тромбоза на мышцах и на модели тромбоза нижней поллой вены крыс.

Внедрение результатов исследования. Полученные данные о способности новых соединений ингибировать процессы агрегации тромбоцитов, а также анализ влияния заместителей на уровень антиагрегантной активности в ряду производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель, используются при синтезе новых веществ в НИИ ФОХ Южного Федерального университета (г. Ростов-на-Дону). В работе научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством (НЦИЛС) ВолгГМУ, кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к изучению антиагрегантной активности веществ. Результаты работы включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и фармации ИНМФО (Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования) ВолгГМУ, на кафедрах фармакологии Астраханского государственного медицинского университета, Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко и Кубанского государственного медицинского университета.

Степень достоверности и апробация результатов. В данной работе достигнута высокая степень достоверности полученных результатов, которая подтверждается необходимым объемом и качеством выполненных исследований, проведенных на различных лабораторных животных, таких как кролики, мыши и крысы, с использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с антитромбогенной активностью, а также необходимых критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVII, XIX, XX, XXI, XXII и XXIV Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2012, 2015 - 2019; 72, 73 - 76 открытых научно-практических конференциях молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2014 - 2018 гг.; открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, Волгоград, 2015, 2017; на конференции, посвященной Микроциркуляции и гемореологии X, XI Международной научной конференции, Ярославль, 2015; X международной (XIX Всероссийской Пироговской конференции студентов и молодых ученых), Москва, 2015; VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2016; IV Всероссийской научно-практической конференции "Беликовские чтения", г. Пятигорск, 2016, 2017; Материалы "XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии", Екатеринбург, 2016; на Объединенном Конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 8-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии Москва, 2016; Научно-практической конференции с международным участием, посвященной ПГФА, Пермь, 2015, 2016.

По теме диссертации опубликовано 29 работ (из них 11 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ), получен 1 патент.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проводился поиск и анализ литературных источников, как отечественных, так и зарубежных, по теме диссертационного исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах экспериментального изучения фармакологической активности и механизма антиагрегантного действия нового производного бензимидазола, имеющего в структуре экранированный фенольный заместитель, а также в выполнении поставленных задач и обсуждении полученных результатов. Автором лично выполнен сбор и оформление первичных данных, их статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и оформление рукописи в процессе написания диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 191 страницах машинописного текста, иллюстрирована 17 рисунками и 48 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2 – 7), обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 49 отечественных и 176 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе проведен анализ и на его основе написан обзор отечественных и зарубежных литературных источников по теме диссертации. В первом разделе представлены известные основные механизмы активации тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза. Второй раздел посвящен описанию антиагрегантных средств, которые структурированы по принципам доказательной медицины, также данный раздел включает эффективность и побочное действие современных антиагрегантных средств. Также представлены разделы, в которых описывается обоснование роли перекисного окисления в тромбообразовании, спектр фармакологической активности производных бензимидазола и объяснение целесообразности выявления в данном ряду у комплексных молекул, содержащих такие фрагменты как бензимидазол и экранированный фенольный заместитель, антиагрегантной и антитромбогенной активности.

Во второй главе диссертации описаны материалы и методы исследования 26 новых производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель синтезированных в НИИ Физической и органической химии Южного Федерального университета¹.

Для выполнения исследований использовались следующие реактивы: динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Sigma», США), арахидоновая кислота («Sigma», США), адреналин («Sigma», США), U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) («Sigma», США), тромбин («Sigma», США), коллаген («Sigma», США), ФАТ (фактор активации тромбоцитов, «Sigma», США), PAR-1 (TFLLP-NH2 Trifluoroacetate salt - агонист PAR-1, «Sigma», США), TRAP (активатор рецепторов

¹Выражаем искреннюю благодарность к.х.н. О.Н. Жуковской за любезно предоставленные субстанции веществ.

тромбина, «Sigma», США) и ристоцетин («Sigma», США), хлоралгидрат (Органика, Россия), хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия), физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия), цитрат натрия (Реахим, Россия), натрия хлорид (Реахим, Россия), калия хлорид (Реахим, Россия), магния хлорид (Реахим, Россия), натрия гидрокарбонат (Реахим, Россия), глюкоза (Реахим, Россия), натриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТА) («ICN», США), трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид (х.ч.), кальция хлорид (ч.д.а.) производства «Мосреактив» (Россия), *Нерес free acid* («Sigma», США), BSA («Sigma», США), формалин (Acros organics, США), ЭГТА (этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир тетрауксусной кислоты)) («Sigma», США), калия хлорид (х.ч.), гидрокарбонат натрия (х.ч.), магния хлорид (х.ч.), изопротеренол (Sigma, США), TxB₂ ELISA kit (ENZO kit, США), 6-keto-PGF1α ELISA kit (ENZO kit, США), флуоресцентный зонд Fura-2/AM (Sigma, США).

В качестве веществ и препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту («Sigma», США), клопидогрел (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия), дибунол (Merck, Германия) верапамил (ЗАО «Северная звезда», Россия), вещество – MRS-2179 («Sigma», США). В качестве растворителя веществ использовали дистиллированную воду.

Приборы, использованные в данных исследованиях: агрегометр Viola220 LA (ООО НФП "Биола", Россия), центрифуга MultiCentrifuge Elmi CM 6MT (Elmi, Латвия), ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург), лазерный анализатор «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия), многофункциональный микропланшетный ридер Infinite 200 PRO (Tecan, Австрия) установка открытое поле (ООО "НПК Открытая Наука", Россия), микроскоп AxioCamplus (CarlZeiss, Германия), цифровая камера AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия).

Эксперименты были выполнены на 24 кроликах самцах породы "Шиншилла" массой 3,0-4,0 кг, полученных в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России «Столбовая», 350 белых беспородных крысах самцах массой 250,0-350,0 г, 215 белых половозрелых беспородных мышах самцах массой 20,0-32,0 г, полученных в ООО «НИЦБМТ» и на суспензии тромбоцитов, предоставленной ГБУЗ Волгоградского областного центра крови (договор №7 от 3 марта 2017 г. с ГБУЗ "Волгоградский областной центр крови"). Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с 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)».

Изучение влияния соединений на функциональную активность тромбоцитов в тесте *in vitro* и *in vivo* с изучением биологического материала *ex vivo* проводили по методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов НПФ «Биола» 220LA (Россия). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов был использован АДФ (5 мкМ), а препаратами сравнения выбрали ацетилсалициловую кислоту (АСК) и клопидогрел.

Антиоксидантную активность веществ изучали в экспериментах *in vitro* на модели аскорбат-зависимого ПОЛ по методу Ланкина В.З. (1975) на спектрофотометре PD-303 UV (APEL, Япония). В качестве субстрата использовали 4% гомогенат печени крыс. Препаратом сравнения было выбрано антиоксидантное средство дибунол.

Острую токсичность определяли на белых лабораторных мышах-самцах массой 20-25 г. при внутрибрюшинном пути введения.

