

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Усков Георгий Михайлович

**Антикоагулянтные свойства новых конденсированных производных
триазола**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Кучерявенко Аида Фатиховна

Волгоград – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| ГЛАВА 1. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 14 |
| 1.1. Физиология и патология коагуляционного гемостаза..... | 14 |
| 1.2. Гетероциклические производные, оказывающие влияние на процессы коагуляции | 23 |
| 1.3. Конденсированные производные триазолопиримидина и триазолотриазина, как потенциально активные вещества для коррекции коагуляционного гемостаза | 26 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 30 |
| 2.1. Материалы исследований..... | 30 |
| 2.2. Методы исследования..... | 47 |
| 2.2.1. Метод влияния на параметры коагулограммы <i>in vitro</i> | 47 |
| 2.2.2. Метод проведения подструктурного анализа зависимости прямой антикоагулянтной активности соединений. | 48 |
| 2.2.3. Метод изучения цитотоксичности..... | 57 |
| 2.2.4. Метод исследования влияния на параметры коагулограммы <i>ex vivo</i> | 58 |
| 2.2.5. Метод тромбоэластографии | 59 |
| 2.2.6. Модель тромбоза нижней полой вены | 59 |
| 2.2.7. Модель тромбоза бедренной вены крыс, индуцированного хлоридом железа | 60 |
| 2.2.8. Модель тромбин-индуцированного тромбоза с проведением морфологических исследований..... | 61 |
| 2.2.9. Модель Global Thrombosis Test (тест по Горогу)..... | 62 |
| 2.2.10. Определения ингибитора фактора IIa с использованием хромогена S-2238 <i>ex vivo</i> | 63 |

| | |
|---|----|
| 2.2.11. Метод исследования влияния на уровень Па фактора в плазме крыс <i>ex vivo</i> | 64 |
| 2.2.12. Методика изучения влияния на разведенное тромбиновое время с помощью Hemoslot kit теста | 65 |
| 2.2.13. Методика изучения влияния на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином..... | 66 |
| 2.2.14. Методика изучения влияния на параметры коагулограммы и тромбоэластограммы в условиях гиперцитокинемии <i>in vitro</i> и <i>ex vivo</i> | 67 |
| 2.2.15. Исследование соединения-лидера на модели ЛПС-индуцированного тромбоза легких с проведением морфологических исследований | 67 |
| 2.2.16. Метод исследования общетоксических свойств по методу Irwin S..... | 68 |
| 2.2.17. Метод исследования острой токсичности (LD ₅₀)..... | 71 |
| 2.2.18. Статистический анализ..... | 71 |
| ГЛАВА 3. ПОИСК ВЕЩЕСТВ С АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛО[1,5-<i>a</i>]ПИРИМИДИНОВ И ТРИАЗОЛО[5,1-<i>c</i>][1,2,4]ТРИАЗИНОВ <i>IN VITRO</i> | |
| 73 | |
| 3.1. Поиск активных соединений по влиянию на параметры коагулограммы (АЧТВ, тромбиновое время, протромбиновое время) <i>in vitro</i> | 73 |
| 3.2. Подструктурный анализ зависимости прямой антикоагулянтной активности производных [1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1- <i>c</i>][1,2,4]триазины..... | 80 |
| 3.2.1. База данных по структуре и прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1- <i>c</i>][1,2,4]триазины..... | 80 |
| 3.2.2. Статистическая оценка значимости влияния структурных фрагментов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1- <i>c</i>][1,2,4]триазины на уровень их прямой антикоагулянтной активности..... | 81 |

| | |
|---|-----|
| 3.3. Изучение наиболее активных соединений по влиянию на параметры коагулограммы (АЧТВ, тромбиновое время, протромбиновое время) <i>ex vivo</i> | 93 |
| 3.4. Изучение цитотоксичности соединения HC-NAR-0273b | 94 |
| 3.5. Изучение острой токсичности (LD ₅₀) соединения HC-NAR-0273b | 97 |
| Заключение | 97 |
| ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ HC-NAR-0273b НА ПРОЦЕССЫ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ | 100 |
| 4.1 Влияние соединения HC-NAR-0273b на выживаемость мышей в условиях тромбин-индуцированного тромбоза легких | 100 |
| 4.2 Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b на модели тромбоза нижней полой вены | 105 |
| 4.3. Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b на модели тромбоза бедренной вены крыс, индуцированного аппликацией хлорида железа | 108 |
| 4.4. Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b на модели тромбоза по Горогу | 109 |
| Заключение | 111 |
| ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА АНТИКОАГУЛЯНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ HC-NAR-0273b..... | 113 |
| 5.1. Влияние соединения HC-NAR-0273b на способность связывать фактор Па на хромогенном субстрате S-2238 <i>in vivo</i> | 113 |
| 5.2. Изучение способности соединения HC-NAR-0273b связывать Па фактор методом ИФА | 116 |
| 5.3. Влияние соединения HC-NAR-0273b на разведенное тромбиновое время с помощью Hemoslot kit теста | 117 |
| 5.4. Влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры тромбоэластограммы .. | 118 |

| | |
|--|-----|
| 5.5. Действие соединения HC-NAR-0273b на агрегацию тромбоцитов, вызванную тромбином..... | 120 |
| Заключение | 121 |
| ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ HC-NAR-0273b В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЦИТОКИНЕМИИ | 122 |
| 6.1. Влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры коагулограммы в условиях гиперцитокинемии <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 123 |
| 6.2. Изучение антикоагулянтной активности соединения HC-NAR-0273b по влиянию на параметры тромбоэластографии без и в условиях гиперцитокинемии <i>ex</i> | 126 |
| 6.3. Влияние соединения HC-NAR-0273b на выживаемость мышей при моделировании ЛПС - индуцированного тромбоза легких на мышах | 130 |
| Заключение | 135 |
| ГЛАВА 7. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ HC-NAR-0273b ПО МЕТОДУ IRWIN S | 137 |
| 7.1. Влияние соединения HC-NAR-0273b при внутрижелудочном введении на эмоциональный статус, нервно-мышечную возбудимость, рефлексy и двигательную координацию..... | 137 |
| 7.2. Изучение поведенческой реакции мышей (тест «открытое поле») при внутрижелудочном введении соединения HC-NAR-0273b | 140 |
| 7.3. Влияние соединения HC-NAR-0273b на вегетативную функцию нервной системы..... | 143 |
| Заключение | 144 |
| ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 145 |
| Выводы: | 153 |
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 155 |

| | |
|------------------------|-----|
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 157 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А | 179 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность 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 (Vickmann J.K., 2017; 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 защитными 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 PGI_2 , которое подавляет активацию и адгезию лейкоцитов. Генерация тромбина приводит к образованию фибрина, активации тромбоцитов и эндотелиальных клеток через PAR-1 рецепторы, что вызывает увеличение фактора фон Виллебранда (VWF), усиливает воспаление, вызывая активацию Р-селектина, активирует лейкоциты и гладкие мышцы эндотелия, что приводит к развитию цитокинового шторма (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).

Следовательно, 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 частый мониторинг 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.

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 изученных 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. Найдены 11 структурных заместителей, положительно влияющих на высокий уровень прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-

a]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина. По результатам проведенного анализа заместитель $R_4 = -CH_3$ является наиболее значимым положительно влияющим на уровень прямой антикоагулянтной активности.

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

Научно-практическая значимость работы

Результаты выявленной зависимости между антикоагулянтной активностью новых конденсированных производных триазоло[1,5-а]пиримидинов и их химической структурой могут служить основой для направленного поиска новых антикоагулянтных соединений и дают возможность раскрыть аспекты их механизма действия на патогенетические звенья коагуляционного звена гемостаза. Впервые были получены экспериментальные данные об антитромбогенной активности соединения НС-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 НС-NAR-0273b, связанный с ингибированием IIa 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 НС-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 созданных коллективом авторов (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 мышцах 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 над различными видами 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; 79 и 80-й открытой научно-практической конференции 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 специфической фармакологической активности и механизма антикоагулянтного действия нового конденсированного производного триазоло[1,5-*a*]пиримидина – соединения НС-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.

ГЛАВА 1. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Физиология и патология коагуляционного гемостаза

Гемостаз - биологическая система организма, обеспечивающая сохранение жидкого состояния крови и остановку кровотечений в результате образования тромба. Нарушение регуляции этого процесса может привести к обильному кровотечению или тромбозу (Al-Horani R.A., 2018).

Коагуляционный гемостаз обеспечивает образование фибринового сгустка в месте повреждения стенки сосуда и является многоступенчатым ферментативным процессом (He S., 2021) Он представлен внутренним, внешним и общим путями свертывания, где главными участниками являются факторы свертывания крови, последовательно взаимодействующие друг с другом, переходя из неактивного состояния в активное.

По данным статьи Palta S. внутренний механизм коагуляционного свертывания крови начинается с активации XII фактора, который при активации действует на XI фактор (FXI). Далее активированный XIa фактор действует на IX фактор (FIX) и в результате активированный IXa фактор активирует X (Palta S., 2014).

Внешний механизм свертывания крови начинается с активации X фактора комплексом тканевого и VIIa факторов. После разрыва кровеносного сосуда кровь подвергается воздействию экспрессирующих тканевой фактор клеток, присутствующих в субэндотелиальной ткани или внеклеточном матриксе. Циркулирующий активированный фактор VIIa (FVIIa) связывается с тканевым фактором с образованием комплекса FVIIa-TF, который активирует FIX и FX. Фактор Xa (FXa) может активировать большее количество FVII до FVIIa, ускоряя начало коагуляции (Sang Y., 2021).

Внутренний и внешний пути сходятся на активации фактора X, запуская тем самым общий механизм коагуляционного гемостаза, при котором фактор Xa активирует протромбин (фактор II) с последующим превращением его в тромбин (фактор IIa) и далее в фибриноген. После этого фибрин-мономеры полимеризуются

в фибрин-полимеры и при участии ионов кальция фибрин превращается в нерастворимую форму (рисунок 1.1.).

Таким образом, в каскаде коагуляции тромбин играет роль финального ключевого медиатора, который протеолитически расщепляет фибриноген, высвобождая фибринопептиды для образования фибрина, а затем полимеризуется с образованием гемостатической пробки на месте повреждения сосуда.



Рисунок 1.1 - Схема коагуляционного гемостаза (Воробьева Н.А., 2019)

В тоже время избыток тромбина связывается с тромбомодулином, активирует физиологические антикоагулянты – протеины С и S и приводит к активации фибринолиза. Таким образом, эндогенные антикоагулянты играют важную роль для поддержания жидкого состояния крови (Kubier A., 2012).

Основными физиологическими антикоагулянтами являются: антитромбин III (АТ), гепарин, кофактор гепарина II, протеин С, протеин S, тромбомодулин и ингибитор тканевого фактора (TFI). Антитромбин, присутствующий в плазме человека, образует стабильные комплексы преимущественно с тромбином и FXa, а также в меньшей степени с факторами FIXa, FXIa, FXIIa и калликреином (Bravo-Rérez С., 2019). Гепарин, являясь сульфатированным полисахаридом, может ускорить эту инактивацию факторов свертывания с помощью АТ. Кофактор гепарина II ингибирует тромбин (но не другие сериновые протеазы) и в присутствии полианионных молекул, таких как гепарины и дерматансульфат, является слабым антикоагулянтом (Нou С., 2021).

Другим эндогенным антикоагулянтом является эндотелиальный протеин С (EPC) (витамин-К-зависимая серин-амидаза), который активируется тромбином, связанным с тромбомодулином (ТМ) на поверхности эндотелия. EPC инактивирует FVa и FVIIIa (Нepner M., 2013; Oto J., 2020). В крупных кровеносных сосудах рецептор эндотелиального протеина С (EPCR) поддерживает активацию протеина С, локализуя протеин С на поверхности эндотелиальных клеток и представляя его близлежащему комплексу тромбин-тромбомодулин инактивирующей факторы VIIa и Va. Кофактором EPC является протеин S (Shahzad K., 2019). Также физиологическим антикоагулянтом является тромбомодулин, который является гликопротеином цитоплазматической мембраны эндотелия (Weiler H., 2003). Тромбомодулин связывает и инактивирует тромбин (Ito T., 2016). α 2-Макроглобулин - белок, выполняющий функцию связывания активированных компонентов свертывающей системы крови (Garcia-Ferrer I., 2017). Кроме того, ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) связывается с активным центром FXa и ингибирует его активность (Peraramelli S., 2016). Впоследствии комплекс TFPI-FXa взаимодействует с комплексом TF-FVIIa, тем самым ингибируя его активность. Белок S, присутствующий как в плазме, так и в α -гранулах тромбоцитов, является кофактором TFPI, способствуя взаимодействию между полноразмерным TFPI и

FXa (Hackeng T.M., 2009). Таким образом, TFP1 останавливает коагуляционный каскад, связываясь с комплексом «TF-VIIa-Xa» (Ellery P.E., 2014).

Существуют многочисленные нарушения системы свертывания крови. Так, может быть усиление свертываемости крови, так называемая гиперкоагуляция, а также ее снижение - гипокоагуляция. (Литвицкий П.Ф., 2014).

Наиболее частым осложнением со стороны свертывающей системы крови является тромботический синдром - состояние, характеризующееся гиперкоагуляцией крови и тромбообразованием. (Тагер А.Т., 2018). Патогенез венозных тромбоэмболических осложнений был сформулирован немецким учёным Р. Вирховым (Лобастов К.В., 2019). Он связан с повреждением сосудистой стенки, замедлением кровотока и нарушением свёртывающих свойств крови. Все факторы, связанные с патогенезом венозных тромбоэмболических осложнений, могут быть врождёнными и приобретёнными. К врожденным факторам относят дефицит таких компонентов противосвёртывающей системы, как протеина С и антитромбина, а также генетические мутации. К приобретенным факторам относятся различные хирургические вмешательства, при которых повреждаются стенки вен, в кровь выбрасывается тканевого тромбопластин и запускается каскад коагуляции. (Ruiz-Tovar J., 2017; Miyoshi R., 2018; Kitano D., 2021). Риск тромбоза возрастает при увеличении продолжительности оперативного вмешательства, тяжести травмы, длительности иммобилизации. Также с высоким риском большие ортопедические операции на нижних конечностях по замене суставов, а также при остеосинтезе сопряжены с высоким риском венозной тромбоэмболии (van Adrichem R.A., 2014; Kafeza M., 2017).

Хорошо известен высокий риск развития флеботромбоза у больных с онкологическими заболеваниями (Afzal A., 2020; Cohen O., 2021). Наличие злокачественного новообразования в сочетании с гипоксией, воспалением, контактом клеток крови с опухолевыми клетками, которые выделяют в нее прокоагулянтные компоненты, приводит к нарушению в системе гемостаза. Прокоагулянтные компоненты - тканевой фактор и тромбин активируют каскад

коагуляции. Известно, что при наличии онко-заболевания риск смерти от венозных тромбоэмболических осложнений повышается в 2-8 раз (Mahajan A., 2019).

Наиболее высок риск развития тромбоэмболических осложнений при инсультах, а также у больных с параличом вследствие повреждения спинного мозга (Coutinho J.M., 2015; Ji K., 2021).

Также велика вероятность тромбообразования у пациентов с хроническими аутоиммунными и воспалительными заболеваниями (Zervou M.I., 2021). При этих заболеваниях негативную роль играют гемореологические расстройства, связанные с повышением содержания белков острой фазы (фибриноген, аутоиммунные комплексы и др.), приводящие к повышению вязкости крови (Belfeki N., 2018).

Возникающее при хронической сердечной недостаточности замедление кровотока вследствие снижения фракции выброса, а также повышения вязкости крови вследствие постоянного использования мочегонных средств также может приводить к тромбозам (Goldhaber S.Z., 2020).

На любых сроках беременности, а также в послеродовом периоде возможно развитие острых и обострение хронических заболеваний, которые нередко требуют оперативных вмешательств. И здесь высока вероятность развития венозного тромбоза и лёгочной эмболии (Ataullakhanov F.I., 2016; Rottenstreich A., 2020). Это связано с тем, что в течении беременности происходит увеличение в плазме фибриногена, VII, VIII и IX факторов свёртывания. Поэтому, риск венозного тромбоза во время беременности повышается в 5—10 раз (Struble E., 2015. Makatsariya A., 2022).

Частым осложнением протекания вирусных и бактериальных инфекций является гиперцитокинемия, связанная с выраженной реакцией иммунной системы (Wong, J. P., 2017; 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, которые подавляют активацию и адгезию лейкоцитов. Генерация тромбина приводит к образованию фибрина, активации тромбоцитов и эндотелиальных клеток через PAR-1 рецепторы, что

вызывает увеличение фактора фон Виллебранда (vWF), усиливает воспаление, вызывая активацию Р-селектина, активирует лейкоциты и гладкие мышцы эндотелия, что приводит к развитию цитокинового шторма (Mitchell W.B., 2020). Следовательно, системная дисфункция эндотелия и коагулопатия при вирусных и бактериальных инфекциях ассоциированы с повышением риска летального исхода (Llitjos J.F., 2020; Klok F.A., 2020).

Также к приобретенным факторам риска относится ожирение, пожилой возраст, наличие варикозно-расширенных вен, приём гормональных противозачаточных средств и препаратов гормонзаместительной терапии (Santos M.E., 2006; Lentz S.R., 2016; Pendyal A., 2017; Tiwari A., 2018; Gialeraki A., 2018).

Исходя из вышеизложенного проблема предупреждения тромбообразования занимает центральное место в современной клинической практике.

Фармакологическая регуляция повышенной свертываемости крови (антикоагулянтные средства)

Для предотвращения тромбообразования используются антикоагулянтные средства. В 40-х годах XX века создание гепарина и оральных антикоагулянтов позволяет использовать их в настоящее время (Jorpes E., 1959). Гепарин и его производные, включая низкомолекулярные гепарины и гепариноподобный пентасахарид (фондапаринукс), являются наиболее широко используемыми антикоагулянтами в мире (Guerrini M., 2012; Onishi A., 2016). Данные препараты связывают антитромбин, гликопротеин плазмы человека, для ускорения ингибирования одного или нескольких ферментов каскада свертывания, включая тромбин, фактор Ха и фактор IXa. Ингибирование происходит чрезвычайно быстро и количественно, что делает гепарины очень эффективными антикоагулянтами. Ключевая проблема в использовании этих препаратов является значительно повышенный риск кровотечения и возможность гепарин-индуцированной тромбоцитопении. (Morische S.K., 2020; Pishko A.M., 2021). Оказалось, что гепарин также способен влиять на структуру костной ткани и вызывать развитие остеопороза (Signorelli S.S., 2019). Кроме того, высокая вариабельность ответа

между пациентами и отсутствие пероральной биодоступности, делают гепарин не идеальным антикоагулянтом. Другой традиционный антикоагулянт - варфарин, антагонист витамина К, который используется более 50 лет (Trutyak R.I., 2016). Механически антагонисты витамина К ингибируют эпоксидредуктазу витамина К, являющийся ключевым ферментом и участвующий в цикле витамина К, который важен для образования остатков γ -карбоксихлутаминовой кислоты в тромбине и других ферментов каскада свертывания. Основное преимущество варфарина заключается в том, что его легко производить синтетически и он биодоступен при пероральном введении. Тем не менее, во время лечения варфарином следует учитывать множество проблем и соблюдать меры предосторожности. Во-первых, варфарин взаимодействует с другими лекарствами (например, противогрибковыми, антибиотиками и гиполипидемическими средствами), алкоголем и пищевыми продуктами (например, зелеными овощами, гинкго, чесноком и т.д.) (Leite P.M., 2016; Tan C.S.S., 2021). Во-вторых, из-за узкого терапевтического диапазона он вызывает сильное кровотечение (Srivastava K., 2021). В-третьих, требуется частый мониторинг МНО для корректировки дозы, поэтому у пациентов может быть неадекватная антикоагулянтная терапия.

Использование низкомолекулярных гепаринов, которые блокировали фактор Ха, а не тромбин, хотя влияли и на тот и на другой фактор одновременно, навели ученых на мысль о разработке препаратов, действующих избирательно на один из факторов. Блокирование одной молекулы Ха фактора предотвращало образование более тысячи молекул тромбина. Первым в мире препаратом, блокирующим Ха фактор для перорального приема стал ривароксабан Одновременно был создан прямой ингибитор тромбина - дабигатрана этексилат Следующим блокатором фактора Ха стал препарат апиксабан. Данные средства имеют свои преимущества перед варфарином, так как они не требуют лабораторного контроля и имеют стандартную дозу. (Бокарев И.Н., 2016).

Тромбин представляет собой сериновую протеазу, которая играет важную роль в процессах коагуляции и является привлекательной мишенью для разработки

новых лекарств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Работа по нацеливанию на тромбин привела к появлению единственного прямого орального ингибитора тромбина дабигатрана этексилата, который получил одобрение FDA для профилактики инсульта при фибрилляции предсердий, лечение тромбоза глубоких вен (Di Minno A., 2017; Beyer-Westendorf J., 2021). Дабигатрана этексилат обладает высоким сродством к тромбину и является пероральным непептидным пролекарством. Под действием эстераз он быстро превращается в активное лекарственное средство дабигатран. Однако дабигатран непосредственно ингибирует как свободный, так и связанный сгустком тромбин, имеет относительно низкую биодоступность (около 6%), что влечет за собой необходимость назначения высоких доз препарата для поддержания его терапевтической концентрации в плазме крови (Stangier J., 2008).

Ха фактор является точкой соединения внутреннего и внешнего путей коагуляции. Из этого следует, что его ингибирование может быть полезным для подавления внутренних и внешних путей. Усилия, направленные на поиск соединений, подавляющих Ха фактор, привели к разработке ривароксабана, аписабана, эдоксабана и бетриксабана (Proietti M., 2018; Scott L.J., 2020).

Ривароксабан является пероральным прямым ингибитором фактора Ха. В отличие от дабигатрана он имеет высокую биодоступность, сильно связывается с белками и мало взаимодействует с лекарственными средствами (Stampfuss J., 2013). Он селективен в отношении фактора Ха по отношению к другим сериновым протеазам. На основании фармакокинетических исследований, прием 10 мг ривароксабана один раз в день обеспечивает наилучший профиль эффективности, позволяя избежать чрезмерных кровотечений (Polyantsev A.A., 2018). У пациентов с фибрилляцией предсердий рекомендуемая доза ривароксабана составляет 20 мг в день (Mohammed I., 2012; Samama C.M., 2020). Ривароксабан не индуцирует и не ингибирует CYP450. Применение сильнодействующих ингибиторов ферментов CYP3A4/5 и P-гликопротеина (таких как ритонавир, кетоконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол и др.) повышает концентрацию ривароксабана в плазме

в среднем в 2,6 раза, значительно повышая его фармакодинамику и риск кровотечения (Raymond J., 2021).

Апиксабан - пероральный прямой ингибитор фактора Ха тоже с высокой пероральной биодоступностью (80%), сильно связывается с белками, достигает максимальной концентрации в плазме в течение 2–3 часов после приема и имеет ограниченный потенциал взаимодействия с лекарственными средствами (Byon W., 2019). Апиксабан 2,5 мг два раза в день - рекомендуемая доза для профилактики венозной тромбоемболии, основанная на фармакокинетических исследованиях (Byon W., 2018). У пациентов, получавших апиксабан 2,5 мг два раза в день для профилактики венозной тромбоемболии, на риск большого кровотечения не влияла функция почек (Koebl J.L., 2020). Апиксабан был одобрен для профилактики венозной тромбоемболии после операции по замене тазобедренного и коленного суставов. Апиксабан превосходит дозу варфарина в предотвращении инсульта и системной эмболии, с уменьшением кровотечений и более низкой смертностью (Stanifer J.W., 2020).

Эдоксабан, прямой пероральный ингибитор Ха фактора, имеет линейный фармакокинетический профиль и принимается один раз в сутки (Cervantes S.E., 2019). В отличие от апиксабана и ривароксабана эдоксабан не взаимодействует с системой цитохрома P450. Однако профиль побочных эффектов эдоксабана может ограничивать использование препарата в клинической практике; в клинических исследованиях у пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) с клиренсом креатинина ≥ 95 мл/мин частота инсультов была выше при применении эдоксабана по сравнению с варфарином (Poulakos M., 2017).

Бетриксабан (бевикса) также является прямым ингибитором Ха фактора, который принимают внутрь один раз в день. Всасывание бетриксабана происходит быстро, и средние пиковые концентрации достигаются через 3–4 часа после приема. Он показывает небольшое изменение концентрации от пика до минимума в течение 24-часового интервала дозирования. Бетриксабан преимущественно выводится в неизменном виде с желчью (Turpie A.G., 2009). Бетриксабан

используют для внутрибольничной и продолжительной профилактики венозной тромбоземболии у пациентов старше 75 лет, госпитализированных по причине острого заболевания и находящихся в группе риска тромбоземболических осложнений (сердечная недостаточность, дыхательная недостаточность, инфекционное заболевание, ревматическая болезнь, ишемический инсульт) (Sylvester K.W., 2018).

Новые пероральные антикоагулянты в значительной степени заменили варфарин для долгосрочной терапии, предлагая медицинским работникам более удобные и безопасные варианты лечения (Franco Moreno A.I., 2018; Barr D., 2019; Renon F., 2021). 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). Кроме того, последние клинические исследования по всему миру продемонстрировали, что прекращение приема ривароксабана и апиксабана, могут вызвать тромбоземболические явления (Keaton C., 2014). Поэтому одной из важных задач в фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, в частности в решении проблем предотвращения состояний, связанных с венозными тромбозами и их осложнениями, является поиск, изучение и создание новых оральных антикоагулянтных средств с наименьшей степенью риска развития побочных эффектов.

1.2. Гетероциклические производные, оказывающие влияние на процессы коагуляции

Гетероциклические производные находят широкое применение. Изучение их молекулярной структуры и физико-химических свойств может способствовать пониманию взаимосвязи между структурой и активностью и биологическими свойствами новых антикоагулянтов.

При разработке новых антикоагулянтных препаратов наиболее привлекательными мишенями в современной фармакологии являются Ха, XIa факторы и тромбин. Так, в настоящее время в ряду пиролло-хинолинов выявлены

активные соединения, ингибирующие Ха, XIa факторы (Novichikhina N., 2020). Дизайн лекарств на основе структуры и свойств был использован в синтезе ингибиторов Ха фактора на основе сульфонамидопирролидин-2-она, включающих биарильные группы R₄, с получением сильнодействующих ингибиторов с обнадеживающими пероральными фармакокинетическими профилями и значительной, но неоптимальной антикоагулянтной активностью (Young, R.J., 2008).

Разработан и синтезирован ряд новых производных 2,7-дизамещенных тетрагидроизохинолинов. Среди этих производных были выявлены соединения, проявляющие мощную блокирующую активность в отношении фактора Ха и хорошую селективность в отношении других сериновых протеаз (тромбина, плазмина и трипсина) (Ueno H., 2005).

Также некоторые фторированные производные 1,2,5-тризамещенного бензимидазола проявляют выраженную антикоагулянтную активность, а именно являются потенциальными антитромбиновыми агентами (Bansal Y., 2012; Yang, H., 2016). В ряду производных изохинолина обнаружены ингибиторы Ха фактора (Quan M.L., 1999).

Синтезирована серия новых мощных ингибиторов FXa на основе антраниламидного каркаса. В настоящее время продолжается модификация данной структуры для улучшения антитромботической активности (Wang W., 2016).

Амидинсодержащие производные являются мощными ингибиторами Ха фактора. Введение в их структуру 1,4-бензодиазепина и гидроксильной группы в центральный бензол привели к открытию мощного и перорально эффективного ингибитора данного фактора – дарексабана (YM150). Последующее обширное исследование выявило уникальный аспект фармакокинетического профиля этого соединения, в котором гидроксильная группа быстро превращается в его глюкуронидный конъюгат (YM-222714) в качестве активного метаболита после перорального приема, и играет важную роль в экспрессии мощной антикоагулянтной активности в плазме. Данное соединение в настоящее время

проходит клиническую разработку для профилактики и лечения тромбоэмболических заболеваний (Tarasov D.N., 2018).

Синтезирована серия ингибиторов Ха фактора на основе 3,4-диаминобензоила. Интенсивные исследования этой новой серии привели к открытию 3,4-диметоксизамещенного соединения, представляющего собой сильнодействующий селективный прямой ингибитор данного фактора с превосходной антитромботической активностью *in vivo* (Yang G., 2015).

Развитие изоксазолинового ряда привело к появлению мощных ингибиторов Ха фактора, таких как SF303 и SK509, имеющих только одну основную группу. Затем была разработана серия изоксазолов для удаления хирального центра в изоксазолиновом кольце, и эта попытка привела к SA862, который имеет субнанолярное сродство к Ха фактору. Оптимизация структуры ядра привела к появлению ряда новых гетероциклов с пятичленным кольцом, замещенных бензамидином, которые являются мощными ингибиторами данного фактора свертывания. Усилия по улучшению пероральной биодоступности за счет снижения основности этих соединений при одновременном сохранении активности в отношении FXa увенчались открытием DPC 423. DPC 423 был выбран для клинической оценки в качестве сильнодействующего и перорально биодоступного ингибитора данного фактора (Quan M.L., 2001)

Описаны синтез и развитие взаимосвязи структуры и активности пиримидинового ряда гетероциклических ингибиторов фактора IXa. Повышенная селективность по сравнению с ингибированием фактора Ха была достигнута за счет расширения SAR элемента P1. Выбранные соединения оценивали *in vivo* для оценки их уровней в плазме крови крыс (Jayne CL, 2020).

Индолиновая серия продемонстрировала субнанолярное связывание фактора Ха, селективность от умеренной до высокой по сравнению с другими сериновыми протеазами и хорошую активность свертывания крови *in vitro*. На основе производных индола был создан кандидат на клинические исследования

разаксабан (Varnes J.G., 2007). Потенциальными антикоагулянтными средствами являются производные триазолопиримидина и триазолотриазина.

1.3. Конденсированные производные триазолопиримидина и триазолотриазина, как потенциально активные вещества для коррекции коагуляционного гемостаза

Триазолопиримидиновое кольцо является базовой структурой многих активных соединений с разнообразной фармакологической эффективностью (Renyu Q., 2018). Ядро триазолопиримидина представляет собой привилегированный каркас для получения биологически активных молекул благодаря его способности устанавливать множественные взаимодействия с молекулярной мишенью, а также наличие благоприятных фармакокинетических свойств (Felicetti T., 2022). В последние годы в литературе подчеркивается использование триазолопиримидиновых гетероциклов в разработке противовирусных средств, которые проявляют мощную противовирусную активность против различных РНК- и ДНК-вирусов (Касьяненко К.В., 2021). Легко синтезируемые триазолопиримидины являются многообещающим классом сильнодействующих противотуберкулезных средств и требуют дальнейшего изучения в поисках новых лекарств для борьбы с туберкулезом (Zuniga E.S., 2017). Данный класс соединений открывает перспективы для дальнейшей разработки потенциальных средств против болезни Альцгеймера (Umar T., 2019). Также описана противовоспалительная (Zhou L., 1999; Nettekoven M., 2016), противогрибковая (Low Y.S., 2021), противоопухолевая (Khattab R.R., 2021), антибактериальная (El-Gendy M.M., 2008), противомаларийная (Marwaha A., 2012), анальгетическая (Said S.A., 2009) и другие виды активности производных триазолопиримидина. Таким образом, триазолы и пиримидины являются весьма привлекательными скафолдами для синтеза новых соединений.

Важное место в структуре описанного класса соединений занимает триазол, представляющий собой пятичленное гетероциклическое соединение с двумя изомерными формами, то есть 1,2,3-триазолом и 1,2,4-триазолом (Bozorov K., 2019;

Varala R., 2021). 1,2,3-триазольное кольцо является основной фармакофорной системой среди азотсодержащих гетероциклов, широко встречается в различных соединениях. Более того, структурные особенности 1,2,3-триазола позволяют ему имитировать различные функциональные группы, что оправдывает его широкое использование в качестве биоизостера для синтеза новых активных молекул (Ashooriha M., 2019). Благодаря достижениям высокоселективных методов синтеза каркасов 1,2,3-триазола, созданы их новые производные, гибриды и конъюгаты. 1,2,4-триазолы также привлекли внимание из-за их интригующих физических и биологических свойств, а также их превосходной стабильности, что делает их потенциальными структурами ядра лекарственного средства (Khalid W., 2018). Литературные данные свидетельствуют о том, что лекарственные средства и соединения, относящиеся к производным триазола, обладают расширенным фармакологическим спектром. Как было описано в научных статьях Kamboj V.K., Tan Z. и Simurova N.V., 2021, среди производных данного химического класса встречаются препараты проявляющие противогрибковый, противомикробный, противовирусный, противодиабетический, противосудорожный, противовоспалительный, обезболивающий, антипролиферативный, противотуберкулезный, антидепрессантный, антипаразитарный, противоопухолевый и другие виды активности (Gajanan Khanage S., 2013; Kamboj V.K., 2015; Küçükgülzel Ş.G., 2015; Zhang B., 2019; Zhang J., 2019; Wen X., 2020; Tan Z., 2021; Aouad M.R., 2021; Almalki A.S.A., 2021; Poonia N., 2021; Grigolo T.A., 2021; Asgari M.S., 2021; Simurova N.V., 2021; Khan B., 2021). К ним относятся такие препараты, как противогрибковые (флуконазол, итраконазол, позаконазол, вориконазол, равуконазол), анксиолитические, противосудорожные и снотворные (эстазолам, алпразолам), анксиолитические и релаксанты скелетных мышц (этизолам), антимигренозные (этизолам, ризатриптан), антидепрессивное (тразодон), противораковое (анастрозол), ингибитор ароматазы (летрозол), противовирусное (рибавирин) и противосудорожное (лореклезол) и другие (Morrow J.D. 1991; Bethke T., 1991; Ait-Daoud N., 2018).

Пиримидин и его производные присутствуют во многих биоактивных ароматических соединениях, которые представляют большой интерес из-за их разнообразного биологического и клинического применения. Так производные пиримидина обладают противосудорожной и антидепрессивной активностью (Kumar S., 2015). Описана противовоспалительная, противомикробная, противоопухолевая активность данных производных (Shetty P., 2016; Ismail Kuthati V., 2017). Соединения в структуру которых входит пиримидин оказывают антиагрегантное действие (Packham M.A., 1993). Таким образом, бициклические гетероциклы, в состав которых входит пиримидин, могут быть использованы для открытия новых лекарств с аналогичными биологическими мишенями и улучшенной терапевтической эффективностью.