Антитромботическую активность изучали на моделях тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа (III) и воздействием электрического тока. Эксперименты проводили на наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг внутрибрюшинно) крысах-самцах через 2 часа после внутрижелудочного введения соединения согласно методам Kurz K.D. (1990) и Guglielmi G. (1991) соответственно. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел. Исследуемое соединение, АСК и клопидогрел изучали в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo*, составляющие 18,8; 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно, которые в дальнейшем были приняты за терапевтические дозы. С целью визуализации и определения времени образования тромба использовали ультразвуковой аппарат «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург).

Метод генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза проводился согласно DiMinno G. (1983) на мышах. В качестве тромботического агента применяли смесь растворов коллагена и адреналина в дозах 0,5 мг/кг и 0,06 мг/кг соответственно. Соединения вводились внутрижелудочно за 2 часа до начала эксперимента в терапевтических дозах. С целью оценки влияния соединения и препаратов сравнения на тромбообразование проводилось морфологическое исследование органов животных и гистологическое изучение срезов легких, окрашенных гематоксилином и эозином с помощью цифровой камеры Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10².

В методе Global Thrombosis Test (по Горогу) исследуемое соединение в терапевтической дозе вводилось внутрижелудочно за 2 часа до забора крови из брюшной аорты. Полученный биологический материал помещали в пробирку Горога без использования стабилизаторов и консервантов крови. В качестве критерия оценки антитромботического действия соединения фиксировалось время окклюзии и время лизиса при помощи программного обеспечения GTTDraw2.3.

При моделировании тромбоза нижней полой вены крыс вещества вводились внутрижелудочно в терапевтических дозах за 2 часа до проведения манипуляции по перевязке вены на 1 см выше места ее бифуркации. Затем брюшная полость ушивалась и через 24 часа из вены извлекались тромбы и определялась их масса согласно методу [Henke P.K., 2007].

Изучение влияния соединения и препаратов сравнения на длительность кровотечения из хвостовой вены мышей проводилось по методу [Greene T.K., 2010] при внутрижелудочном введении в терапевтических дозах за 2 часа до начала эксперимента. Модель некоронарного инфаркта миокарда воспроизводили двукратным введением изопротеренола в область паховой складки крыс

² Выражаем глубокую признательность зав. кафедрой патологической анатомии, д.м.н. А.В.Смирнову за помощь в проведении морфологических исследований.

самцов в дозе 85 мг/кг с интервалом 24 часа [Mohamed A.R., 2014]. Антитромботическое действие соединения изучали на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990].

Изучение влияния соединения на процесс агрегации тромбоцитов в тесте *in vitro*, вызванной различными индукторами, проводили по методу Born G., в модификации Габбасова В.А. (1989). В качестве агонистов процесса агрегации тромбоцитов использовали АДФ и адреналин в концентрации 5 мкМ, коллаген - 4 мкг/мл, арахидоновую кислоту - 50 мкМ, тромбин в концентрации 0,5 ед/мл, PAR1-агонист – 30 мкМ, ристоцетин – 1,25 мг/мл, агонист тромбоксановых рецепторов - U46619 - 3 мкМ, фактор активации тромбоцитов – 10 мкМ. Исследования проводили на богатой тромбоцитами плазме (PRP) кроликов, а также на суспензии отмытых тромбоцитов.

При изучении действия веществ на пуриновые P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов использовали метод малоуглового светорассеяния [Сакаев М.Р., 2000]. Влияние соединения и вещества сравнения MRS-2179 на P2Y₁-рецепторы тромбоцитов изучали в концентрации 1 мкМ. В ходе исследования соединений на P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов введение тестируемых образцов проводилось в условиях *in vivo* внутрижелудочно за 2 часа до проведения эксперимента.

Изучение влияния соединения PY-1144 и ацетилсалициловой кислоты на уровень тромбоксана B₂ (TxB₂ – стабильный метаболит тромбоксана A₂) и 6-кето простагландина (PGF_{1α}) осуществлялось с использованием наборов ELISA kit (Enzo, США) [Rao M.L., 2014] на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200, спустя 2 часа после однократного внутрижелудочного введения тестируемых образцов.

Изучение влияния соединений на уровень внутриклеточного кальция проводили на суспензии отмытых тромбоцитов кроликов, индуцированных тромбином, в кальциевой (CaCl₂ 1мМ) и безкальциевой среде с добавлением флуоресцентного зонда Fura 2-AM, согласно методике [Ryu S.K., 2006] на планшетном ридере TECAN (Австрия).

Статистические расчеты проводили с помощью встроенных функций программы Microsoft Excel 2007 из пакета Office XP (Microsoft, США) (среднее арифметическое значение, стандартная ошибка средней арифметической), а также при использовании программы «Graph.Pad.Prism5.0» (США). Для статистической обработки данных скрининга использовали непараметрический метод попарного сравнения независимых групп с помощью критерия Манна-Уитни («Graph.Pad.Prism5.0»).

Достоверность эффективности соединения относительно препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела определяли с помощью критерия множественного сравнения one-way ANOVA с поправкой Бонферрони («Graph.Pad.Prism5.0»). Статистическую обработку, полученных при исследовании гистологических данных, проводили с использованием программы «Видео Тест Морфо-4».

В третьей главе приведены данные по поиску соединений с антиагрегантной и антиоксидантной активностью в ряду 26 новых производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель.

Таблица 1 - Влияние производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель, на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика и на перекисное окисление липидов (ПОЛ) *in vitro* (M±m)(n=6)

№ п/п	Шифр соединения	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов в концентрации 100 мкМ (M±m)	Антиоксидантная активность в концентрации 100 мкМ (M±m)
1.	РУ-873	91,9±4,31 [#]	61,8±3,41 [*]
2.	РУ-1144	91,9±2,53 [#]	87,6±6,52 ^{*@}
3.	РУ-1263	86,5±3,72 [#]	80,7±2,34 [*]
4.	РУП-46	86,1±2,85 [#]	36,8±5,21 ^{*@}
5.	РУП-76	84,4±6,36 [#]	35,4±4,54 ^{*@}
6.	РУС-193	84,3±4,39 [#]	87,0±6,65 ^{*@}
7.	РУ-871	82,0±6,33 [#]	73,8±2,23 [*]
8.	РУ-1261	80,0±8,11 [#]	67,9±5,13 [*]
9.	РУ-1249	77,7±6,61 [#]	77,2±7,85 [*]
10.	РУ-903	69,9±8,34 [*]	76,1±2,12 [*]
11.	РУП-66	69,8±7,91 [*]	36,3±4,65 ^{*@}
12.	РУ-1180	67,7±5,83 [*]	88,8±2,51 ^{*@}
13.	РУП-56	65,9±6,25 [*]	43,9±8,75 ^{*@}
14.	РУП-36	45,3±1,73 [*]	31,1±4,89 ^{*@}
15.	РУС-191	40,5±4,52 [*]	48,0±3,98 ^{*@}
16.	РУ-1250	36,4±5,53 [*]	0
17.	РУП-26	35,0±1,85 [#]	46,8±7,98 ^{*@}
18.	РУС-190	34,1±4,89 [#]	19,5±6,71 ^{*@}
19.	РУ-1265	27,9±5,37 [#]	87,6±7,12 ^{*@}
20.	РУП-2	27,3±4,33 [#]	61,7±3,67 [*]
21.	РУЧ-6	26,0±1,91 [#]	20,4±6,81 ^{*@}
22.	РУ-1260	19,4±7,02 [#]	65,4±5,45 [*]
23.	РУ-1251	13,7±4,80 [#]	0
24.	РУ-887	12,8±3,43 [#]	0
25.	РУС-198	9,1±3,53 [#]	30,1±5,15 ^{*@}
26.	РУЧ-2	3,7±0,46 [#]	49,6±6,49 ^{*@}
27.	Ацетилсалициловая кислота	53,1±4,40 [*]	-
28.	Дибунол	-	85,8±2,78 [*]