Среди производных триазолопиримидина выявлены препараты, обладающие антитромбоцитарной и антикоагулянтной активностями (Khalid W., 2018; Vozorov K., 2019; Gurevich K.G., 2021). Препарат тикагрелор представляет собой пероральный ингибитор агрегации тромбоцитов циклопентилтриазолопиримидиновой структуры, являющийся селективным обратимым антагонистом рецептора $P2Y_{12}$, который предотвращает $P2Y_{12}$ - и АДФ-опосредованную активацию и агрегацию тромбоцитов (Dhillon S., 2015; Kelemen H., 2019). Среди 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-онов найдены соединения с высоким уровнем антикоагулянтной активности (Savateev K.V., 2022). Также синтезированные производные триазола проявляют во время исследований заметную биологическую активность в отношении Ха фактора. Эти соединения демонстрируют аналогичную аликсабану ориентацию в сайте связывания и аналогичные молекулярные взаимодействия (Wang Y., 2016). Новые ингибиторы FXa, находящиеся в стадии разработки, в основном представляют собой структурные соединения существующих лекарств. Они показывают лучшую эффективность и имеют более высокий профиль безопасности. Некоторые амидины, пептиды, пирролидины, азетидины и триазолы входят в число недавно

описанных соединений (Santana-Romo F., 2020). Описана активность производных данного класса соединений в отношении ингибирования тромбина (Korff M., 2020).

Производные триазолотриазина также имеют спектр биологической активности. В литературе описан их антагонизм по отношению к аденозиновым рецепторам (Guo D., 2014). Также производные триазолотриазина проявляют противоопухолевую активность (Dadashpour S., 2019).

Триазин представляет собой шестичленное гетероциклическое кольцо, содержащее три атома азота, которые заменяют углерод-водородную единицу в бензольном кольце. В зависимости от положения азота в кольцевой системе он подразделяется на три изомерные формы, т. е. 1,2,3-триазин, 1,2,4-триазин и 1,3,5-триазин (Kushwaha N., 2020). По данным описанными Shah D.R. и Verma T. известно, что изомеры триазина и их производные играют важную роль, проявляя противоопухолевую, противовирусную, противогрибковую, противомаларийную и противомикробную активности (Shah D.R., 2014; Verma T., 2020).

Производные 1,3,5-триазина оказывают антиагрегантное действие, блокируя пуриновые P2Y₁ рецепторы тромбоцитов (Raboisson P., 2002). Производные 1,2,4-триазина являются потенциальными антитромботическими агентами (Konno S., 1993; Tamboli R.S., 2016).

Все вышеописанное явилось причиной для проведения исследований влияния производных триазолопиримидина и триазолотриазина на коагуляционный потенциал крови.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы исследований

Объектами исследования явились 42 новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидина под шифрами TD, FV, KC, B, HC, NAR и производных триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазиона под шифрами Be, Dr, VP. 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)¹.

В качестве препаратов сравнения при изучении антикоагулянтной активности *in vitro* использовали прямые антикоагулянты для перорального приема – ингибитор тромбина – дабигатрана этексилат (Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко., Германия) и ингибитор Ха фактора тромбоцитов – апиксабан (Бристол-Майерс Сквибб Мэнюфэкчуринг Компани, Пуэрто-Рико). В таблице 2.1. представлены структурные формулы изученных соединений.

Данное исследование выполнено согласно следующим нормативными документами: Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в редакции Федеральных законов от 22 декабря 2014 г. № 429-ФЗ и от 28 декабря 2017 г. №425-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств»; ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. №1700-ст); Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. под ред. А.Н. Миронова. В двух частях. – М.: Гриф-и-К., 2012, решение Совета Евразийской экономической комиссии № 81 от 3.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

¹ Выражаем глубокую благодарность за синтез и предоставление субстанций для исследования химикам – Члену-корреспонденту РАН В.Л. Русинову и к.х.н. Г.Л. Русинову

Процедуры с животными проводились в соответствии с нормами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

Экспериментальное исследование одобрено Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP) справка №2021/006 от 15.02.2021 г.)

В работе были использованы следующие приборы и реактивы:

- *реактивы*: диметилсульфоксид (ДМСО) (Татхимфармпрепараты, Россия); ELISA Kit for Coagulation Factor II (F2) (MyBioSource, США); НЕМОСЛОТ™ Thrombin Inhibitors (Nyphen BioMed, Франция); Ренапарин-плазма-тест (НПО «Ренам», Россия); натрия цитрат (ч.д.а., Реахим, Россия); АПТВ-тест («Технология-Стандарт», Россия); Тромбин-тест («Технология-Стандарт», Россия); Техпластин-тест («Технология-Стандарт», Россия); физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия); S-2238 (Chromogenix, USA) – хромогенный субстрат для тромбина; хлоралгидрат (Органика, Россия); железа хлорид (III) (ч., «Мосреактив» Россия); кислота уксусная х.ч. (Реахим, Россия); хлорид калия (Дальхимфарм, Россия); хлорид магния (Дальхимфарм, Россия); гидрокарбонат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия); глюкоза (ч.д.а., Sigma, США); бриллиантовый зеленый (ООО «ФАРМ-ПРОЕКТ», Россия); дигидрофосфат натрия (Sigma, США); хепес (Hepes, Panreac, Испания); хлорид кальция (Дальхимфарм, Россия); тромбин (Sigma, США); липополисахарид (ЛПС, E. coli O111:B4) (Sigma, США); бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США); раствор пирувата натрия 2 мМ (Sigma-Aldrich), полная ростовая среда (среда F-12, ПанЭко), 10% эмбриональная телячья сыворотка (FBS, Gibco), 1% раствор незаменимых аминокислот (NEAA, Sigma-Aldrich), раствор Хэнкса (ПанЭко), 0,05% раствор трипсина-ЭДТА (Gibco), МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (Sigma-Aldrich), 1%

раствор пенициллина-стрептомицина (Gibco), 0,4% раствор трипанового синего (Helicon), вода деионизированная (полученная с помощью Milli-Q).

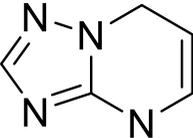
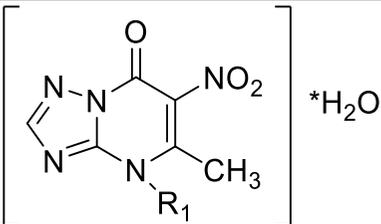
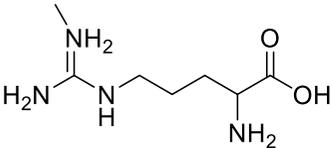
- *приборы*: система очистки воды Milli-Q (Millipore), дозаторы автоматические переменного объема (Eppendorf, Австрия); двухканальный люмиагрегометр Chronolog - 700 (Chronolog, США); стеклянные кюветы и магнитные мешалки (Chronolog, США); центрифуга Multi Centrifuge CM 6MT (Elmi, Латвия); коагулометр «SOLAR CGL 2110» (ЗАО СОЛАР, Беларусь); тепловая баня с ячейками для подогрева до 37°C (SOLAR, Беларусь); тромбоэластограф TEG 5000 (Haemoscope Corp., США); ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург); pH-метр METTLER TOLEDO (Seven Compact pH/Ion meter S220, Швейцария); электронные весы (Ohaus corporation, США); аналитические весы OHAUS AV114C (Adventurer Pro, США); термошейкер для планшетов, PST-60HL (Biosan, Латвия); многофункциональный микропланшетный ридер Infinite 200 PRO (Tecan, Австрия); пластмассовый и металлический атравматический гастральный зонд (Instech Laboratories, Inc. USA); стерильные одноразовые пластиковые шприцы объемом 1,0 мл и 5,0 мл (SFM Hospital Products GmbH, GERMANY); пинцет хирургический П-99 (МИЗ-Ворсма, Россия); корнцанг прямой (МИЗ им. В.И. Ленина, Россия); микроскоп Axiosamplus (CarlZeiss, Германия); цифровая камера Axiosam 105 color (CarlZeiss, Германия, 5 мегапикселей); ламинарный бокс II класса биобезопасности (LAMSYSTEMS), CO₂-инкубатор (Galaxy 170R New Brunswick an Eppendorf company), центрифуга (Eppendorf 5702RH), планшетный термошейкер (BioSan TST-60HL), вакуумный аспиратор (FTA-1 BioSan), аналитические весы (OHAUS), камера Ньюбауэра, (Heinz Herenz), автоклав (GFL, Германия), стерилизатор суховоздушный (Binder, Германия), дозаторы переменного объема (Eppendorf Reserch Plus), наконечники для дозаторов стерильные (Vertex), флаконы культуральные Т-75, для работы с адгезивными культурами клеток (TC treated, Eppendorf), пипетки Пастера стеклянные открытые, пипетки серологические стерильные 5 и 10 мл с фильтром.

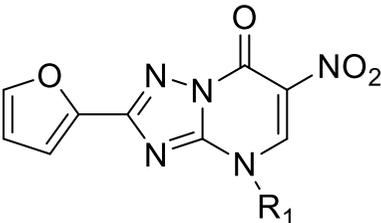
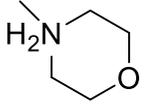
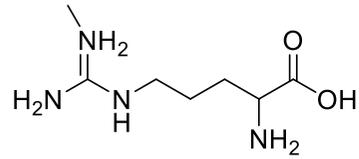
Эксперименты выполнены на следующих животных: 22 кроликах самцах породы "Шиншилла" весом 3000-3500 г, 295 беспородных крысах самцах массой 250,0-300,0 г, 140 белых половозрелых беспородных мышах самцах массой 20,0-25,0 г. Изучение цитотоксичности проводилось на клетках линии HepG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) (CLS Cell Lines Service).

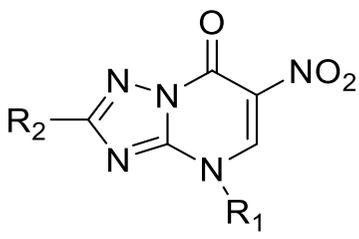
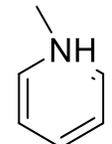
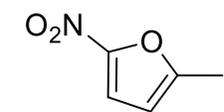
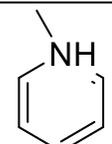
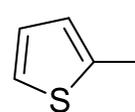
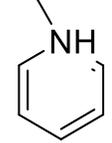
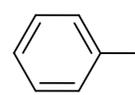
Все животные были на карантине в течение 2-х недель (крысы) и 3-х недель (кролики) в условиях отдельных боксов вивария кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. В течение всего карантина 2 раза (1 и 14 день у крыс) и 3 раза (1, 14 и 21 день у кроликов) взвешивали животных. Животные ежедневно осматривались и, в случае выявления отклонений среди экспериментальной группы, животные не включались в исследование.

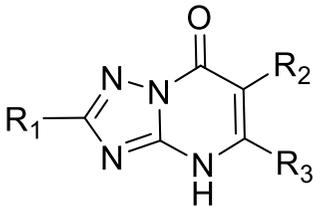
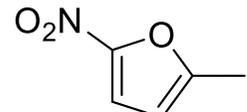
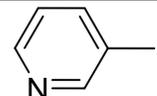
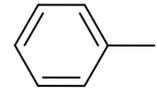
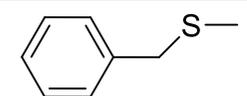
Среди животных производили отбор и случайное распределение по экспериментальным группам. При этом в качестве основного критерия использовали массу тела, так, чтобы индивидуальное значение массы тела животного не отклонялось от общего среднего значения более чем на $\pm 10\%$.

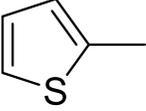
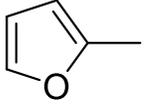
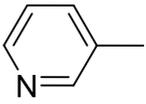
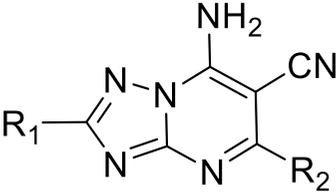
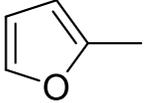
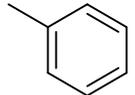
Таблица 1 - Химическое строение соединений класса триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов:

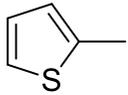
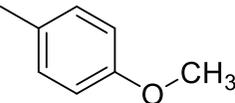
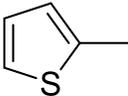
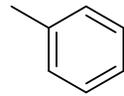
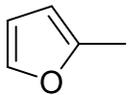
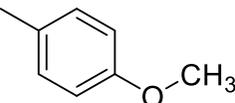
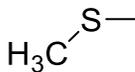
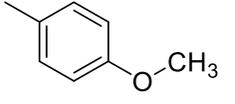
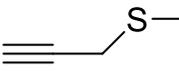
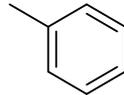
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---------------------------|---|----------------|----------------|----------------|--------------------|---|-----------------------|
| № п/п | Тестируемые соединения | Структура заместителя | | | | Солевой остаток | Брутто формула | Молекулярная масса |
| | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | | | |
| I. Триазоло[1,5-<i>a</i>]пиримидины: | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 5-метил-6-нитро-7-оксо-7 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-4-ид | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 1. | TD - Триазид |  | - | - | - | - | C ₁₂ H ₁₉ N ₉ O ₅ | 369,3 |
| | | L-Аргинин | - | - | - | - | | |

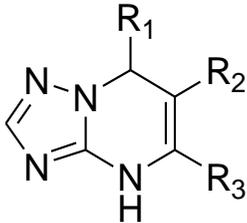
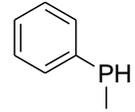
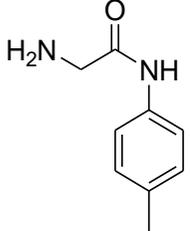
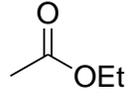
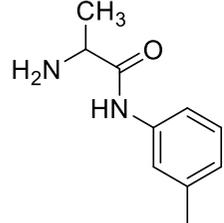
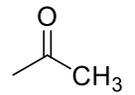
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|-----------|---|---|---|---|---|--|-------|
| 2-(фуран-2-ил)- 6-нитро-7-оксо-7H-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-4-ид | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 2. | FV-174/Na | Na | - | - | - | - | C ₉ H ₄ N ₅ O ₄ Na | 269,0 |
| | | натрий | - | - | - | - | | |
| 3. | KC-1304 | NH ₄ | - | - | - | - | C ₉ H ₈ N ₆ O ₄ | 264,0 |
| | | аммоний | - | - | - | - | | |
| 4. | KC-1317 |  | - | - | - | - | C ₁₃ H ₁₄ N ₆ O ₅ | 334,0 |
| | | морфолин-4-ий | - | - | - | - | | |
| 5. | KC-SH4 |  | - | - | - | - | C ₁₅ H ₁₉ N ₉ O ₆ | 421,0 |
| | | L-Аргинин | - | - | - | - | | |

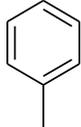
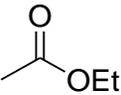
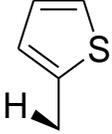
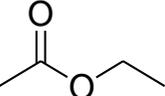
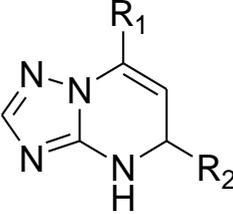
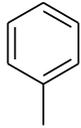
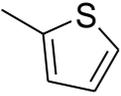
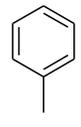
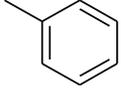
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|---------|---|--|---|---|---|---|-------|
| 6-нитро-2-метил-7-оксо-7H-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-4-ид | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 6. | КС-984 |  |  | - | - | - | C ₁₄ H ₉ N ₇ O ₆ | 371,3 |
| | | пиридин-1-иний | 5-нитрофуран-2-ил | - | - | - | | |
| 7. | КС-1183 |  |  | - | - | - | C ₁₄ H ₁₀ N ₆ O ₃ S | 342,0 |
| | | пиридин-1-иний | тиофен-2-ил | - | - | - | | |
| 8. | КС-955 |  |  | - | - | - | C ₁₆ H ₁₂ N ₆ O ₃ | 336,0 |
| | | пиридин-1-иний | фенил | - | - | - | | |

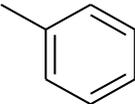
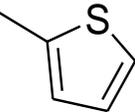
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|--------|--|---------------------------|---------------------------|--------|--------|---|-------|
| 2,5,6-триметил-7-оксо-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 9. | КС-786 | EtOOC— этоксикарбонил | —COOEt этоксикарбонил | - - | - - | - - | C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₅ | 280,0 |
| 10. | КС-G |  5-нитрофуран-2-ил | —NO ₂ нитро | —CH ₃ метил | - - | - - | C ₁₀ H ₆ N ₆ O ₆ | 306,0 |
| 11. | КС-956 |  пиридин-3-ил | —COOEt этоксикарбонил | - - | - - | - - | C ₁₃ H ₁₁ N ₅ O ₃ | 285,0 |
| 12. | КС-960 |  фенил | —COOEt этоксикарбонил | - - | - - | - - | C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 284,0 |
| 13. | КС-965 |  бензилтио | —COOEt этоксикарбонил | - - | - - | - - | C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₃ S | 330,0 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---------|---|--|---|---|---|---|-------|
| 14. | КС-986 |  |  | - | - | - | C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₃ S | 290,0 |
| | | тиофен-2-ил | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 15. | КС-1301 |  |  | - | - | - | C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₄ | 274,0 |
| | | фуран-2-ил | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 16. | КС-1318 |  |  | - | - | - | C ₁₀ H ₆ N ₆ O ₃ | 258,0 |
| | | пиридин-3-ил | нитро | - | - | - | | |
| 7-амино-2,5-диметил-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-6-карбонитрил | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 17. | В-270 |  |  | - | - | - | C ₁₆ H ₁₀ N ₆ O | 302,3 |
| | | фуран-2-ил | фенил | - | - | - | | |

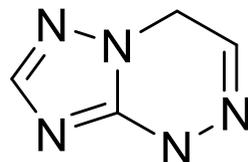
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|-------|---|--|---|---|---|---|-------|
| 18. | B-286 |  |  | - | - | - | C ₁₇ H ₁₂ N ₆ OS | 348,4 |
| | | тиофен-2-ил | 4-метоксифенил | - | - | | | |
| 19. | B-349 |  |  | - | - | - | C ₁₆ H ₁₀ N ₆ S | 318,4 |
| | | тиофен-2-ил | фенил | - | - | | | |
| 20. | BS-3 |  |  | - | - | - | C ₁₇ H ₁₂ N ₆ O ₂ | 332,3 |
| | | фуран-2-ил | 4-метоксифенил | - | - | | | |
| 21. | B309 |  |  | - | - | - | C ₁₄ H ₁₂ N ₆ OS | 312,4 |
| | | метилтио | 4-метоксифенил | - | - | | | |
| 22. | B275 |  |  | - | - | - | C ₁₅ H ₁₀ N ₆ S | 306,4 |
| | | пропаргилтио | фенил | - | - | | | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|--------|---|--|---|---|---|---|-------|
| 5,6,7-триметил-4,7-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 23. | НС-6а |  |  | - | - | - | C ₁₁ H ₁₀ N ₅ O ₂ P | 275,2 |
| | | фенилфосфатметил | нитро | - | - | | | |
| 24. | НС-10а |  |  |  | - | - | C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₃ | 356,4 |
| | | 4-(2-аминоацетамидо)фенил | этоксикарбонил | метил | - | | | |
| 25. | НС-11а |  |  |  | - | - | C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₂ | 340,4 |
| | | 3-(2-аминопропанамидо)фенил | ацетил | метил | - | | | |

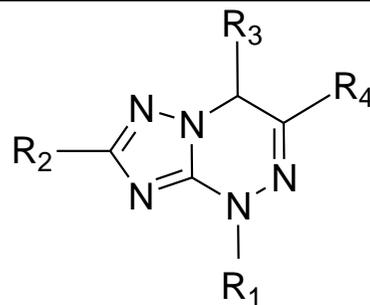
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|--------|---|--|---|---|---|---|-------|
| 26. | НС-71 |  |  |  | - | - | C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₂ | 284,3 |
| | | фенил | этоксикарбонил | метил | - | - | | |
| 27. | НС-109 |  |  |  | - | - | C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₂ S | 290,3 |
| | | (тиофен-2-ил)метил | этоксикарбонил | метил | - | - | | |
| 5,7-диметил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 28. | НС-82a |  |  | - | - | - | C ₁₅ H ₁₂ N ₄ S | 280,4 |
| | | фенил | | - | - | - | | |
| 29. | НС-82b |  |  | - | - | - | C ₁₇ H ₁₄ N ₄ | 274,3 |
| | | фенил | фенил | - | - | - | | |

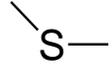
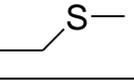
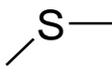
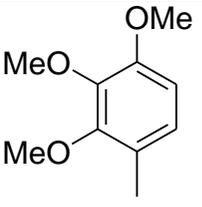
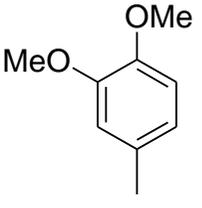
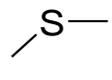
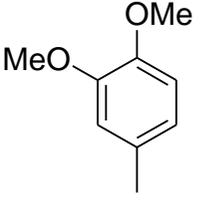
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|--------------|---|--|---|---|---|---|-------|
| 30. | НС-82с |  |  | - | - | - | C ₁₅ H ₁₂ N ₄ S | 280,4 |
| | | тиофен-2-ил | фенил | - | - | - | | |
| 31. | НС-NAR-0273б |  |  | - | - | - | C ₁₃ H ₁₀ N ₄ S ₂ | 286,4 |
| | | тиофен-2-ил | тиофен-2-ил | - | - | - | | |

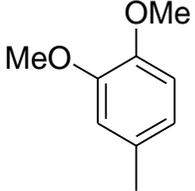
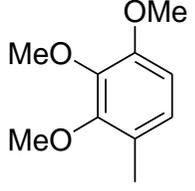
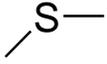
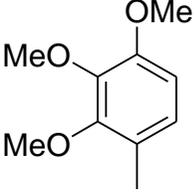
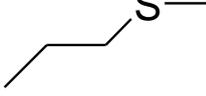
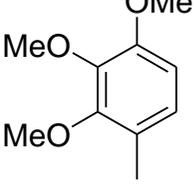
II. Триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины:

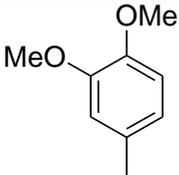
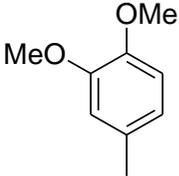


1,3,4,7-тетраметил-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин



| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|--------|-------|--|---|---------|---|-----------------------|-------|
| 32. | Be7 | Н |  | $=O$ | ОН | - | $C_5H_5N_5O_2S$ | 199,2 |
| | | гидро | метилтио | оксо | окси | | | |
| 33. | Dr-497 | Н |  | ОН | $-NO_2$ | - | $C_6H_8N_6O_3S$ | 244,2 |
| | | гидро | этилтио | окси | нитро | | | |
| 34. | Dr-744 | Н |  |  | $-NO_2$ | - | $C_{14}H_{16}N_6O_5S$ | 380,4 |
| | | гидро | метилтио | 2,3,4-триметоксифенил | нитро | | | |
| 35. | Dr-758 | Н | - |  | $-NO_2$ | - | $C_{12}H_{12}N_6O_4$ | 304,3 |
| | | гидро | - | 3,4-диметоксифенил | нитро | | | |
| 36. | Dr-761 | Н |  |  | $-CN$ | - | $C_{14}H_{14}N_6O_2S$ | 330,4 |
| | | гидро | метилтио | 3,4-диметоксифенил | циано | | | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|--------|-------|--|---|----------------|---|--|-------|
| 37. | Dr-762 | Н | $\text{H}_3\text{C}-$ |  | $-\text{NO}_2$ | - | $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4$ | 318,3 |
| | | гидро | метил | 3,4-диметоксифенил | нитро | | | |
| 38. | Dr-763 | Н | $\text{H}_3\text{C}-$ |  | $-\text{NO}_2$ | - | $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_5$ | 348,3 |
| | | гидро | метил | 2,3,4-триметоксифенил | нитро | | | |
| 39. | Dr-765 | Н |  |  | $-\text{CN}$ | - | $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ | 360,4 |
| | | гидро | метилтио | 2,3,4-триметоксифенил | циано | | | |
| 40. | Dr-767 | Н |  |  | $-\text{CN}$ | - | $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ | 388,4 |
| | | гидро | пропилтио | 2,3,4-триметоксифенил | циано | | | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|------|-------|---|---|---|---|-----------------------|-------|
| 41. | VP-4 | Н |  |  |  | - | $C_{13}H_{14}N_6O_4S$ | 350,4 |
| | | гидро | метилтио | 3,4-диметоксифенил | нитро | | | |
| 42. | VP-6 | Н | - |  |  | - | $C_{13}H_{12}N_6O_2$ | 284,3 |
| | | гидро | - | 3,4-диметоксифенил | циано | | | |

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. Бактерицидная обработка осуществлялась 2 раза в день. Кролики содержались в лабораторных клетках для крупных животных, а мыши и крысы – в клетках для мелких грызунов. Все животные находились на полноценном рационе. Кролики получали полнорационный комбикорм (ООО «ТПК Альянс», Россия; состав: зерносмесь (ячмень, пшеница, ракушечная мука, кукуруза), жмых подсолнечный, отруби, травяная мука, витамины), крысы и мыши получали кормовую смесь (Кормовая смесь для крыс и мышей (Закрома), Россия; состав: пшеница, овёс зерновки, греча, кукуруза, ячмень, мясные кусочки, овощи сушёные (морковь, свекла), сочные корма (овощи и травы), травяные гранулы, гаммарус сушёный, кукурузные хлопья, тыквенное семя, кабачковое семя, кабачковое семя неочищенное, подсолнечное семя) и зерновые продукты. Для животных были созданы условия с круглосуточным свободным доступом к поилкам с водой, соответствующей ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82 и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток вода из централизованных систем питьевого водоснабжения», в которых ежедневно производили замену.

Каждому опытному животному присваивалась своя метка, которая наносилась на хвост животного специальным перманентным маркером и фиксировалась в протоколе сбора первичных данных исследования. На клетки с животными прикрепляли этикетки со следующей информацией: индивидуальный номер, вид, пол и количество животных, дата начала и конца эксперимента, название, доза и способ введения исследуемого вещества.

Эвтаназия производилась с помощью транслокации шейных позвонков животного, находящегося под хлоралгидратным наркозом, своевременно, без причинения страданий, в помещении, где не содержатся другие животные, согласно правилам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Метод влияния на параметры коагулограммы *in vitro*

Исследование новых соединений на параметры коагулограммы определяли в крови кроликов, с помощью хронометрического метода анализа, на гемокоагулометре «SOLAR» (Белоруссия). Определяли следующие коагулографические показатели: АЧТВ, ТВ, ПТВ с использованием наборов реактивов производства «Технология–стандарт» («Технология–стандарт», Россия), методиками, которые основаны на автоматическом определении клоттингового времени (время свертывания). Анализ производили на бедной тромбоцитами плазме кроликов, полученную при центрифугировании крови (3000 об/мин, 15 минут). Исследования проводились при постоянном прогревании при температуре +37°C и перемешивании с помощью магнитной мешалки-якоря. При исследовании антикоагулянтных свойств тестируемых образцов, 10 мкл исследуемого вещества вносили в бедную тромбоцитами плазму и инкубировали в течении 5 минут, затем производили коагулометрический анализ с помощью наборов. В случае выявленной активности соединения в данной концентрации, производят дозозависимое исследование.

Во время измерения *активированного парциального тромбопластинового времени (АЧТВ)* регистрировали время свертывания рекальцифицированной плазмы в условиях фосфолипидной и контактной активации, что имитирует процесс свертывания по внутреннему пути коагуляции. Для этого 100 мкл АЧТВ реактива добавлялось к 100 мкл бедной тромбоцитами плазме, находящейся в термостатируемой кювете с постоянной температурой +37°C. После проведения

инкубации полученной смеси в кювету вносилось 100 мкл 0,28%-ного раствора хлорида кальция (25 мМ).

Определение протромбинового времени (ПТВ). К 100 мкл бедной тромбоцитами плазме, предварительно прогретой в течении 1 минуты, добавляли 200 мкл тромбопластин-кальциевой смеси со стандартизированной активностью, затем производили отсчет времени до формирования плотного сгустка. Исследование данного показателя необходимо для определения: ПТИ (протромбинового индекса); ПО (протромбинового отношения) – величина, обратная ПТИ; МНО (международное нормализованное отношение); ПТВ (протромбиновое время) и протромбина по Квику.

Для определения тромбинового времени (ТВ) в кювету вносили 100 мкл бедной тромбоцитами плазмы. После инкубирования пробы (60 секунд при 37°C) в нее добавляли 100 мкл стандартизованного по активности рабочего раствора тромбина. Данный тест необходим для определения скорости превращения фибриногена в фибрин - оценки кинетики конечного этапа свертывания крови.

При выявлении активных соединений по влиянию на какой-либо параметр коагулограммы проводили дополнительное исследование в концентрациях 10; 5; 1 и 0,1 мкМ для расчета EC_{50} .

В опытах *in vitro* в качестве растворителя исследуемых веществ использовалась дистиллированная вода, а в качестве растворителя реагентов - физиологический раствор. В контрольные образцы бедной тромбоцитами плазмы добавляли дистиллированную воду в эквивалентном объеме.

2.2.2. Метод проведения подструктурного анализа зависимости прямой антикоагулянтной активности соединений².

В проведенном исследовании в качестве материалов выступали данные по 2D-структуре и уровню прямой антикоагулянтной активности 42 новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-

² Исследования были проведены совместно с д.б.н. П.М. Васильевым, за что выражаем благодарность.

c][1,2,4]триазина.

Для последовательной обработки и анализа данных в настоящем исследовании использовались следующие компьютерные программы, с помощью которых проводили:

- 1) рисование и обработку структурных формул, формирование и ведение химических баз данных – ChemOffice 9.0 [PerkinElmer, 2020];
- 2) кластерный анализ фармакологической активности – программа Statistica 8.0 [Statistica, 2020];
- 3) расчет статистической значимости признаков с использованием биномиального критерия – оригинальный скрипт на Visual Basic;
- 4) общую обработку данных – MS Office Excel 2013 [Microsoft Office, 2020].

Формирование базы данных по структуре и прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина.

Структурные формулы всех 42 новых соединений были приведены к стандартному виду: проверены связи и валентности и развернуты многоатомные функциональные группы.

Создана стандартизованная база данных SAR TrTime, которая была представлена в формате СУБД ChemFinder 9.0.

Указанные соединения были экспериментально изучены на прямую антикоагулянтную активность клотинговым методом. Величина прямой антикоагулянтной активности была представлена в виде процентного увеличения тромбинового времени TrT, в сравнении с контролем.

Данные по прямой антикоагулянтной активности изучаемых соединений были занесены в базу данных SAR TrTime.

В созданной базе данных были определены следующие поля:

- 1) Mol_ID – номер записи;
- 2) Structure – структурная формула соединения;
- 3) Brutto formula – брутто-формула соединения;
- 4) Mol weight – молекулярный вес соединения;
- 5) TrT – процент увеличения тромбинового времени в сравнении с контролем;
- 6) Core – IUPAC название базовой химической структуры;
- 7) Comments – IUPAC название соединения и иная сопроводительная информация.

Пример записи из созданной стандартизованной базы данных SAR TrTime по структуре и прямой антикоагулянтной активности 42 новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина приведен на рисунке 2.1.

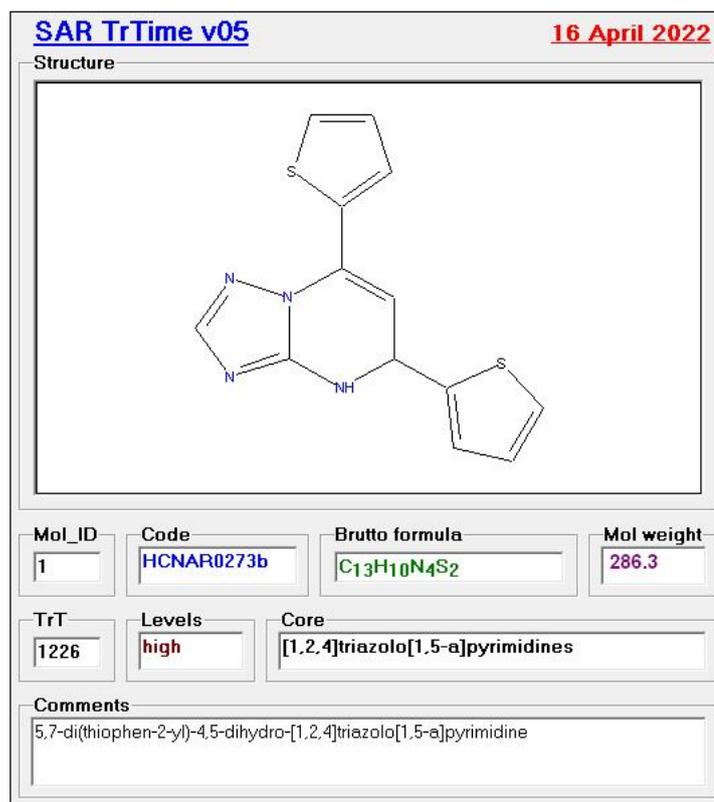


Рисунок 2.1 - Пример записи из стандартизованной базы данных SAR TrTime по по структуре и прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазиона

*Кластерный анализ данных по прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазиона.*

Кластерный анализ процентных значений увеличения тромбинового времени TrT был выполнен с помощью программы Statistica v8.0 [Statistica, 2020] методом *k*-средних, с разделением на три группы активности: high, moderate, low.

Полученные для каждого соединения градированные метки уровня прямой антикоагулянтной активности были занесены в базу данных SAR TrTime (см. рисунок 2.1.).

Пример снимка результатов кластеризации приведен на рисунке 2.2.