Примечание: * - (p≤0,05) изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни; # - (p≤0,05)- изменения статистически значимы по отношению к эффекту препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты; @ - (p≤0,05)- изменения статистически значимы по отношению к препарата сравнения дибунула; n-число тестируемых животных.

В результате проведенных исследований по влиянию на АДФ- индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* было выявлено 13 высокоактивных соединений. В ранее проведенных исследованиях установлена способность производных бензимидазола, содержащих в своей структуре пространственно затрудненный фенол, проявлять выраженную антиоксидантную активность [Nalini Santanam, 1995; P. Venkatesan, 2000; James S. Wright, 2001]. Именно поэтому, кроме исследования антиагрегантной активности, данные соединения были изучены в тесте аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ). В отношении ингибирования перекисного окисления липидов среди 26 изученных соединений выявлено 12 высокоактивных веществ, которые по своему эффекту были сравнимы с дибунолом (табл.1).

Далее было проведено исследование корреляционной зависимости антиагрегантной и антиоксидантной активности. В группе соединений с высокой антиагрегантной активностью наблюдалась положительная корреляционная зависимость по отношению ко второму виду активности (табл. 2). Коэффициент корреляции для данной группы составил 0,73. При сравнении других групп показатель не подтверждал корреляционную зависимость.

Таблица 2 - Ранжирование исследуемых веществ по показателям корреляции между антиагрегантной и антиоксидантной активностями на моделях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов *in vitro*.

Виды активности	Коэффициент корреляции		
	Высоко-активные	Умеренно-активные	Низко-активные
Антиагрегантная активность	0,730582	-0,65583	0,61985
Антиоксидантная активность			

Из веществ, проявивших наиболее высокую антиагрегантную активность, было выделено 3 соединения под шифром РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263, превосходящих препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту по IC_{50} антиагрегантной активности в 21,8; 20,3 и 22,6 раз соответственно. Также данные вещества оказывали сравнимое с дибунолом антиоксидантное действие.

Для определения соединения-лидера были проведены исследования *in vivo* на предмет ингибирования агрегации тромбоцитов среди трех соединений под шифром РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263, проявивших наибольшую антиагрегантную активность *in vitro*, с целью расчета ED_{50} . В результате было показано, что по данному показателю соединение РУ-1144 превосходит два других вещества и препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, а также сравнимо с клопидогрелом (рис. 1).

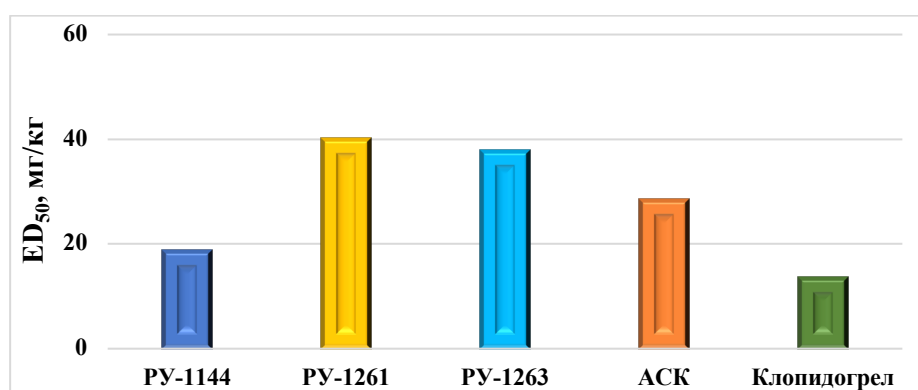


Рисунок 1. ED_{50} антиагрегантной активности соединения РУ-1144, РУ-1261, РУ-1263, ацетилсалициловой кислоты (АСК) и клопидогрела при однократном внутрижелудочном введении белым беспородным крысам самцам на модели АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов.

Наличие данных исследований *in vitro* и острой суточной токсичности позволили в дальнейшем рассчитать условную широту терапевтического действия (условный терапевтический индекс (УТИ)) (табл.

2). Исследуемое соединение РУ-1144 по значению УТИ превосходило ацетилсалициловую кислоту в 3,7 раза.

Таблица 3. Антиагрегантная активность (IC_{50}), величина острой суточной токсичности (LD_{50}), и условный терапевтический индекс (УТИ) РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты.

№ п/п	Тестируемые образцы	IC_{50} , мкМ	ED_{50} , мг/кг	LD_{50} , мг/кг	УТИ LD_{50}/ED_{50}
1.	РУ-1144	5,5	18,8	749,2	39,9
2.	Ацетилсалициловая кислота	120	28,5	310	10,9

Далее была изучена зависимость антиагрегантной активности от химической структуры соединений. Скаффолды на основе *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолов и *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов проявили выраженную антиагрегантную и антиоксидантную активности, превосходя скаффолды: *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолы, *C*-11-2,6-дитретбутил-1-гидроксифенил-2,3-тиадиазинобензимидазолы, *N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-*N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы и *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-триазолобензимидазолы. При смещении дитретбутильного радикала в положение в *N*-7; *N*-9 и *C*-11 в представленных группах происходило снижение антиагрегантной и антиоксидантной активности (рис.2).