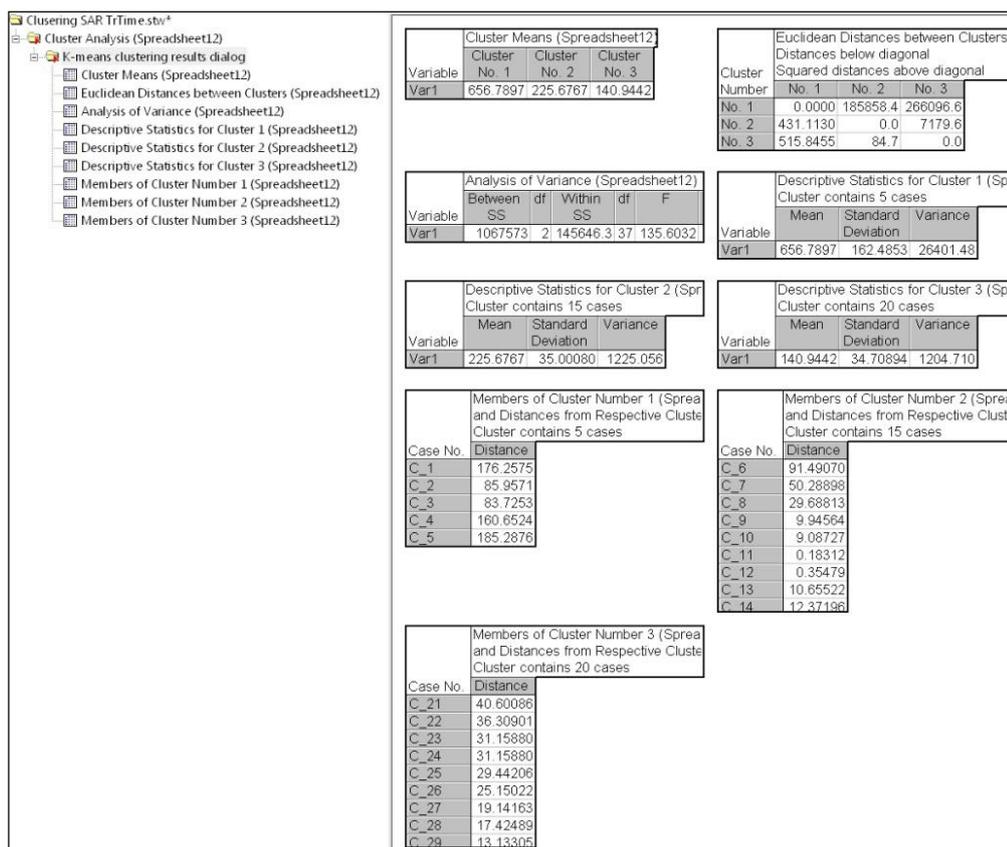


Рисунок 2.2 - Снимок результатов кластеризации прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина

*Построение скаффолдов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина.*

Все 42 структурных формулы новых соединений были визуально проанализированы и на основе базовых структур [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина были сформированы скаффолды изучаемых производных, в которых были обобщены их структурные особенности (рисунок 2.3).

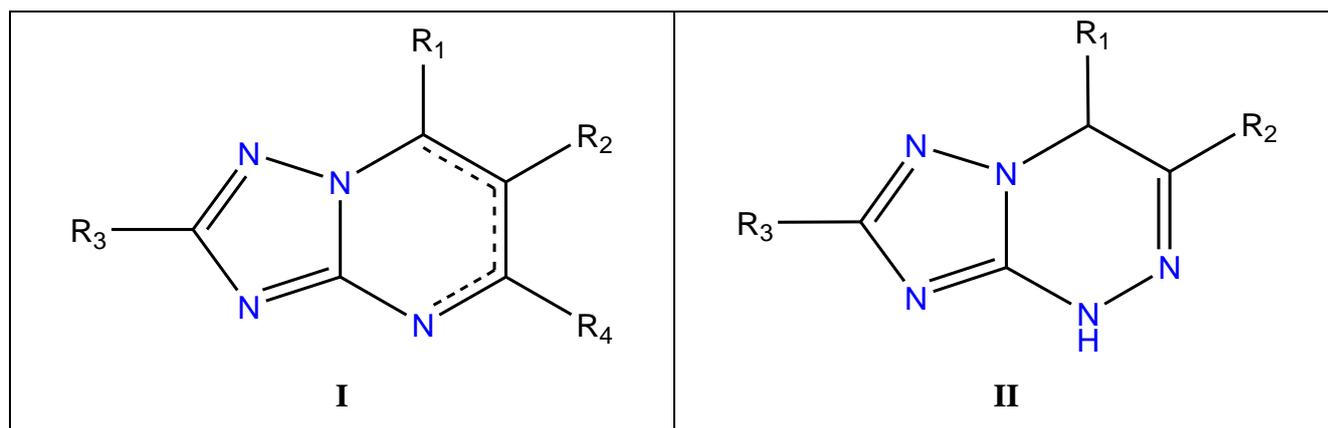


Рисунок 2.3 - Скаффолды новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина (I) и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины (II)

В скаффолдах были определены заместители R₁ ... R₄ и возможность учета наличия кратных связей в положениях 1-2, 2-3 и 3-4 структуры [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина.

*Формирование фрагментного описания химических структур новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины.*

С использованием построенных скаффолдов была сформирована таблица фрагментного описания 42 изучаемых соединений, в которой были индексированы типы базовых структур, наличие кратных связей в различных положениях и виды заместителей R₁, R₂, R₃, R₄.

Наличие конкретного фрагмента структуре соединения индексировалось значением 1, отсутствие – значением 0.

В созданной таблице были определены следующие переменные:

- 1) Mol_ID – номер записи в БД SAR TrTime;
- 2) Code – буквенно-цифровой (лабораторный) шифр соединения;
- 3) TrT – процент увеличения тромбинового времени в сравнении с контролем;
- 4) Levels – уровень прямой антикоагулянтной активности по результатам кластеризации;

- 5) TrPyr – индекс принадлежности к производным [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина;
- 6) TrTr – индекс принадлежности к производным [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины;
- 7) 12=, 23=, 34= – индексы наличия кратных связей в соответствующих положениях;
- 8) R1-2-C4H3S ... R4-C6H4(4-OCH3) – виды заместителей в положениях R₁ ... R₄.

Соединения в таблице располагались в порядке уменьшения их прямой антикоагулянтной активности.

Пример начала таблицы фрагментного описания химических структур новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины приведен на рисунке 2.4.

| 1 | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | W | X | Y | Z | | |
|----|--------|------------|------|----------|-------|-----|-----|-----|--------|------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|---|---|---|
| 2 | Mol_ID | Code | TrT | Levels | TrPyr | 12= | 23= | 34= | R1-2-C | R1=O | R1-OH | R1-CH2 | R1-C6F | R1-C6H | R1-C6H | R1-NH2 | R1-C6H | R1-C6H | R1-PHC | R2-NO2 | R2-CO | R2-OH | R2-CN | R3-2-C | R3-2-5 | | | |
| 3 | 1 | HCNAR0273b | 1226 | high | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 4 | 2 | FV-174/Na | 1159 | high | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 5 | 3 | KC-G | 1057 | high | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 6 | 4 | KC-786 | 833 | high | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 7 | 5 | Dr-497 | 743 | high | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 8 | 6 | KC-984 | 741 | high | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 9 | 8 | HC-109 | 472 | high | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 10 | 9 | IOS-HC-11a | 317 | moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 11 | 10 | IOS_HC-82b | 276 | moderate | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 12 | 11 | IOS_HC-82a | 255 | moderate | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 13 | 12 | Be7 | 238 | moderate | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| 14 | 13 | VP-6 | 235 | moderate | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 15 | 15 | KC-960 | 225 | moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 16 | 16 | B349 | 215 | moderate | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 17 | 17 | Dr-758 | 213 | moderate | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 18 | 18 | B270 | 211 | moderate | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 19 | 19 | KC-SH4 | 199 | moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 20 | 20 | KC-1317 | 199 | moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 21 | 21 | IOS-HC-71 | 198 | moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 22 | 22 | Dr-761 | 192 | moderate | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 23 | 23 | KC-956 | 189 | moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 24 | 24 | Dr-767 | 182 | low | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 25 | 25 | Dr-762 | 177 | low | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 26 | 26 | KC-1304 | 172 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 27 | 27 | B53 | 172 | low | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 28 | 28 | Dr-744 | 170 | low | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 29 | 29 | KC-1183 | 168 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 30 | 30 | KC-1301 | 160 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 31 | 31 | KC-1318 | 158 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 32 | VP-4 | 154 | low | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 33 | Dr-763 | 152 | low | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 34 | 34 | KC-965 | 150 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 35 | KC-955 | 150 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 36 | B286 | 149 | low | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 37 | 37 | KC-986 | 144 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 38 | 38 | IOS-HC-10a | 133 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 39 | IOS-HC-6a | 92 | low | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | 40 | B309 | 86 | low | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Рисунок 2.4 - Начало таблицы фрагментного описания химических структур новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины

Расчет статистической значимости влияния структурных фрагментов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-

c][1,2,4]триазина на уровень их прямой антикоагулянтной активности.

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]триазина была проведена методом подструктурного анализа (Васильев, 2014)

Производили подсчет общего числа признака *i* в классе активности *h* (высокоактивные) и *nh* (невысокоактивные):

$$K_{ih,nh} = \frac{N_{h,nh}}{\sum_{j=1}^M K_{ij}}, i = 1 \dots M, \quad (1)$$

где $N_{h,nh}$ – число соединений в классе *h* или *nh*;

K_{ij} – число признака вида *i* в соединении *j*;

M – число видов признаков.

Для каждого из M признаков подсчитывали число его выполнений в каждом из двух классов, деленное на вес класса, т.е. находили исправленное на размер класса общее число признака *i* в классе *h* и *nh*:

$$S_{ih,nh} = \frac{K_{ih,nh}}{N_{h,nh}} \times \frac{(N_h + N_{nh})}{2}, i = 1 \dots M. \quad (2)$$

Вычисляли Байесовскую вероятность встречаемости признака *i* в классе *h* и *nh* (Голендер, 1978):

$$P_{ih,nh} = \frac{S_{ih,nh} + 1}{S_{ih} + S_{inh} + 2}, i = 1 \dots M. \quad (3)$$

Различия в частоте встречаемости признака *i* в классах *h* и *nh* определяли по биномиальному критерию (Глотов, 1982):

$$Z_{ih} = \frac{\left| P_{ih} - P_{inh} \right| \frac{1}{4 \times (S_{ih} + S_{inh})}}{\sqrt{\frac{0,5}{(S_{ih} + S_{inh})}}}, i = 1 \dots M. \quad (4)$$

По величине биномиального критерия рассчитывали значимость влияния признака i на наличие или отсутствие высокой активности:

$$Pr_{ih} = 1 - N(Z_{ih}), \quad (5)$$

где N – функция стандартного нормального распределения с параметрами $(0,1)$.

В зависимости от значения Pr_{ih} , для каждого признака i назначали индекс его влияния на наличие высокой активности:

$$\begin{aligned} Ind_{ih} = 0.2 & \text{ – отсутствует, } Pr_{ih} \geq 0.2; \\ Ind_{ih} = 1 & \text{ – тенденция, } 0.1 \leq Pr_{ih} < 0.2; \\ Ind_{ih} = 2 & \text{ – слабое, } 0.05 \leq Pr_{ih} < 0.1; \\ Ind_{ih} = 3 & \text{ – выраженное, } 0.01 \leq Pr_{ih} < 0.05; \\ Ind_{ih} = 4 & \text{ – сильное, } 0.001 \leq Pr_{ih} < 0.01; \\ Ind_{ih} = 5 & \text{ – очень сильное, } Pr_{ih} < 0.001. \end{aligned} \quad (6)$$

Статистически достоверное влияние соответствует $Ind_{ih} \geq 3$.

Если $P_{ih} \geq P_{inh}$, то i признак считали детерминирующим высокую активность.

Если $P_{ih} < P_{inh}$, то i признак определял у соединения отсутствие высокой активности.

По этой же схеме оценивали влияние признака i на наличие высокого или умеренного (объединенная метка high or moderate) уровня активности Ind_{ihm} , $i = 1 \dots M$.

В качестве интегральной метрики влияния каждого признака i на наличие выраженного уровня активности вычисляли среднюю оценку двух показателей:

$$Ind_i = (Ind_{ih} + Ind_{ihm}) / 2. \quad (7)$$

Расчет показателя Ind_i выполняли с учетом его знака: плюс – положительное влияние; минус – отрицательное.

Выявление значимых структурных признаков наличия у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина выраженной прямой антикоагулянтной активности.

В соответствии с вычисленными интегральными метриками, для каждого признака i была установлена следующая степень его влияния на наличие выраженной прямой антикоагулянтной активности:

$Ind_i < 0.5$ – отсутствует;

$0.5 \leq Ind_i < 1.0$ – тенденция;

$1.0 \leq Ind_i < 1.5$ – слабое;

$1.5 \leq Ind_i < 2.0$ – выраженное;

$2.0 \leq Ind_i < 2.5$ – сильное;

$Ind_i \geq 2.5$ – весьма сильное.

Знак плюс у показателя Ind_i соответствовал положительному влиянию (усилению) активности, знак минус – отрицательному влиянию (ослаблению).

2.2.3. Метод изучения цитотоксичности

Изучение проводили на клетках линии HepG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) (CLS Cell Lines Service), которые культивировались в культуральном флаконе в полной ростовой среде F-12 в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для промывания монослоя использовали раствор Хенкса, для снятия монослоя использовали раствор трипсина-ЭДТА 0,05% (5 мин). С целью адгезии клеток ко дну планшета их суспензию засеивали в 24-луночный планшет и инкубировали в течение 24 часов. Затем производили внесение наиболее активного соединения и препарата сравнения в лунки (n=3-5) в конечных концентрациях 0,01-100 мкМ (кратность ×10). В контрольные лунки вносился только эквивалентный объем полной ростовой среды. Инкубация тестируемых образцов проводилась в течение 48 ч., после чего соединения удалялись вместе с ростовой средой, и вносился реагент МТТ (инкубация 2 часа).

Для солюбилизации образовавшихся кристаллов формаза использовался ДМСО в планшетном термошейкере (5 мин, 24°C, 1200 RPM (оборотов в минуту)).

С использованием планшетного ридера по данным оптической плотности определялась жизнеспособность клеток, коррелирующая с активностью митохондриальных дегидрогеназ. Измерение абсорбции производили при 555 нм.

2.2.4. Метод исследования влияния на параметры коагулограммы *ex vivo*

Исследования выполняли на 70 белых беспородных крысах самцах. В качестве препарата сравнения в опытах *ex vivo* был выбран ингибитор тромбина дабигатрана этексилат. Данный препарат изучали в дозе эквивалентной дозе для человека с учетом межвидового коэффициента пересчета, которая составила 12 мг/кг. Соединения, проявившие наибольшую активность в опытах *in vitro*, в исследованиях *ex vivo* изучались в дозах, эквимольных препарату сравнения. Для соединений под шифрами: HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G, KC-786, эти дозы составили: 5,5; 5,8; 5,8 и 5,4 мг/кг соответственно. При изучении антикоагулянтного действия в опытах *ex vivo* для выявления наибольшей активности соединений во временном интервале животные получали их за 1; 2 и 4 часа до начала выполнения эксперимента. Дабигатрана этексилат вводили за 2 часа (время наступления максимальной концентрации в крови) до исследования. В опытах на крысах препараты вводились внутрижелудочно в объеме не более 2 мл при помощи атравматичного гастрального зонда. Забор крови производили из брюшной аорты крыс, которых предварительно наркотизировали с помощью 400 мг/кг хлоралгидрата внутрибрюшинно. Для поддержания жидкого состояния крови использовали 3,8% раствор цитрата натрия (pH 6,0) в соотношении 9:1. Все исследования выполнялись на бедной тромбоцитами плазме крыс, которую получали путем центрифугирования крови в течение 15 минут при 3000 об/мин. Измерения параметров коагулограммы проводили на коагулометре «SOLAR» по вышеописанным методикам.

2.2.5. Метод тромбоэластографии

Исследования проводили на 30 белых лабораторных крысах самцах. Метод тромбоэластографии основан на измерении физических, вязкоэластических свойств кровяного сгустка, для этого используется специальная кювета, в которую вносят образец крови в объеме 340 мкл и опускается стержень в кювету тромбоэластографа. Дабигитрана этексилат однократно внутрижелудочно вводили в дозе 12 мг/кг, а соединения под шифрами: HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G, KC-786 в дозах - 5,5; 5,8; 5,8 и 5,4 мг/кг соответственно. Исследования влияния препарата сравнения на параметры тромбоэластограммы проводили через 2 часа, а исследуемых соединений через 1, 2, и 4 часа после введения. Кровь для исследования брали из брюшной аорты крыс, наркотизированных внутривенно хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг. Выполняли оценку основных показателей тромбоэластограммы:

- R – время от начала постановки пробы до образования первых нитей фибрина
- K – время от начала образования первых нитей фибрина до формирования сгустком амплитуды 20мм
- Ag – скорость образования сгустка, функциональное состояние (угол альфа) фибрина
- MA – максимальная амплитуда, характеризующая функциональную активность тромбоцитов, максимальную прочность сгустков

2.2.6. Модель тромбоза нижней полой вены

Исследование выполнено согласно методике (Henke P.K., 2007) на 45 белых беспородных крысах-самцах. Изучаемое соединение HC-NAR-0273b вводили крысам однократно внутрижелудочно 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 за два часа до перевязки нижней полой вены. Соединение HC-NAR-0273b и дабигатрана

этексилат растворяли в дистиллированной воде. У крыс, которых наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг интраперитонеально) выполнялась послойная лапаротомия, отсеснялся кишечник в сторону, и выделялась нижняя полая вена. После этого осуществляли ее лигирование на 1 см выше места бифуркации, не затрагивая при этом брюшную аорту, далее ушивали брюшную полость, швы подвергали обработке раствором бриллиантового зеленого. Через 24 часа крыс повторно наркотизировали и выполняли лапаротомию, после чего извлекали тромбы из нижней полой вены, на месте перевязки и определяли их массу. Группе контрольных и ложно-оперированных животных и вводили растворитель (дистиллированную воду). После, группе ложно-оперированных животных проводилась лапаротомия и ушивание брюшной полости, с целью исключения влияния хирургических манипуляций на тромбообразование. Оценку антитромботической активности проводили путем взвешивания изъятых тромбов.