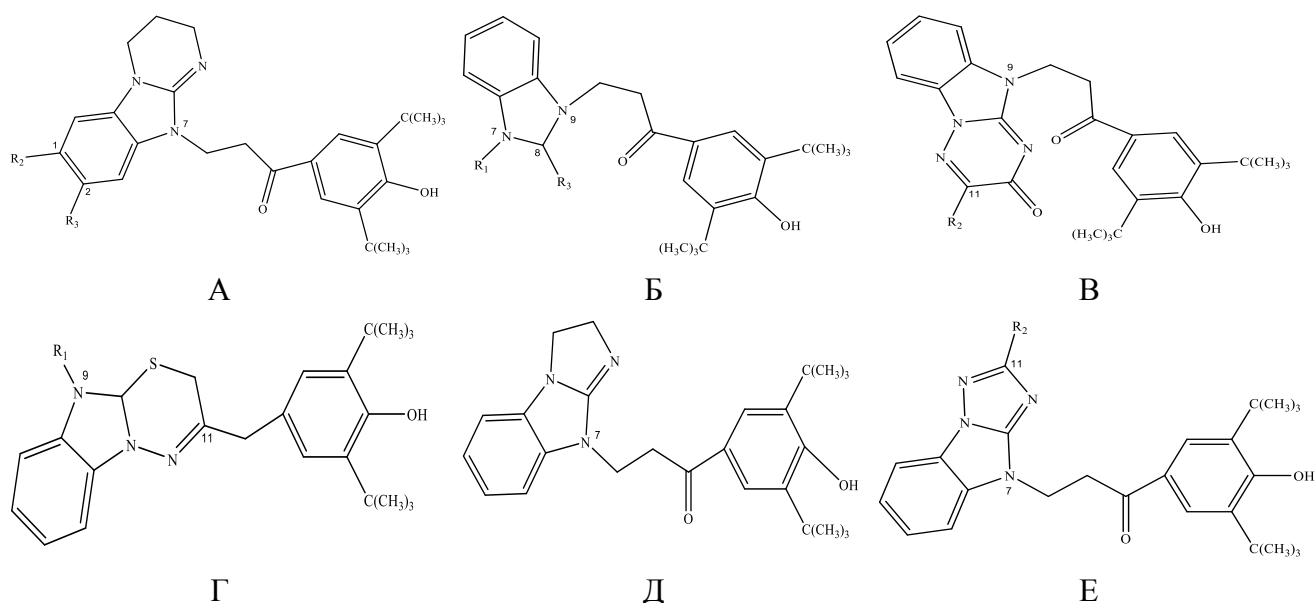


Рисунок 2. Общая формула производных *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолов (А), *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов (Б), *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолов (В), 11-2,6-дитретбутил-1-гидроксифенил-2,3-тиадиазинобензимидазолов (Г); *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-*N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолов (Д) и *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-триазолобензимидазолов (Е).

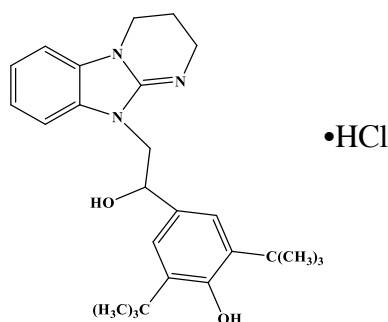


Рисунок 3. Структурная формула соединения РУ-1144 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил -пиримидобензимидазола гидрохлорид

Четвертая глава посвящена изучению антитромботического действия соединения РУ-1144 (рис.3) на моделях артериальных и венозного тромбозов. Так, при моделировании тромбоза сонной артерии аппликацией 50%-ным раствором хлорида железа (III) было установлено, что по величине ED₅₀ исследуемое соединение превосходило оба препарата сравнения - ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 3,5 раза. На модели тромбоза сонной артерии электрическим током по показателю ED₅₀ соединение РУ-1144 в 2,5 раза превосходило ацетилсалициловую кислоту и в 7,4 раза -клопидогрел (табл. 4).

В ходе изучения соединения РУ-1144 на модели Global Thrombosis Test (по Горюгу) была проведена оценка антитромботической и тромболитической активности. Соединение РУ-1144 приводило к достоверному увеличению времени образования тромба в 1,4 раза по сравнению с группой контроля. При этом показатель времени лизиса под действием соединения-лидера был сравним с контролем. Исследования, выполненные на данной модели тромбоза, подтверждают, что соединение РУ-1144 проявляет антитромботическое действие, но не вызывает лизис образовавшегося тромба.

Таблица 4. Антитромботическая активность соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на различных моделях артериальных тромбозов.

№ п/п	Тестируемые образцы	Тромбоз, индуцированный 50% р- ром хлорида железа (III)	Тромбоз, индуцированный, электрическим током
		ED ₅₀ , мг/кг	
1.	РУ-1144	37,8	6,7
2.	Ацетилсалициловая кислота	133,0	16,8
3.	Клопидогрел	132,0	49,6

Соединение РУ-1144 предотвращает гибель 80% животных на модели системного адреналин-коллагенового тромбоза в 1,3 и 1,6 раза превосходя препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел соответственно (рис.4).

При гистологическом изучении ткани легких мышей для исследования тромбов в сосудах был произведен расчет их площади и периметр. Было установлено, что по показателю средней площади тромбов на срезах легких мышей соединение РУ-1144 превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,2 и 1,3 раза соответственно.

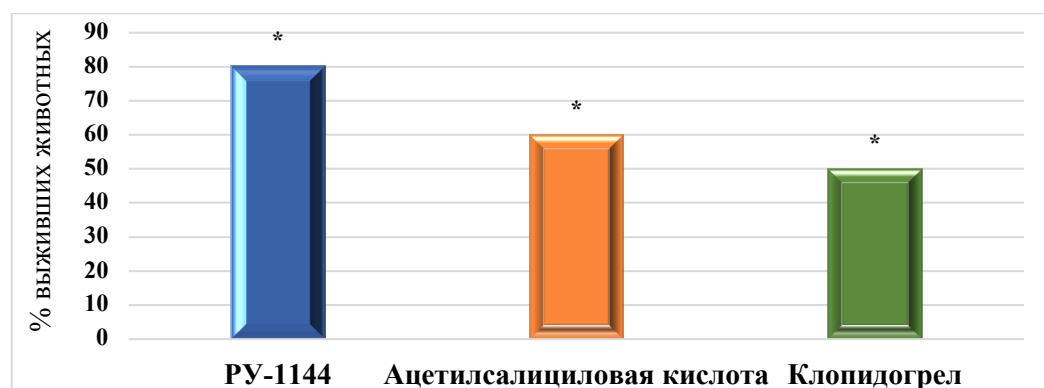


Рисунок 4. Влияние соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на выживаемость белых беспородных мышей на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза

*-изменения достоверны относительно контроля, критерий Фишера ($p < 0,05$)

Таким образом, выявленные изменения морфометрических параметров в целом соответствуют качественным структурным изменениям в сосудах легких, что свидетельствуют о более выраженной антитромботической активности соединения РУ-1144 по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом на модели адреналин-коллагенового артериального тромбоза у мышей.

В связи с высокой антитромботической активностью соединения РУ-1144 в отношении артериальных тромбозов представилось целесообразным исследовать данную активность на модели венозного тромбоза нижней полой вены крыс. В результате была также установлена высокая антитромботическая активность тестируемой субстанции при однократном внутрижелудочном введении. Соединение РУ-1144 в эффективной дозе (18,8 мг/кг) уменьшает среднюю массу венозных тромбов в 5,3 раза по сравнению со значениями, полученными в контроле, и при этом превосходит по антитромботической активности препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 3,5 и 1,9 раза соответственно. Таким образом, соединение РУ-1144 предотвращает патологические процессы не только в артериях, но и в венах.

При исследовании длительности кровотечения соединение РУ-1144 приводило к недостоверному относительно контроля увеличению данного параметра на 27,5 %. Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел статистически значимо пролонгировали время кровотечения на 67,2 и 62,0% соответственно (рис. 5).