2.2.7. Модель тромбоза бедренной вены крыс, индуцированного хлоридом железа

Эксперименты проедены на 35 крысах самцах. Модель венозного тромбоза бедренной вены у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа, создавали спустя 2 часа после внутрижелудочного однократного введения тестируемых образцов (Rettger С., 2005). Соединение HC-NAR-0273b вводили крысам внутрижелудочно в дозах 5,5; 2,5 и 1,25 мг/кг, а препарат сравнения дабигатрана этексилат изучался в дозах 12,0; 6,0 и 3,0 мг/кг. Группе контрольных животных вводили воду очищенную. Крыс наркотизировали при внутрибрюшинном введении хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг после чего производилось препарирование бедренной вены на 1 см в длину. На участок длиной в среднем 0,5 см укладывался ватный диск размером 2x4 мм, смоченный 50% раствором хлорида железа (III) (0,025 мл). Исследования были произведены на ультразвуковом доплерографе «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург), на котором выполнялась регистрацию кровотока до полной окклюзии сосуда в месте

наложения ватного диска. Антитромботическую активность соединений оценивали по времени тромбообразования.

($\Delta\%$) время пролонгирования образования тромба рассчитывалось по формуле:

$$\Delta\% \text{ пролонгирования} = (B/A) \times 100\% - 100;$$

где А – время образования тромба (контрольный образец);

В – время образования тромба при введении опытных образцов.

2.2.8. Модель тромбин-индуцированного тромбоза с проведением морфологических исследований

Эксперименты выполнены на 30 мышах самцах. Введение растворов соединения HC-NAR-0273b в дозе 5,5 мг/кг и препарата сравнения дабигитрана этексилата в дозе 12 мг/кг производили за 2 часа до введения тромботического агента. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду.

Моделирование острого тромбоза у мышей проводилось согласно методу. Для этого мышей фиксировали в специализированных домиках с доступом к хвосту. В хвостовую вену инсулиновым шприцом подавали тромбин в дозе 40 ед., растворенный в физиологическом растворе. Оценивали поведение животных (подвижность, наличие судорог и др.). Антитромботическую активность тестируемых соединений оценивали по количеству выживших животных. У погибших животных проводили забор легких для гистологической оценки. За группой выживших животных проводили наблюдение в течение 7 суток на предмет отдаленной гибели.

Морфологическое исследование ткани легких³

Морфологическое исследование проводили следующим образом: извлеченный материал (образцы тканей легкого) помещался в 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) в течение не более 2 минут после

³ Исследования были проведены совместно с д.м.н. А.В. Смирновым, за что выражаем благодарность.

извлечения. Затем, в течение суток исследуемый материал находился в формалине при 4°C. После момента фиксации, выполняли вырезку материала. В дальнейшем материал проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации, хлороформ и заливали в парафин. На роторном микротоме были выполнены заготовки срезов (4 мкм), помещенные на предметные стекла. Далее срезы окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятым гистологическим методикам, а также использовали методику трихромной окраски по Carstairs для выявления фибрина в сгустках с целью подтверждения наличия тромбов в просветах сосудов (Eitzman D.T., 2003). Анализ морфологических показателей производили с помощью цифровой камеры AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия) на базе микроскопа AxioCamPlus (CarlZeiss, Германия) с использованием объективов x10; x40. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

2.2.9. Модель Global Thrombosis Test (тест по Горогу)

Эксперименты выполнены на 15 белых беспородных крысах-самцах весом 250-300 г. согласно методу (Otsui K., 2015; Yamamoto J., 2003). Соединение HC-NAR-0273b и дабигитрана этексилат растворяли в дистиллированной воде и вводили внутривенно за 2 часа до начала проведения эксперимента в дозах 5,5 и 12 мг/кг соответственно. Контрольным животным вводился растворитель в эквивалентном объеме. Через 1 час 45 минут проводили наркотизацию животных с помощью хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг внутривенно. Для исследования проводилась послойная лапаротомия, и осуществлялся забор крови из брюшной аорты. Полученную нестабилизированную кровь помещали в пробирку GTT (рисунок 2.5.). На дисплее прибора фиксировали время окклюзии и время лизиса при помощи программного обеспечения GTTDraw2.3.

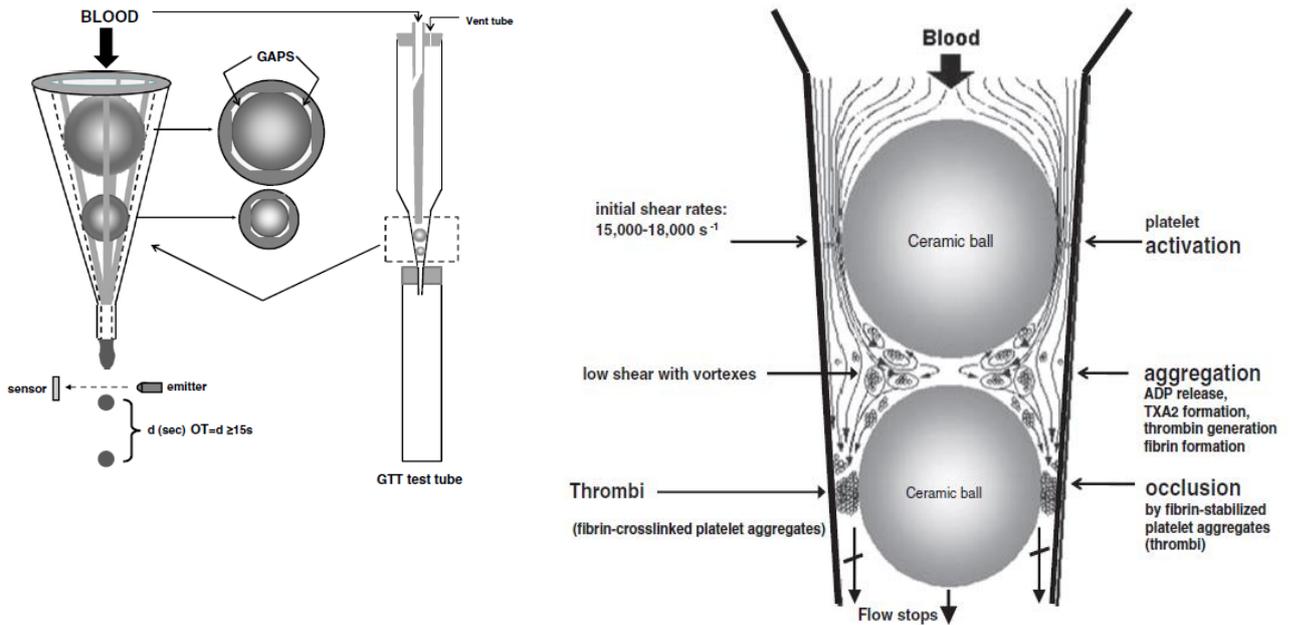


Рисунок 2.5 - Принцип метода и строение пробирки Горога (Otsui K., 2015)

2.2.10. Определения ингибитора фактора Па с использованием хромогена S-2238 *ex vivo*

Исследования выполняли на 35 белых беспородных крысах самцах. Соединение HC-NAR-0273b вводили однократно внутривенно в дозах 2,5; 5,5 и 11 мг/кг, а препарат сравнения дабигатрана этексилат был изучен в дозах 3,0; 6,0 и 12,0 мг/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду. Кровь забирали из брюшной аорты крыс, которых предварительно наркотизировали (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно) через 2 часа после введения исследуемых образцов. Полученную кровь собирали в пробирку для взятия крови и центрифугировали при комнатной температуре в течение 15 минут при 3000 об/мин (1200g). Отбирали плазму и повторно центрифугировали в тех же условиях. Для анализа использовали только верхнюю треть плазмы. Анализ выполняли согласно инструкции к набору «Ренапарин – плазма тест». Проводили оценку степени связывания исследуемых веществ с Па фактором.

Метод определения активности потенциальных антикоагулянтов основан на способности комплекса антитромбин III-гепарин нейтрализовать активированные факторы Па. Активность тестируемых соединений в плазме определяли, добавляя

к ним избыток антитромбина III и фактора IIa. При этом происходило ингибирование факторов IIa комплексом АТIII-тестируемые образцы пропорционально их количеству в плазме крови.

Процесс идет по следующим схемам:

При определении анти IIa активности соединения HC-NAR-0273b

АТIII (избыток) + HC-NAR-0273b = АТIII- HC-NAR-0273b.

АТIII - HC-NAR-0273b + IIa (избыток) = АТIII- HC-NAR-0273b-IIa+IIa (остаток).

IIa (остаток) + IIaСубстрат-pNA = Пептид + pNA.

Принцип методики основан на следующей реакции:

Фермент

Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA -----> Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-OH+pNA

Оценку определения активности проводили на основании разницы оптической плотности поглощения (желтого цвета) между образующейся pNA (паранитроанилин) и исходным субстратом. Скорость образования pNA, т.е. увеличение поглощения в секунду при оптической плотности 405 нм, пропорциональна ферментативной активности и удобно определяется с помощью фотометра.

2.2.11. Метод исследования влияния на уровень IIa фактора в плазме крыс *ex vivo*

Влияние соединений на уровень IIa фактора изучали на 15 крысах-самцах методом иммуноферментного анализа с использованием набора ELISA Kit for Coagulation Factor II (F2), на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200. Введение соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигитрана этексилата проводили внутрижелудочно однократно с помощью интрагастрального зонда за 2 часа до забора крови для исследования. Группе контрольных животных также вводили растворитель (дистиллированную воду). Наркотизацию крыс проводили хлоралгидратом (400 мг/кг – внутрибрюшинно). Забор крови выполняли из брюшной аорты и переливали в пластиковую пробирку

с цитратом натрия (3,8%) в соотношении 9:1. Богатую тромбоцитами плазму крыс получали согласно методу (Люсов, В.А., 1971). Для исследования использовали постоянный объем плазмы в количестве 300 мкл. Пробоподготовку осуществляли согласно инструкции к набору. Проводили измерение уровня Па фактора в плазме интактных крыс контрольной и опытных групп. Оптическую плотность измеряли при 405 нм, с коррекцией между 570 и 590 нм.

2.2.12. Методика изучения влияния на разведенное тромбиновое время с помощью Hemoclot kit теста

Метод определения ингибиторов тромбина Hemoclot представляет собой анализ свертывания крови (разведенное тромбиновое время) для определения концентрации дабигатрана и потенциальных антикоагулянтных средств в плазме крови. Разведенный исследуемый образец смешивается с нормальной пульной бедной тромбоцитами плазмой (pooled PPP). Затем начинается процесс свертывания путем добавления высокоочищенного тромбина, в основном в форме α -тромбина. Полученное время свертывания связано с концентрацией дабигатрана или исследуемого соединения в исследуемой плазме.

Эксперименты выполняли на 15 крысах-самцах, массой 230-250 г. Исследование проводилось на полуавтоматическом коагулометре Solar (SOLAR, Беларусь) в режиме определения тромбинового времени, при добавлении высокоочищенного тромбина, входящего в состав набора определяли время образования нитей фибрина. Препарат сравнения дабигатрана этексилат и соединение HC-NAR-0273b вводили в 12 и 5,5 мг/кг. Группе контрольных животных вводили дистиллированную воду.

Кровь забирали из брюшной аорты крыс, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг (внутрибрюшинно). Забранную кровь центрифугировали в течение 10 минут при 3000 с целью получения бедной тромбоцитами плазмы. Полученные контрольные образцы бедной тромбоцитами плазмы были помещены в одну пробирку и заморожены при температуре -70°C . Таким образом, был получен пул плазмы, которая в дальнейшем использовалась

для разведения опытных образцов. Перед выполнением исследования контрольные образцы размораживали при 37°C в течение 5 мин и перемешивали. После достижения образцами температуры окружающей среды проводили исследования. Все реактивы теста Hemoslot растворяли согласно инструкции. Опытные образцы – дабигатрана этексилата и соединения HC-NAR-0273b разводились в 8 и 20 раз полученной пульной плазмой. Проводили оценку влияния на параметр тромбинового времени.

2.2.13. Методика изучения влияния на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином

Изучение влияния соединения HC-NAR-0273b на агрегацию тромбоцитов, стимулированных тромбином, выполняли на цельной крови 5 кроликов *in vitro*. Исследования выполняли на двухканальном импедансном агрегометре ChronoLog - 700. Метод основан на изменении электрического сопротивления при изменении количества тромбоцитов. При этом электродная зондирующая сборка погружалась в кювету, содержащую тестовый образец цельной крови. Электродная сборка представляет собой два проводника из благородных металлов, которые погружали в образец. К зондирующему контуру подавали переменное напряжение в диапазоне до милливольт. Прибор измерял электрическое сопротивление или импеданс между двумя погруженными проводниками. Калибровка прибора проводилась по инструкции. Исследования выполняли не ранее 15 минут и не позднее 2 часов после забора крови.

При изучении антиагрегантной активности тестируемых образцов в кювету вносили 900 мкл цельной крови, которую затем инкубировали в течение 5 минут в ячейке агрегометра при температуре 37°C, после чего начинали регистрацию процесса и на 10 секунде добавляли 10 мкл тромбина в концентрации 0,5 ед/мл. Запись агрегатограммы выполняли в течение 5 минут.

2.2.14. Методика изучения влияния на параметры коагулограммы и тромбоэластограммы в условиях гиперцитокинемии *in vitro* и *ex vivo*

Исследования *in vitro* выполняли на 6 кроликах породы «Шиншилла». Анализ проводили хронометрически, на гемокоагулометре «SOLAR» (Белоруссия). Гиперцитокинемию воспроизводили путем инкубации липополисахарида (ЛПС, *E. coli* O111:B4; Sigma, США) с цельной кровью до получения опытных образцов бедной тромбоцитами плазмы в конечной концентрации 10 мкМ и после чего производили измерения по вышеописанным методикам. Соединение НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилат по влиянию на параметры коагулограммы исследовали в диапазоне концентраций 10-0,1 мкМ с расчетом EC_{50} и условного терапевтического индекса (УТИ). При изучении влияния тестируемых соединений на показатели тромбоэластограммы соединение НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилат исследовали в концентрации 100 мкМ.

Опыты *ex vivo* выполняли на 35 крысах самцах. Гиперцитокинемию создавали внутривенным введением ЛПС в дозе 2 мг/кг (QunFu H., 2014) в хвостовую вену крысы через 2 часа после введения соединения НС-NAR-0273b и препарата сравнения в дозах 5,5 и 12,0 мг/кг соответственно. Забор крови производился из брюшной аорты через 4 часа после введения ЛПС и выполнялась оценка антикоагулянтной активности согласно вышеописанным методикам.

2.2.15. Исследование соединения-лидера на модели ЛПС-индуцированного тромбоза легких с проведением морфологических исследований

Введение раствора исследуемого соединения и препарата сравнения дабигатрана этексилата в дозах 13 и 27 мг/кг было осуществлено атравматичным металлическим гастральным зондом за 2 часа до начала эксперимента. Контрольной группе животных вводился растворитель (дистиллированная вода).

Мышей фиксировали в специализированном домике с доступом к хвосту. В хвостовую вену инсулиновым шприцом вводили ЛПС в дозе 20 мг/кг, который

растворяли в физиологическом растворе. Через сутки у умерших и выживших животных проводили забор легких для гистологической оценки.

Морфологическое исследование ткани легких

Морфологическое исследование тканей легких проводили по вышеописанной методике (см. п.2.2.8).

Для анализа морфологических показателей производили микрофотосъемку цифровой камерой Axiosam 105 color (CarlZeiss, Германия, 5 мегапикселей) на базе микроскопа Axiosamplus (CarlZeiss, Германия) с использованием объектива x10; x40 и окуляра x10. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

2.2.16. Метод исследования общетоксических свойств по методу Irwin S

Исследования выполняли на 50 белых беспородных мышах-самцах, массой 20-25 г., согласно методу (Irwin S., 1964). Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду. Соединение HC-NAR-0273b вводили внутривенно в дозах: 5,5 мг/кг, 55 мг/кг, 550 мг/кг и 2000 мг/кг. Всего было 1 контрольная и 4 экспериментальные группы.

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.

Поведенческие реакции.

В установке "открытое поле" исследовали *возбудимость* животных, которую оценивали по уровню двигательной активности и агрессивности что может свидетельствовать о возбуждающем действии на ЦНС.

Тест "открытое поле" дает возможность провести оценку влияния на эмоциональный статус животных, а также ориентировку на местности и исследовательское поведение. (Воронина Т.А., 2002). При выполнении эксперимента животное хвостом к экспериментатору помещали в центральный

квадрат площадки после чего регистрировали ряд показателей в течение 2 минут согласно методу (Буреш Я., 1991).

Выполнялась оценка следующих показателей:

- 1) горизонтальная активность;
- 2) вертикальная активность;
- 3) определение количества заглядываний в отверстия на полу;
- 4) подсчет выходов в центральную зону, актов груминга, количество дефекаций и уринаций;
- 5) определяли реактивность животного; его настороженность (реакция на звуковой раздражитель);
- 6) агрессивность и пугливость животных определялась при прикосновении корнцангом.

Нервно-мышечная возбудимость.

Данный вид активности определяли в баллах (0-4 балла), где 0-отсутствие признака, 4-максимальный балл.

Определялись следующие показатели:

- 1) подергивания (тремор; судороги; изменения положения тела);
- 2) болевая реакция (фиксируется время вокализации, в секундах);
- 3) общий тонус скелетных мышц (тонус конечностей)
- 4) реакция на стук.

Для чистоты эксперимента, указанные показатели измеряются только одним экспериментатором в течение всей серии.

Мышечная координация изучается в 2 тестах: удерживание на сетке и удерживание на проволоке. Удерживание на сетке оценивает способность животного удерживаться в течение 30 с за сетку в перевернутом положении (фиксируется количество лапок за счет которого закрепляется животное на сетке, максимальная оценка 4). В тесте удержания, животное подвешивается за передние лапы к проволоке (® 3-5 мм) и оценивается количество лапок, которым животное будет удерживаться за проволоку в течение 30 секунд (максимальное значение 4).