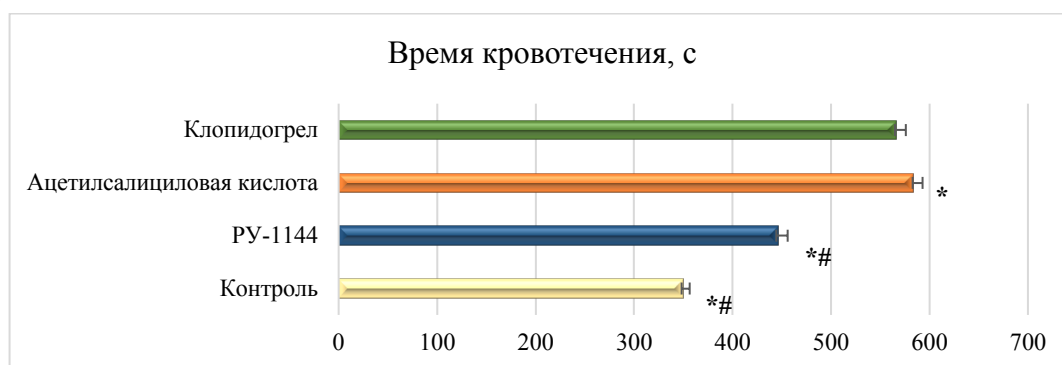


Рисунок 5. Влияние соединения РУ -1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей

*- изменения достоверны по отношению к контролю, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$)

#- изменения достоверны по отношению к препаратам сравнения, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$)

В условиях экспериментального некоронарогенного инфаркта миокарда при однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-1144 был выявлен достоверный выраженный антитромботический эффект на модели тромбоза сонной артерии крыс, вызванного аппликацией FeCl₃ (III). Среднее время окклюзии в группе животных, получавших тестируемое соединение, составило 19,8 мин, что на 47,7 % больше по сравнению с контрольной группой животных с инфарктом миокарда.

Пятая глава направлена на изучение механизма антиагрегантного действия соединения РУ-1144. В таблице 4 приведены значения IC₅₀ антиагрегантной активности РУ-1144 в отношении различных индукторов агрегации тромбоцитов.

При исследовании соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами, были получены данные, определяющие выраженную способность тестируемого образца РУ-1144 в методе *in vitro* оказывать антиагрегантное действие при использовании широкого спектра индукторов агрегации тромбоцитов. Наибольшую активность соединение РУ-1144 оказало в отношении агрегации тромбоцитов, вызванной такими индукторами, как АДФ, арахидоновая кислота, коллаген и фактора активации тромбоцитов (ФАТ), при этом показатель IC₅₀ антиагрегантной активности данного соединения составил 5,5; 1,9; 9,2 и 1,1 мкМ соответственно. Менее выражено данное вещество блокировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную PAR-1 рецепторами тромбоцитов, U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов), адреналином и тромбином (табл. 5)

Таблица 5. Антиагрегантное действие (IC₅₀) соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами

№ п/п	Индукторы агрегации тромбоцитов	Значение IC ₅₀ , мкМ
1.	ФАТ	1,1
2.	Арахидоновая кислота	1,9
3.	АДФ	5,5
4.	Коллаген	9,2
5.	PAR-1	17,8
6.	U46619	19,3
7.	Адреналин	51
8.	Тромбин	330
9.	Ристоцетин	-

"-" – не наблюдалось эффекта соединения РУ-1144 в отношении данного индуктора

При изучении методом малоуглового светорассеяния влияния соединения РУ-1144 на P2Y₁ рецепторы тромбоцитов было показано, что вещество в концентрации 1 мкМ ингибирует активацию тромбоцитов на 27,6% и уступает селективному антагонисту P2Y₁ рецепторов тромбоцитов MRS-2179 в 2,9 раза, что выражается в слабом влиянии исследуемого вещества на данный подтип рецептора.

На следующем этапе исследования было проведено изучение действия соединения РУ-1144 на P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов при однократном внутрижелудочном введении крысам. В результате было показано высокое ингибирующее действие исследуемого соединения в отношении P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов, однако по показателю ED₅₀ оно уступало препарату сравнения клопидогрелу в 2,7 раза.

При исследовании влияния соединения РУ-1144 на баланс продуктов арахидонового распада – тромбоксан В2 (стабильный метаболит тромбоксана А2) и 6-кето - простагландин было выявлено, что данное вещество приводит к снижению уровня выработки тромбоксана В2, превосходя препарат

сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2,3 раза, но, в отличие от препарата сравнения, повышает уровень 6-кето – простагландина и, вероятно, может увеличивать защитные свойства эндотелия (табл. 6).

Таблица 6. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на продукцию тромбоксана В₂ и 6-кето-простагландина в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* в тромбоцитах крыс, стимулированных арахидоновой кислотой (M±m) (n=6).

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ТxB ₂ , пкг/мл	Уровень PGF _{1α} , пкг/мл
1.	Контроль	-	9934,08±615,34	22093,67±988,10
2.	РУ-1144	18,8	7681,00±386,70*	25534,21±1643,29 [#]
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	4399,88±519,59*	12377,43±2799,76*

*-изменения достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA (поправка Бонферони) (p<0,0001)

[#]-изменения достоверны относительно ацетилсалициловой кислоты, критерий one-way ANOVA (поправка Бонферони) (p<0,0001)

Примечания: n-число животных в группе

В процессе агрегации тромбоцитов наиболее важным ее условием является выход ионов кальция из плотных гранул хранения тромбоцитов [Benimana O., 2017; Munzer P., 2017]. Принимая во внимание данный факт, важным этапом исследования было влияние соединения РУ-1144 на ингибирование пула ионов кальция. В результате было показано, что соединение РУ-1144 доза-зависимо снижает уровень общего и внутриклеточного кальция в суспензии тромбоцитов, активированных тромбином. При этом показатель IC₅₀ в кальциевой среде составил 27,8 мкМ (уровень общего кальция в тромбоцитах), а в безкальциевой среде - 55,4 мкМ (уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах). Результаты, полученные в ходе данного исследования, указывают на влияние тестируемого образца на секрецию внутриклеточного кальция (рис. 5).

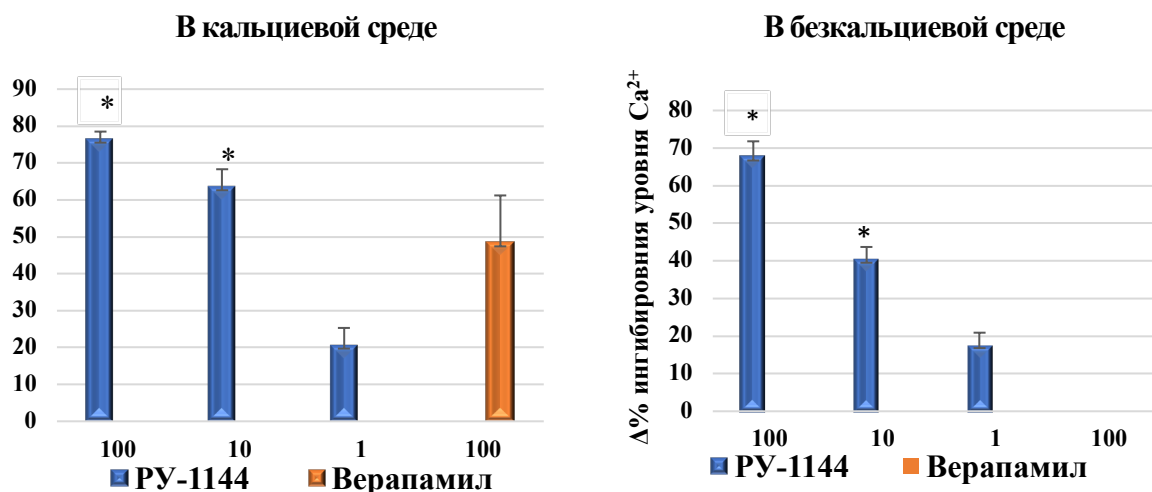


Рис. 5 Влияние соединения РУ-1144 на общий и внутриклеточный уровень кальция в тромбоцитах кроликов

Глава 6 описывает изучение общетоксических свойств соединения РУ-1144 с использованием метода С. Ирвина [Irwin S., 1964] в модификации Бугаевой Л.И. [Бугаева Л.И., 2012]. В результате проведённого исследования при однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-1144 было выявлено, что данное вещество в исследуемых дозах практически не вызывает изменений в

эмоциональном поведении животных, а также влияет на развитие побочных вегетативных эффектов в виде экзофтальма, птоза.

При изучении соединения РУ-1144 в максимальных дозах равных 400 и 600 мг/кг наблюдались изменения со стороны центральной нервной системы (снижение двигательной координации) и высшей нервной деятельности (заторможенные поведенческие реакции).

Таким образом, проведенные многотестовые исследования общетоксического действия соединения РУ-1144 позволяют сделать вывод об отсутствии выраженного токсического действия соединения в эффективной дозе (18,8 мг/кг), а также в дозах равных 50, 100 и 200 мг/кг. Увеличение дозы тестируемого образца РУ-1144 до 400 и 600 мг/кг приводит к снижению скорости реакций, заторможенности и седации животных.

Глава 7 посвящена обсуждению полученных результатов. В результате данного исследования была найдена группа соединений - производных пиримидобензимидазола, важным сходством которых стало наличие в положении R1 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил)-фенила, все представители данной группы проявляли как выраженную антиагрегантную, так и антиоксидантную активности. Наиболее высокоактивное соединение, которое является представителем данной группы является РУ-1144, которое и было выбрано для дальнейшего изучения.

При исследовании антитромботической активности соединения РУ-1144 была показана его высокая активность на различных моделях артериальных и венозного тромбозов.

Величина IC_{50} соединения РУ-1144 в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов, вызванной ФАТ составила 1,1 мкМ. Предполагается, что ФАТ не работает через сигнальные пути, транслирующие эффекты АДФ, адреналина и коллагена, а его способность вызывать вторую волну агрегации и секрецию реализуется, главным образом, с помощью циклооксигеназного пути. При исследовании агрегации тромбоцитов, вызванной арахидоновой кислотой, IC_{50} соединения РУ-1144 составила 1,9 мкМ, что указывает на способность ингибировать продукты арахидонового каскада. Действие АДФ в качестве индуктора опосредуется через связывание с $P2Y_{12}$ рецептором тромбоцитов, а данный рецептор играет ключевую роль в агрегации тромбоцитов и продукции тромбоксана A_2 . Данное вещество проявило высокую активность в отношении данного индуктора *in vitro*. Также соединение РУ-1144 проявило выраженное антиагрегантное действие, блокируя коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*.

При анализе влияния соединения РУ-1144 на уровень тромбоксана B_2 и уровень 6-кето-простагландина $F_{1\alpha}$ при исследовании с использованием ИФА-метода было показано, снижение уровня тромбоксана B_2 , и повышение уровня 6-кето-простагландина $F_{1\alpha}$ в отличие от ацетилсалициловой кислоты, которая, напротив, снижала данный показатель. При исследовании влияния соединения РУ-1144 на пуриновые рецепторы тромбоцитов, не наблюдалось выраженного действия на $P2Y_1$ подтип рецепторов тромбоцитов. Величина ED_{50} в отношении блокирования $P2Y_{12}$ рецепторов тромбоцитов соединения РУ-1144 и клопидогрела составили 16,9 и 6,1 мг/кг соответственно. При исследовании соединения РУ-1144 на уровень внутриклеточного кальция было показано дозозависимое ингибирование уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах, активированных тромбином в тест-системах в условиях кальциевой среды, а также при отсутствии кальция. Таким образом, можно предположить, что соединение

РУ-1144 проявляет комбинированное антиагрегантное действие, связанное с ингибированием синтеза тромбоксана A_2 , блокированием $P2Y_{12}$ рецепторов тромбоцитов, сочетающееся с антиоксидантной активностью.

Заключение

В результате данного исследования был найден новый класс гибридных скаффолдов сочетающих бензимидазол и дитетбутильный заместитель, проявляющих сочетанное антиагрегантное и антиоксидантное действие. Наличие доза-зависимого снижения амплитуды агрегации тромбоцитов позволило выявить 13 высокоактивных соединений. При изучении антиоксидантной активности производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель на модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов в дозировке 100 мкМ было показано, что 12 проявили высокий эффект, сравнимый с дибунолом. Согласно проведенным исследованиям наиболее активным соединением оказалось вещество РУ-1144. Поэтому для данных соединений были рассчитаны показатели ED_{50} , в результате чего выявлено соединение-лидер под шифром РУ-1144.

Для соединения РУ-1144 была рассчитана величина LD_{50} , которая составила 749,2 мг/кг. На основании этого согласно классификации токсичности лекарственных веществ при внутрибрюшинном пути введения, оно относится к 4 классу умеренно-токсичных веществ [Саноцкий И.В., 1975, Березовская И.В., 2003].

Соединение РУ-1144 было исследовано на различных моделях тромбозов, таких как артериальные тромбозы, индуцированные хлоридом железа (III) и электрическим током, генерализованном адреналин-коллагеновом тромбозе, венозном тромбозе и в условиях некоронарогенного инфаркта миокарда, где была показана его высокая антитромботическая активность, превосходящая препараты сравнения. Исследуемое соединение в меньшей степени удлиняло время кровотечения, чем в остальных группах, где вводились препараты сравнения.

В результате изучения механизма антиагрегантного действия соединения РУ-1144 по влиянию на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами, была продемонстрирована высокая способность в экспериментах *in vitro* оказывать защитное антиагрегационное действие на такие агонисты, как АДФ, арахидоновая кислота, коллаген и ФАТ.

Соединение РУ-1144 при однократном внутривенном введении блокирует $P2Y_{12}$ рецепторы тромбоцитов, снижает уровень тромбоксана B_2 в тромбоцитах, ингибирует уровень общего и внутриклеточного кальция в тромбоцитах.