Для регистрации *миорелаксирующего действия* исследуется способность принудительно передвижения в ротарод-тесте (цилиндр диаметром 2 см, скорость вращения 10 об/мин, регистрируют число мышей, падающих со стержня в течение 30 с).

Рекомендуется дополнительно регистрировать возникновение следующих нарушений:

«Горбатость» определяется по укорочению расстояния от шеи до хвоста за счет сгорбленности (мышцы): 0 б - отсутствие; 1 б - меньше, чем на 3 см, 2 б - больше, чем на 3 см.

Ригидность (скованность) мышечный тонус задних лап по сопротивлению пассивной флексии в голеностопном суставе.

Влияния на рефлекс.

Роговичный рефлекс - оценка производится по реакции отдергивания головы при раздражении роговицы с помощью пинцета.

Слуховой рефлекс оценивается по реакции отдергивания головы при раздражении слухового прохода, при помощи пинцета.

Импелатеральный/сгибательный рефлекс измеряли при помощи сдавливания лапы зажимом, во время которого производили оценку времени возникновения и силы реакции.

Вегетативные эффекты.

Оценка величины зрачка и наличие птоза (0 б - полное открытие, 1 б - до 2 мм, 2 б - до 1 мм, 3 б - полное закрытие), экзофтальма, саливация (пятно на шее: 0 б - отсутствие, 1 б - до 0,5 см, 2 б - до 1 см, 3 б - до 2 см)

Тонус сосудов уха (*цвет кожи*) - осмотр цвета кожи ушей и сравнение с контрольными животными.

Уринация и дефекация фиксируется при прохождении в тесте "открытое поле".

Частота дыхания (ЧДД) – оценку проводили, подсчитывая число дыхательных движений в течение 1 минуты.

Ректальная температура – измерения температуры проводились с помощью специального датчика термометра.

2.2.17. Метод исследования острой токсичности (LD₅₀)

Объем вводимой дозы тестируемого образца для каждого животного рассчитывали исходя из массы тела. Тестируемый образец HC-NAR-0273b, растворенный в дистиллированной воде в следующих дозах 5,5; 55; 550; 1200 и 2000 мг/кг вводили мышам самцам внутрижелудочно с помощью зонда.

После введения тестируемого соединения определялось количество погибших животных. За оставшимися особями устанавливали наблюдение в течение 14 дней исследования, с целью выявления отдаленной смертности. В первый день исследования регистрировали сроки развития интоксикации и гибель животных в течение 6 часов (непрерывно) после введения вещества, в последующие дни - утром и вечером (Миронов А.Н., 2012; Саноцкий И.В., 1975).

2.2.18. Статистический анализ

Для всех данных применяли описательную статистику с использованием подходящих критериев, которые представлены в итоговых таблицах. 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 с расчётом показателя $\Delta\%$ выживаемости клеток и концентрации, вызывающей цитостатический эффект на 50% (CC₅₀).

ГЛАВА 3. ПОИСК ВЕЩЕСТВ С АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНОВ И ТРИАЗОЛО[5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИНОВ *IN VITRO*

В настоящее время для предотвращения образования тромбов используются новые пероральные антикоагулянты – дабигатран, апиксабан, ривароксабан и др., которые в значительной степени заменили варфарин для долгосрочной терапии (Franco Moreno A.I., 2018). Их преимуществом является пероральная форма приема, постоянная доза, отсутствие потребности в мониторинге при длительном использовании (Barr D., 2019; Renon F., 2021). 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). Проводимые современные клинические исследования продемонстрировали, что прекращение приема ривароксабана и апиксабана, могут вызвать тромбоэмболические явления (Kearon C., 2014). Поэтому поиск, изучение и создание новых прямых антикоагулянтов для перорального приема средств с наименьшими побочными эффектами является важной задачей в решении проблемы предотвращения осложнений венозных тромбозов. Для этого необходимо провести поиск новых соединений, проявляющих антикоагулянтную активность в опытах *in vitro* и оценить их эффекты в условиях целого организма в сравнении с эталонными препаратами. Изучение цитотоксического действия и острой токсичности позволит определить преимущества фармакодинамических свойств наиболее активного соединения.

3.1. Поиск активных соединений по влиянию на параметры коагулограммы (АЧТВ, тромбиновое время, протромбиновое время) *in vitro*

Поиск активных соединений по влиянию на параметры коагулограммы проводили в ряду новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов (31 соединение) и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов (11 соединений). Изучение воздействия производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов на коагуляционные

характеристики интактной крови кроликов *in vitro* в концентрации 100 мкМ представлены в таблице 3.1. Так, в контроле показатель АЧТВ составил 47,2 секунды. При этом антикоагулянты прямого действия дабигатрана этексилат и аписабан достоверно удлиняли данный показатель в 1,7 и 2,6 раза соответственно. Из 31 изученных соединений 10 достоверно пролонгировали АЧТВ относительно контроля в 1,2-1,5 раза.

Контрольные показатели тромбинового времени составили 11,65 секунды. Дабигатрана этексилат в концентрации 100 мкМ статистически значимо увеличивал продолжительность данного показателя относительно контрольных значений в 6 раз. Аписабан не оказывал активного влияния на данный параметр. Все исследованные соединения достоверно удлиняли тромбиновое время. 25 производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов пролонгировали данный параметр в 2-4 раза относительно контроля. Соединения под шифрами НС-109 и КС-984 увеличивали тромбиновое время в 6,5 и 8,3 раза соответственно. Еще более пролонгировали данный параметр соединения FV-174/Na и КС-G в 11,5 и 12,5 соответственно. Наибольшее антитромбиновое действие проявило соединение под шифром НС-NAR-0273b, которое удлиняло тромбиновое время в 13,2 раза, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат в 2,2 раза.

Показатель протромбинового времени в контроле составил 14,6 секунд. Дабигатрана этексилат в концентрации 100 мкМ не оказывал влияния на данный параметр. В отличие от него препарат аписабан в данной концентрации удлинял протромбиновое время в 13,6 раза. Однако, ни одно из новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов не оказало влияния на данный параметр (таблица 3.1).

Таблица 3.1 - Влияние новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов на параметры коагулограммы крови кроликов *in vitro* в концентрации 100 мкМ ($M \pm m$) (n=6)

| № п/п | Тестируемый образец | Параметр коагулограммы | | |
|----------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------|
| | | АЧТВ, с | ТВ, с | ПТВ, с |
| 1. | Контроль | 47,2 ± 0,4 | 11,7 ± 0,1 | 14,6 ± 0,1 |
| 2. | Дабигатрана этексилат | 79,6 ± 4,6* | 69,5 ± 4,5* | 16,7 ± 0,2* |
| 3. | Апиксабан | 137,5 ± 2,8* | 14,6 ± 0,1* | 67,8 ± 2,5* |
| 4. | В-270 | 51,8 ± 1,6 | 36,2 ± 1,6* | 10,0 ± 0,3 |
| 5. | В-286 | 52,4 ± 2,5 | 29,0 ± 2,7* | 11,8 ± 0,4 |
| 6. | В-349 | 63,9 ± 4,2* | 36,7 ± 1,5* | 10,7 ± 0,3 |
| 7. | BS-3 | 59,7 ± 2,6* | 31,7 ± 2,3* | 11,4 ± 0,5 |
| 8. | В309 | 43,3 ± 3,7 | 21,7 ± 0,5* | 11,2 ± 0,4 |
| 9. | В275 | 36,2 ± 0,8 | 21,7 ± 0,5* | 10,8 ± 1,0 |
| 10. | КС-786 | 65,3 ± 2,7* | 108,7 ± 8,2 [#] | 13,9 ± 0,4 |
| 11. | КС-955 | 50,4 ± 1,7 | 29,1 ± 1,3* | 10,1 ± 0,2 |
| 12. | КС-956 | 58,8 ± 2,1* | 33,7 ± 2,1* | 11,6 ± 0,4 |
| 13. | КС-960 | 63,7 ± 3,8* | 37,9 ± 1,5* | 10,8 ± 0,3 |
| 14. | КС-965 | 51,8 ± 1,9 | 29,1 ± 1,6* | 11,0 ± 0,3 |
| 15. | КС-986 | 50,8 ± 1,8 | 28,4 ± 1,1* | 10,1 ± 0,4 |
| 16. | КС-1183 | 51,8 ± 1,3 | 31,0 ± 1,3* | 10,4 ± 0,2 |
| 17. | КС-1301 | 58,0 ± 1,2* | 30,3 ± 1,9* | 9,9 ± 0,3 |
| 18. | КС-1304 | 52,9 ± 4,2 | 31,7 ± 1,8* | 10,9 ± 0,3 |
| 19. | КС-1317 | 58,0 ± 3,2* | 34,8 ± 1,4* | 10,4 ± 0,2 |
| 20. | КС-1318 | 63,2 ± 2,2* | 30,1 ± 2,5* | 10,4 ± 0,4 |
| 21. | КС-SH4 | 59,5 ± 4,7* | 34,8 ± 1,8* | 10,6 ± 0,2 |

| | | | | |
|-----|--------------|-------------|----------------|------------|
| 22. | КС-G | 63,9 ± 0,6* | 134,8 ± 10,4*# | 14,3 ± 0,6 |
| 23. | FV-174/Na | 55,5 ± 0,8* | 146,7 ± 5,2*# | 13,8 ± 0,1 |
| 24. | КС-984 | 50,6 ± 2,1 | 97,9 ± 9,1*# | 13,1 ± 0,8 |
| 25. | TD | 67,2 ± 3,1* | 37,9 ± 1,1* | 13,4 ± 1,0 |
| 26. | НС-6a | 51,8 ± 1,4 | 22,4 ± 0,6* | 9,4 ± 0,4 |
| 27. | НС-71 | 34,6 ± 1,2 | 34,7 ± 1,7* | 14,2 ± 0,7 |
| 28. | НС-109 | 56,2 ± 5,1* | 66,6 ± 4,6* | 11,6 ± 1,0 |
| 29. | НС-10a | 30,6 ± 2,6 | 27,1 ± 0,9* | 12,7 ± 0,6 |
| 30. | НС-11a | 30,9 ± 0,7 | 48,6 ± 14,9* | 13,2 ± 0,7 |
| 31. | НС-82a | 27,6 ± 0,7 | 41,4 ± 1,6* | 13,9 ± 0,5 |
| 32. | НС-82b | 26,3 ± 0,9 | 43,8 ± 1,5* | 13,4 ± 0,2 |
| 33. | НС-82c | 25,9 ± 0,7 | 21,0 ± 0,1* | 15,8 ± 0,3 |
| 34. | НС-NAR-0273b | 61,8 ± 4,6* | 154,4 ± 11,1*# | 14,1 ± 0,4 |

Примечание: * - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони ($p \leq 0,05$);

- изменения достоверны по отношению к препарату сравнения дабигатрана этексилату, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони ($p \leq 0,05$);

n- число тестируемых животных.

Данные по изучению влияния 11 новых производных триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов представлены в таблице 3.2. Из исследованных соединений соединений 5 достоверно пролонгировали АЧТВ относительно контроля в 1,2-1,3 раза. При этом все производные триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов достоверно удлиняли тромбиновое время в 2-3 раза, за исключением соединения под шифром Dr-497, которое увеличивало данный показатель в 8.4 раза, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат в 1,4 раза. Однако, ни одно из новых производных триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов не оказало влияния на данный параметр (таблица 3.2).

Таблица 3.2 - Влияние новых производных триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов на параметры коагулограммы крови кроликов *in vitro* в концентрации 100 мкМ ($M \pm m$) (n=6)

| № п/п | Тестируемый образец | Параметр коагулограммы | | |
|----------|--------------------------|------------------------|--------------|---------------|
| | | АЧТВ,с | ТВ, с | ПТВ, с |
| 1. | Контроль | 47,2 ± 0,4 | 11,7 ± 0,1 | 14,60 ± 0,1 |
| 2. | Дабигатрана этексилат | 79,56 ± 4,6* | 69,45 ± 4,5* | 16,70 ± 0,2* |
| 3. | Апиксабан | 120,4 ± 4,2* | 19,7 ± 2,6* | 198,4 ± 11,0* |
| 4. | Be7 | 49,3 ± 4,3 | 39,1 ± 2,2* | 10,7 ± 0,4 |
| 5. | Dr-497 | 53,2 ± 0,5 | 98,2 ± 7,6*# | 13,1 ± 0,3 |
| 6. | Dr-744 | 56,9 ± 1,7* | 31,5 ± 0,7* | 10,1 ± 0,3 |
| 7. | Dr-758 | 56,0 ± 2,3* | 36,5 ± 2,1* | 10,6 ± 0,4 |
| 8. | Dr-761 | 58,3 ± 1,2* | 34,0 ± 2,0* | 10,4 ± 0,3 |
| 9. | Dr-762 | 61,9 ± 1,9* | 32,3 ± 1,5* | 11,7 ± 0,9 |
| 10. | Dr-763 | 54,6 ± 2,2* | 29,4 ± 1,5* | 10,9 ± 0,3 |
| 11. | Dr-765 | 58,0 ± 1,6* | 21,5 ± 1,3* | 11,3 ± 0,4 |
| 12. | Dr-767 | 51,6 ± 2,1 | 32,8 ± 1,9* | 10,0 ± 0,3 |
| 13. | VP-4 | 62,2 ± 1,9* | 29,6 ± 1,7* | 10,7 ± 0,4 |
| 14. | VP-6 | 48,9 ± 2,2 | 39,0 ± 2,0* | 10,3 ± 0,3 |

Примечание: * - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони ($p \leq 0,05$);

- изменения достоверны по отношению к препарату сравнения дабигатрана этексилату, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони ($p \leq 0,05$);

n - число тестируемых животных.

Таким образом, по влиянию на параметры коагулограммы крови кроликов в ряду новых триазоло[1,5-а]пиримидинов было выявлено больше соединений,

проявляющих антитромбиновую активность, чем в ряду новых производных триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов.

Далее было изучено антитромбиновое действие трех наиболее активных соединений FV-174/Na, KC-G и HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата в зависимости от концентрации с целью расчета EC_{50} . Полученные результаты представлены на рисунке 3.1. и таблице 3.3.

Так препарат сравнения дабигатрана этексилат в концентрации 10 мкМ достоверно удлинял данный показатель до 46,8 секунд, что соответствует достоверному увеличению его относительно контроля на 302,0%. При дальнейшем уменьшении концентрации до 5 и 1 мкМ тромбиновое время также статистически значимо пролонгировалось на 176,1 и 42,3% соответственно. В концентрации 0,1 мкМ дабигатрана этексилат не оказывал влияние на данный параметр. EC_{50} антитромбиновой активности препарата сравнения составило 1,4 мкМ.

Соединение HC-NAR-0273b в концентрации 10 мкМ достоверно удлиняло показатель тромбинового времени до 66 секунд, что на 467,1% больше контрольных значений. При снижении концентрации вещества до 5 и 1 мкМ тромбиновое время также уменьшалось до 34,3 и 16,6 секунд, но при этом статистически значимо увеличивалось относительно контрольных значений на 194,1 и 46,5% соответственно. В концентрации 0,1 мкМ Соединение HC-NAR-0273b не влияло на данный параметр. EC_{50} антитромбиновой активности при этом было равно 1,25 мкМ.

Таблица 3.3 - EC_{50} соединений HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G и KC-786 и препарата сравнения дабигатрана этексилата по влиянию на тромбиновое время крови кроликов *in vitro* ($M \pm m$) (n=6)

| № п/п | Тестируемый образец | $\Delta\%$ 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 | 1,4 |

| | | | | | | |
|----|--------------|--------------|--------------|------------|----------|------|
| 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 | 0,9 |

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 ($p \leq 0,05$);

n – число тестируемых животных.

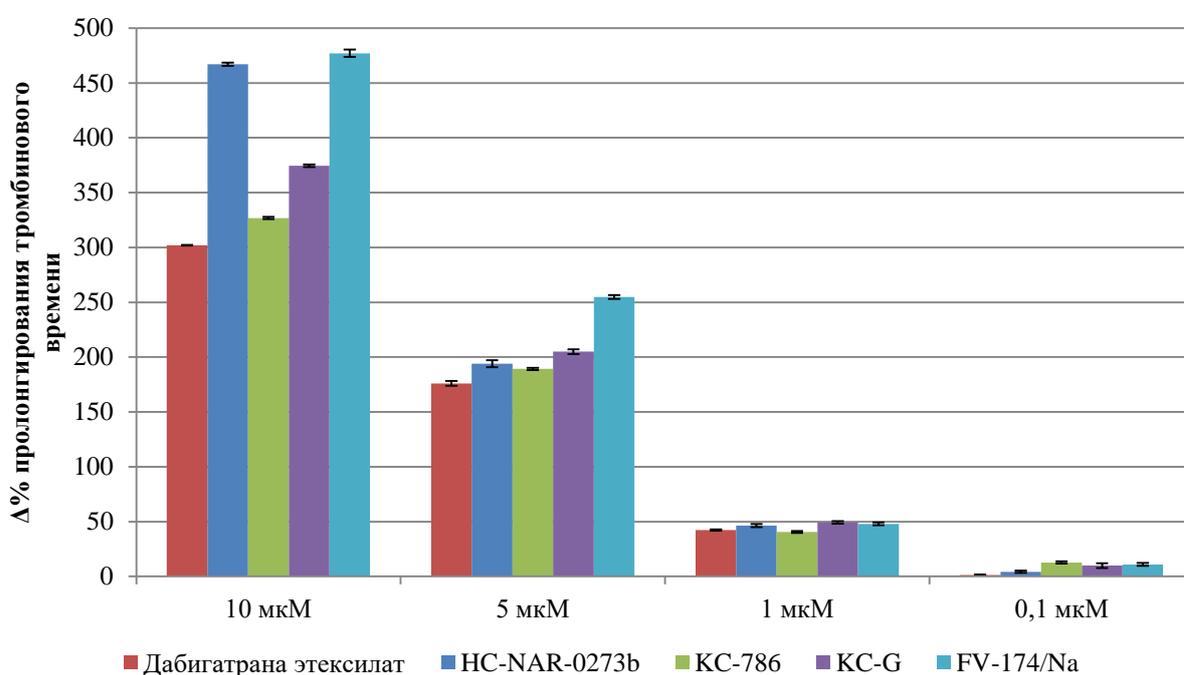


Рисунок 3.1 - Влияние соединений HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G и KC-786 и препарата сравнения дабигатрана этексилата на показатель тромбинового времени в зависимости от концентрации

Соединение KC-786 в концентрации 10 мкМ статистически значимо пролонгировало тромбиновое время до 49,7 секунд, что относительно контроля составило на 326,9% больше. При снижении концентрации данного вещества до 5 и 1 мкМ показатель тромбинового времени снижался до 33,7 и 16,4 секунд, что относительно контрольных значений было больше на 189,3 и 40,6% соответственно. В концентрации 0,1 мкМ соединение KC-786 не влияло на данный

параметр. EC_{50} антитромбиновой активности данного вещества составила 1,15 мкМ.