Таким образом, можно сделать вывод, что соединение РУ-1144 проявляет выраженное поливалентное антиагрегантное действие, сочетающееся с антиоксидантной активностью, что делает его привлекательным для дальнейшего углубленного изучения в качестве средства с мультитаргетным механизмом действия для лечения и профилактики тромбообразования.

ВЫВОДЫ

1. Скаффолды на основе N-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолов и N-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов проявили выраженные антиагрегантную и антиоксидантную активности, превосходя скаффолды: N-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолы, C-11-2,6-дитретбутил-1-гидроксифенил-2,3-тиадиазинобензимидазолы, N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, N-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы и N-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-триазолобензимидазолы. При смещении дитретбутильного радикала из положения N-7; N-9 и C-11 в представленных группах происходило снижение антиагрегантной и антиоксидантной активности.
2. Соединение под шифром РУ-1144 (1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил)-фенил-пиримидобензимидазола гидрохлорид), в опытах *in vitro* оказывало выраженную антиагрегантную активность, превосходя препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 21,8 раз; при исследовании антиоксидантной активности, соединение-лидер уступало препарату сравнения дибунолу в 1,7 раз. По ингибированию внутрисосудистой агрегации тромбоцитов *in vivo* данное соединение превосходя ацетилсалициловую кислоту в 1,5 раза и незначительно уступая клопидогрелу на 30 %.
3. Соединение РУ-1144 оказывает выраженное антитромботическое действие на моделях артериальных тромбозов, индуцированных аппликацией хлорида железа (III) и электрического тока на сонную артерию крыс, превосходя в 3,5 и 2,5 раза соответственно по активности ацетилсалициловую кислоту и в 3,5 и 7,4 раза соответственно - препарат сравнения клопидогрел; а также предотвращает гибель 80% животных на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза на мышах, на модели венозного тромбоза, индуцированного полной перевязкой нижней поллой вены уменьшает массу образовавшихся тромбов в 3,4 и 1,9 раза по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом.
4. В условиях экспериментального некоронарогенного инфаркта миокарда, вызванного изопротеренолом на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс, соединение РУ-1144 проявляет более выраженное антитромботическое действие, в сравнении с группой животных с экспериментальной патологией, замедля образование тромба на 47,7 %.
5. Соединение РУ-1144 (по показателю IC₅₀) блокирует агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами: фактором активации тромбоцитов (ФАТ) - 1,1 мкМ, арахидоновой кислотой - 1,9 мкМ, АДФ-5,5 мкМ, коллагеном - 9,2 мкМ, PAR1 - 17,8 мкМ, агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 - 19,3 мкМ, адреналином - 51 мкМ и тромбином - 330 мкМ.
6. Соединение РУ-1144 на модели тромбоза по методу Горога (Global Thrombosis Test) в 1,4 раза увеличивает время образования тромба по сравнению с группой контрольных животных и не оказывает влияние на лизис образовавшегося сгустка.
7. Величина ED₅₀ в отношении блокирования P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов соединения РУ-1144 и клопидогрела составили 16,9 и 6,1 мг/кг соответственно; при исследовании влияния соединения-лидера на уровень TxB₂ в тромбоцитах, стимулированных арахидоновой кислотой установлено, что соединение превосходило ацетилсалициловую кислоту в 1,8 раз; исследуемое вещество повышало уровень 6-кето-простагландина F_{1α} в отличие от ацетилсалициловой кислоты,

которая напротив снижала данный показатель; а также уменьшало уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, активированных тромбином.

8. Соединение РУ-1144 оказывает менее выраженное влияние на время кровотечения из хвостовой вены мышей, чем препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел в 1,3 раза.

9. По величине показателя LD₅₀ (749,2 мг/кг) соединение РУ-1144 при внутрибрюшинном введении можно отнести к 4 классу малотоксичных веществ, которое не оказывает нейротоксического действия в дозах 18,8 мг/кг (ED₅₀), а также при ее увеличении в 2,7; 5,3 и 10,6 раз.

Практические рекомендации

1. Синтез и поиск антиагрегантных и антитромботических соединений среди гибридных структур бензимидазола, имеющих дитретбутильный радикал в молекулярном остове, является перспективным направлением.

2. Соединение РУ-1144 (1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил)-фенил-пиримидобензимидазола гидрохлорид) является перспективным соединением для детального доклинического изучения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ:

1. Антиагрегантная активность *in vitro* новых производных бензимидазола/ Кучерявенко А. Ф., Сиротенко В.С., **Гайдукова К. А.**, Матохин Д. Г., Спасов А. А., Диваева Л. Н., Анисимова В. А., Морковник А. С.//**Вестник ВолгГМУ**. - №1. - 2015. - С.89-92.

2. Прототропное равновесие в 1(11)H₂,3,4,5тетрагидро- [1,3]дiazепино[1,2a]бензимидазоле, синтез и фармакологические свойства его N замещенных производных/ Морковник А. С., Спасов А. А., Кузьменко Т. А., Кучерявенко А. Ф., Диваева Л. Н., Кошкин Ю. В., Анисимова В. А., Кузьмина Л. Г., Рогова Н. В., Кузнецова В. А., Чепляева Н. И., Соловьева О. А., Таран А. С., Воробьев Е. С., Алешин Д. А., Сиротенко В.С., **Гайдукова К. А.**, Богославцева М. В.//**Известия Академии наук. Серия химическая**".-2015.- №11. - С. 2622.

3. Производные 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]diazепино[1,2-a]-бензимидазола, обладающие антиагрегантной активностью/ Кучерявенко А.Ф., Салазникова О.А., Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**, Спасов А.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А., Анисимова В.А.//**Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**.-2015.- №8.- С. 9-13.

4. Антиагрегантная активность нового трициклического производного 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]diazепино[1,2-a]бензимидазола/ Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А., Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**, Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А., Морковник А. С.//**Экспериментальная и клиническая фармакология**.-2016.- №5.- Т. 79.- С. 29-32.

5. Антитромбогенная активность соединения ДАБ-15 на экспериментальных моделях артериального и венозного тромбозов / Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.** // **Тромбоз, гемостаз и реология**.- 2016.- № S3 (67).- С. 385-386.

6. Сравнительная антитромботическая активность нового производного индола, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела/ Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**, Суздалев К.Ф.// **Медицинский алфавит. Кардиология**.- 2016.- №11.- Т.1.- С. 20-24.

7. Антиагрегантная активность нового трициклического производного 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола/ Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А., **Гайдукова К.А.**, Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А., Морковник А.С., Сиротенко В.С., Спасов А.А.// **Экспериментальная и клиническая фармакология.** - 2016.- Т. 79.- № 5.- С. 29-32.
8. Синтез и фармакологическая активность трифторметилсодержащих имидазо[1,2-а]бензимидазолов/ Жуковская О.Н., Спасов А.А., Кузьменко Т.А., Морковник А.С., Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А., Салазникова О.А., **Гайдукова К.А.**, Кузнецова В.А., Бабков Д.А., Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., Ращенко А.И.//**Химико-фармацевтический журнал.** - 2018.- Т. 52.- № 5.- С. 3-9.
9. Synthesis and pharmacological activity of trifluoromethyl-containing imidazo[1,2-a]benzimidazoles/ Zhukovskaya O.N., Kuzmenko T.A., Morkovnik A.S., Anisimova V.A., Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Salaznikova O.A., **Gaidukova K.A.**, Kuznetsova V.A., Babkov D.A., Grechko O.Y., Eliseeva N.V., Rashchenko A.I.//**Pharmaceutical Chemistry Journal.** - 2018.- Т. 52.- № 5.- P. 385-391.
10. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., **Gaidukova K.A.**, Kosolapov V.A., Zhukovskaya O.N. Antiplatelet activity of new derivatives of benzimidazole containing sterically hindered phenolic group in their structure// *Research Results in Pharmacology.* - 6(1).-P. 1-9.
11. Бромиды 1-замещенных-3-{[2-(3,5-ди-трет-4-гидроксифенил)-2-оксоэтил]}-2-аминобензимидазолия, обладающие антиагрегантными и антиоксидантными свойствами Анисимова В.А., Жуковская О.Н., Петров В.И., Спасов А.А., Косолапов В.А., Кучерявенко А.Ф., **Гайдукова К.А.**, Сороцкий Д.В.// Патент на изобретение RU 2623439, 26.06.2017. Заявка № 2016140594 от 14.10.2016.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

1. Поиск новых соединений с антиагрегантной активностью среди производных бензиламинобензимидазолов/ Антонов А. С., Устинов Д. В., Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**//Материалы 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины».- 2014.- С. 252.
2. Антиагрегантная активность новых производных бензимидазола *in vivo*/ Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**// Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, посвященной 80-летию ВолгГМУ.- 2015.- С. 334-335.
3. Поиск новых соединений с антиагрегантной активностью среди производных diaзепинобензимидазола/ Сиротенко В.С., **Гайдукова К. А.**//Материалы XXI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области.- 2016.- С. 50-51.
4. Влияние трициклических производных бензимидазола на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*/ Сиротенко В.С., **Гайдукова К. А.**, Матохин Д. Г., Кучерявенко А. Ф., Спасов А. А., Анисимова В. А., Диваева Л. Н., Морковник А. С.// Материалы X Международной конференции "Микроциркуляция и гемореология" (Клиника и эксперимент: из лаборатории к постели больного). - Ярославль, 2015. - с. 91.
5. Антиагрегантное действие новых бензимидазолов, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель/ **Гайдукова К. А.**, Сиротенко В.С., Кучерявенко А. Ф.// Материалы 16 Научно-практической конференции с международным участием, Фармацевтическая наука и практика:

достижения, инновации, перспективы, Вестник Пермской государственной Фармацевтической академии.- Пермь.- 2015.-С. 31-32

6. Антиагрегантное действие новых производных бензимидазола/ **Гайдукова К. А.**, Сиротенко В.С., Кучерявенко А. Ф.// Материалы 18 Научно-практической конференции с международным участием, создание конкурентноспособных лекарственных средств-приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки, Вестник Пермской государственной Фармацевтической академии.- Пермь.- 2016.-С. 61-62

7. Антиагрегантное действие новых бензимидазолов, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель/ **Гайдукова К. А.**, Сиротенко В.С.// VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего».- Санкт-Петербург.- 2016.-С. 575-578

8. Антиагрегантная активность производных diazepino[1,2-a]benzimidazole/Сиротенко В.С., **Гайдукова К. А.**, Антонов А. С., Устинов Д. В.// Материалы X международной (XIX Всероссийской Пироговской конференции студентов и молодых ученых).- Москва.- 2015.- С.393.

9. Антитромбогенные свойства нового производного diazepinobenzimidazole/ Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**// Материалы XX Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. Тезисы докладов. Под общей редакцией В.И. Петрова.- 2016.- С. 39-41.

10. Поиск новых соединений с антиагрегантной активностью в ряду бензимидазолов/ Таха М.Х., Родионова Д.С., **Гайдукова К.А.**, Сиротенко В.С.// Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием. Под редакцией В.И. Петрова.- 2016.- С. 255-256.

11. Antiplatelet effects of new benzimidazoles with a shielded phenol/ **Гайдукова К.А.**// Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием.- 2017.- С. 755.

12. Влияние нового производного бензимидазола на уровень внутриклеточного кальция *in vitro*/ Сиротенко В.С., **Гайдукова К.А.**// Материалы XXII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области материалы докладов.- 2017.- С. 49-51.

13. Влияние новых антигликирующих соединений на деформируемость эритроцитов/ Султанова К.Т., **Гайдукова К.А.**, Наumenко Л.В.// Микроциркуляция и гемореология XI Международная научная конференция. Посвященная 100-летию со дня рождения академика А.М. Чернуха. Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова факультет фундаментальной медицины, Ярославский государственный медицинский университет, Международное общество по клинической гемореологии (ISCH).- 2017.- С. 45.

14. Антитромботическая активность соединения РУ-1144, проявляющего антиоксидантные свойства/ **Гайдукова К.А.**, Сиротенко В.С.// XXII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области. Материалы докладов.- 2017.- С. 21-22.

15. Поиск антагонистов PAR-1 рецепторов тромбоцитов в ряду новых производных бензимидазола/ Мирошников М.В., Кучерявенко А.Ф., **Гайдукова К.А.**// Микроциркуляция и гемореология XI Международная научная конференция. Посвященная 100-летию со дня рождения академика А.М. Чернуха. Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Московский

государственный университет им. М.В. Ломоносова факультет фундаментальной медицины, Ярославский государственный медицинский университет, Международное общество по клинической гемореологии (ISCH). - 2017.- С. 154.

16. Антитромботическая активность соединения РУ-1144, проявляющего антиоксидантные свойства/ **Гайдукова К.А.**, Сиротенко В.С.// XXII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области. Материалы докладов.- 2017.- С. 21-22.

17. Изучение антитромботической активности соединения РУ-1144 по методу Горога (модель GTT-Global Thrombosis Test)/ **Гайдукова К.А.**, Зайцева П.Д., Усков Г.М.// Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов.- 2018.- С. 372-373.

18. Исследование влияния нового производного бензимидазола соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами/ **Гайдукова К.А.**// XXIV Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области Материалы докладов.- 2019.- С. 21-22.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	- аденозиндифосфорная кислота
АСК	- ацетилсалициловая кислота
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
УТИ	- условный терапевтический индекс
ФАТ (PAF)	- фактор активации тромбоцитов
ЭГТА	- этиленгликольтетраацетат натрия
ED ₅₀	- эффективная доза, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов (продолжает время окклюзии сонной артерии) на 50%
IC ₅₀	- ингибирующая концентрация, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов на 50%
LD ₅₀	- средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы
P2Y	- пуриновые рецепторы тромбоцитов
PAR	- протеазо-активированные рецепторы
TxB ₂	- тромбоксан B ₂
U 46619	- агонист тромбоксановых рецепторов