Соединение КС-G также проявило антитромбиновую активность в зависимости от концентрации. Так в концентрации 10 мкМ оно достоверно удлиняло тромбиновое время на 374,5%, при этом показатель данного параметра составил 55,3 секунд. При уменьшении концентрации до 5 и 1 мкМ тромбиновое время составило 35,5 и 17,4 секунд, что относительно контрольных значений было больше на 205,0 и 49,4% соответственно. В концентрации 0,1 мкМ соединение КС-G не влияло на данный параметр. EC_{50} антитромбиновой активности соединения КС-G была равна 1,15 мкМ.

Вещество под шифром FV-174/Na в концентрации 10 и 5 мкМ достоверно удлиняло тромбиновое время на 477,1 и 254,8%, при этом параметр тромбинового времени составил 67,2 и 41,3 секунду соответственно. В концентрации 1 мкМ тромбиновое время было равно 17,2 секундам. В концентрации 0,1 мкМ соединение КС-786 не влияло на данный параметр. EC_{50} антитромбиновой активности вещества FV-174/Na была равна 0,9 мкМ.

Таким образом, по EC_{50} антитромбиновой активности *in vitro* изученные соединения можно расположить в следующем порядке: FV-174/Na > КС-G > КС-786 > НС-NAR-0273b > Дабигатрана этексилат.

3.2. Подструктурный анализ зависимости прямой антикоагулянтной активности производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина

3.2.1. База данных по структуре и прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина

Впервые была сформирована верифицированная база данных SAR TrTime по структуре и прямой антикоагулянтной активности новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина,

интерфейс которой приведен в разделе Материалы и метода на рисунке 2.1.

База данных включает сведения о 42 новых соединениях, из которых 31 относится к производным [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина, а 11 – к производным [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины; скаффолды базовых структур приведены в разделе Материалы и методы на рисунке 2.3.

В результате кластерного анализа процентных значений увеличения тромбинового времени TrT для указанных соединений были выявлены следующие границы классов прямой антикоагулянтной активности:

high – $\text{TrT} > 394\%$;

moderate – $185\% < \text{TrT} \leq 394\%$;

high or moderate – $\text{TrT} > 185\%$;

low – $\text{TrT} \leq 185\%$;

Соответственно, из 42 соединений БД SAR TrTime по уровню прямой антикоагулянтной активности семи присвоена метка high, 15 – метка moderate и 20 – метка low.

3.2.2. Статистическая оценка значимости влияния структурных фрагментов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины на уровень их прямой антикоагулянтной активности

В сформированную таблицу с индексацией фрагментных признаков 42 изучаемых соединений вошло 36 релевантных структурных переменных.

Показатели статистической значимости их влияния на высокий уровень прямой антикоагулянтной активности приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 - Расчетные статистические оценки значимости влияния структурных фрагментов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины на высокий уровень их прямой антикоагулянтной активности

| № | Признак | P_h | P_{nh} | z | Pr | Ind_h |
|----|------------------------|-------|----------|------|----------|---------|
| 1 | TrPyr | 0.546 | 0.454 | 0.69 | 2.45E-01 | 0.2 |
| 2 | TrTr | 0.359 | 0.641 | 1.22 | 1.12E-01 | -1.0 |
| 3 | 12= | 0.178 | 0.822 | 2.01 | 2.22E-02 | -3.0 |
| 4 | 23= | 0.609 | 0.391 | 1.49 | 6.78E-02 | 2.0 |
| 5 | 34= | 0.379 | 0.621 | 0.99 | 1.62E-01 | -1.0 |
| 6 | R1-2-C4H3S | 0.710 | 0.290 | 1.25 | 1.06E-01 | 1.0 |
| 7 | R1=O | 0.607 | 0.393 | 1.31 | 9.57E-02 | 2.0 |
| 8 | R1-OH | 0.797 | 0.203 | 1.71 | 4.40E-02 | 3.0 |
| 9 | R1-CH2-2-C4H3S | 0.797 | 0.203 | 1.71 | 4.40E-02 | 3.0 |
| 10 | R1-C6H4(3-NHCOCH2NH2) | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 11 | R1-C6H5 | 0.263 | 0.737 | 1.13 | 1.29E-01 | -1.0 |
| 12 | R1-C6H3(3,4-(OCH3)2) | 0.199 | 0.801 | 1.75 | 4.04E-02 | -3.0 |
| 13 | R1-NH2 | 0.178 | 0.822 | 2.01 | 2.22E-02 | -3.0 |
| 14 | R1-C6H2(2,3,4-(OCH3)3) | 0.227 | 0.773 | 1.46 | 7.28E-02 | -2.0 |
| 15 | R1-C6H4(4-NHCOCH2NH2) | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 16 | R1-PHC6H5 | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 17 | R2-NO2 | 0.607 | 0.393 | 1.31 | 9.57E-02 | 2.0 |
| 18 | R2-COOC2H5 | 0.541 | 0.459 | 0.31 | 3.78E-01 | 0.2 |
| 19 | R2-OH | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 20 | R2-CN | 0.125 | 0.875 | 2.88 | 1.96E-03 | -4.0 |
| 21 | R3-2-C4H3O | 0.598 | 0.402 | 0.83 | 2.03E-01 | 0.2 |
| 22 | R3-2-(5-NO2-C4H2O) | 0.797 | 0.203 | 1.71 | 4.40E-02 | 3.0 |
| 23 | R3-COOC2H5 | 0.797 | 0.203 | 1.71 | 4.40E-02 | 3.0 |
| 24 | R3-SC2H5 | 0.797 | 0.203 | 1.71 | 4.40E-02 | 3.0 |

| | | | | | | |
|----|-----------------|-------|-------|-------|----------|------|
| 25 | R3-SCH3 | 0.178 | 0.822 | 2.01 | 2.22E-02 | -3.0 |
| 26 | R3-C6H5 | 0.312 | 0.688 | 0.75 | 2.25E-01 | -0.2 |
| 27 | R3-2-C4H3S | 0.227 | 0.773 | 1.46 | 7.28E-02 | -2.0 |
| 28 | R3-3-C5H4N | 0.312 | 0.688 | 0.75 | 2.25E-01 | -0.2 |
| 29 | R3-SC3H7 | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 30 | R3-CH3 | 0.312 | 0.688 | 0.75 | 2.25E-01 | -0.2 |
| 31 | R3-SCH2C6H5 | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 32 | R3-SCH2CCH | 0.384 | 0.616 | 0.31 | 3.79E-01 | -0.2 |
| 33 | R4-2-C4H3S | 0.710 | 0.290 | 1.25 | 1.06E-01 | 1.0 |
| 34 | R4-CH3 | 0.709 | 0.291 | 1.73 | 4.20E-02 | 3.0 |
| 35 | R4-C6H5 | 0.199 | 0.801 | 1.75 | 4.04E-02 | -3.0 |
| 36 | R4-C6H4(4-OCH3) | 0.500 | 0.500 | -0.25 | 5.99E-01 | 0.0 |

Примечание: P_h – Байесовская вероятность встречаемости признака в классе высокоактивных соединений;

P_{nh} – Байесовская вероятность встречаемости признака в классе не высокоактивных соединений;

z – биномиальный критерий;

Pr – значимость влияния признака на наличие или отсутствие высокой активности;

Ind_h – индекс влияния признака на наличие или отсутствие высокой активности.

Индексы значимости влияния фрагментных признаков у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина приведены на рисунке 3.2.

В таблице 3.4. и на рисунке 3.2. оттенками зеленого обозначены 11 признаков, положительно влияющих на высокий уровень прямой антикоагулянтной активности, а оттенками красного – 11 признаков, отрицательно влияющих на высокий уровень прямой антикоагулянтной активности.

Нумерация признаков на рисунке 3.2. соответствует нумерации признаков в таблице 3.4.

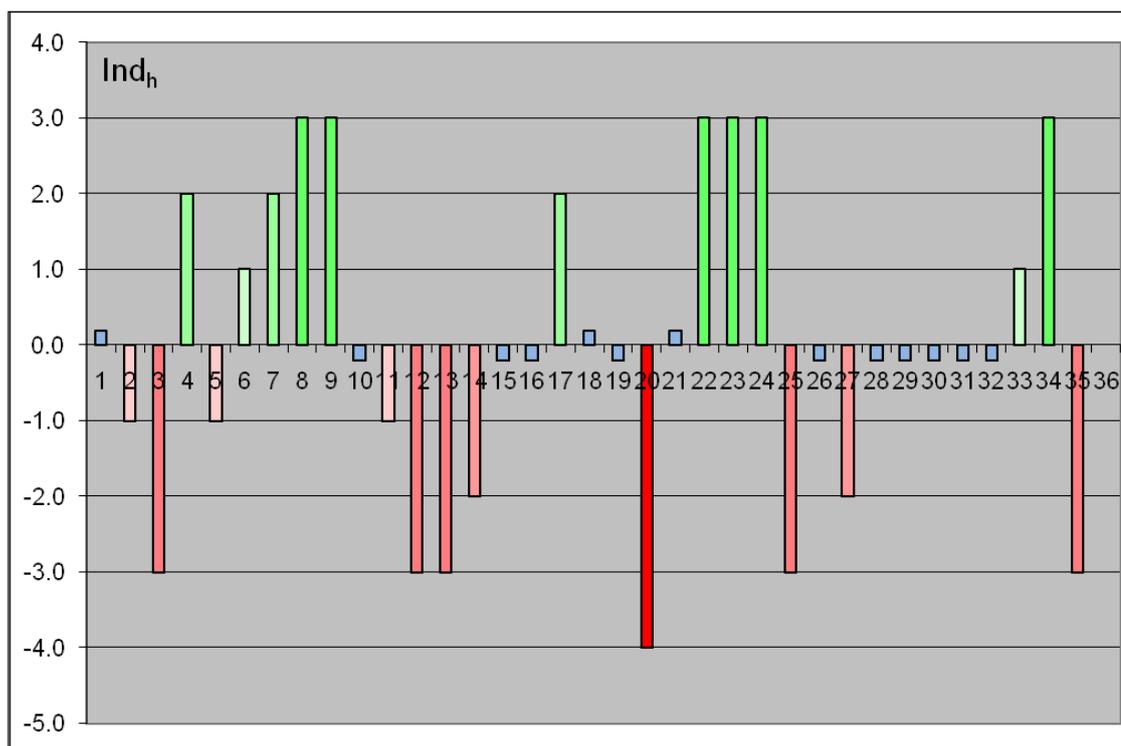


Рисунок 3.2 - Индексы влияния фрагментных признаков на отсутствие или наличие у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина высокой прямой антикоагулянтной активности

Примечание: цифрами обозначены фрагментные признаки.

Показатели статистической значимости влияния фрагментных признаков на высокий или умеренный уровень прямой антикоагулянтной активности приведены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 - Расчетные статистические оценки значимости влияния структурных фрагментов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина на высокий или умеренный уровень их прямой антикоагулянтной активности

| № | Признак | P_{hm} | P_{nhm} | z | Pr | Ind_{hm} |
|---|---------|----------|-----------|------|----------|------------|
| 1 | TrPyr | 0.520 | 0.480 | 0.25 | 3.99E-01 | 0.2 |
| 2 | TrTr | 0.451 | 0.549 | 0.40 | 3.45E-01 | -0.2 |

| | | | | | | |
|----|------------------------|-------|-------|-------|----------|------|
| 3 | 12= | 0.367 | 0.633 | 0.95 | 1.72E-01 | -1.0 |
| 4 | 23= | 0.534 | 0.466 | 0.38 | 3.52E-01 | 0.2 |
| 5 | 34= | 0.490 | 0.510 | 0.00 | 5.01E-01 | -0.2 |
| 6 | R1-2-C4H3S | 0.494 | 0.506 | -0.14 | 5.57E-01 | -0.2 |
| 7 | R1=O | 0.545 | 0.455 | 0.45 | 3.25E-01 | 0.2 |
| 8 | R1-OH | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 9 | R1-CH2-2-C4H3S | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 10 | R1-C6H4(3-NHCOCH2NH2) | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 11 | R1-C6H5 | 0.797 | 0.203 | 1.71 | 4.40E-02 | 3.0 |
| 12 | R1-C6H3(3,4-(OCH3)2) | 0.563 | 0.437 | 0.34 | 3.68E-01 | 0.2 |
| 13 | R1-NH2 | 0.367 | 0.633 | 0.95 | 1.72E-01 | -1.0 |
| 14 | R1-C6H2(2,3,4-(OCH3)3) | 0.164 | 0.836 | 2.20 | 1.37E-02 | -3.0 |
| 15 | R1-C6H4(4-NHCOCH2NH2) | 0.331 | 0.669 | 0.63 | 2.64E-01 | -0.2 |
| 16 | R1-PHC6H5 | 0.331 | 0.669 | 0.63 | 2.64E-01 | -0.2 |
| 17 | R2-NO2 | 0.434 | 0.566 | 0.71 | 2.38E-01 | -0.2 |
| 18 | R2-COOC2H5 | 0.573 | 0.427 | 0.62 | 2.69E-01 | 0.2 |
| 19 | R2-OH | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 20 | R2-CN | 0.407 | 0.593 | 0.81 | 2.08E-01 | -0.2 |
| 21 | R3-2-C4H3O | 0.591 | 0.409 | 0.70 | 2.43E-01 | 0.2 |
| 22 | R3-2-(5-NO2-C4H2O) | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 23 | R3-COOC2H5 | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 24 | R3-SC2H5 | 0.664 | 0.336 | 0.60 | 2.76E-01 | 0.2 |
| 25 | R3-SCH3 | 0.367 | 0.633 | 0.95 | 1.72E-01 | -1.0 |
| 26 | R3-C6H5 | 0.494 | 0.506 | -0.14 | 5.57E-01 | -0.2 |
| 27 | R3-2-C4H3S | 0.327 | 0.673 | 1.06 | 1.44E-01 | -1.0 |
| 28 | R3-3-C5H4N | 0.494 | 0.506 | -0.14 | 5.57E-01 | -0.2 |
| 29 | R3-SC3H7 | 0.331 | 0.669 | 0.63 | 2.64E-01 | -0.2 |
| 30 | R3-CH3 | 0.247 | 0.753 | 1.26 | 1.03E-01 | -1.0 |

| | | | | | | |
|----|--|-------|-------|-------|----------|------|
| 31 | R3-SCH ₂ C ₆ H ₅ | 0.331 | 0.669 | 0.63 | 2.64E-01 | -0.2 |
| 32 | R3-SCH ₂ CCN | 0.331 | 0.669 | 0.63 | 2.64E-01 | -0.2 |
| 33 | R4-2-C ₄ H ₃ S | 0.747 | 0.253 | 1.21 | 1.13E-01 | 1.0 |
| 34 | R4-CH ₃ | 0.708 | 0.292 | 1.41 | 7.89E-02 | 2.0 |
| 35 | R4-C ₆ H ₅ | 0.563 | 0.437 | 0.34 | 3.68E-01 | 0.2 |
| 36 | R4-C ₆ H ₄ (4-OCH ₃) | 0.500 | 0.500 | -0.25 | 5.99E-01 | 0.0 |

Примечание: P_{hm} – Байесовская вероятность встречаемости признака в классе соединений с высокой или умеренной активностью;

P_{nhm} – Байесовская вероятность встречаемости признака в классе соединений, у которых отсутствует высокая или умеренная активность;

z – биномиальный критерий;

P_r – значимость влияния признака на наличие или отсутствие высокой или умеренной активности;

Ind_{hm} – индекс влияния признака на наличие или отсутствие высокой или умеренной активности.

Диаграмма индексов влияния фрагментных признаков на отсутствие или наличие у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины высокой или умеренной прямой антикоагулянтной активности приведена на рисунке 3.3.

В таблице 3.5. и на рисунке 3.3. оттенками зеленого обозначены признаки, положительно влияющие на высокий или умеренный уровень прямой антикоагулянтной активности, а оттенками красного – признаки, отрицательно влияющие на высокий или умеренный уровень прямой антикоагулянтной активности.

Нумерация признаков на рисунке 3.3. соответствует нумерации признаков в таблице 3.5.

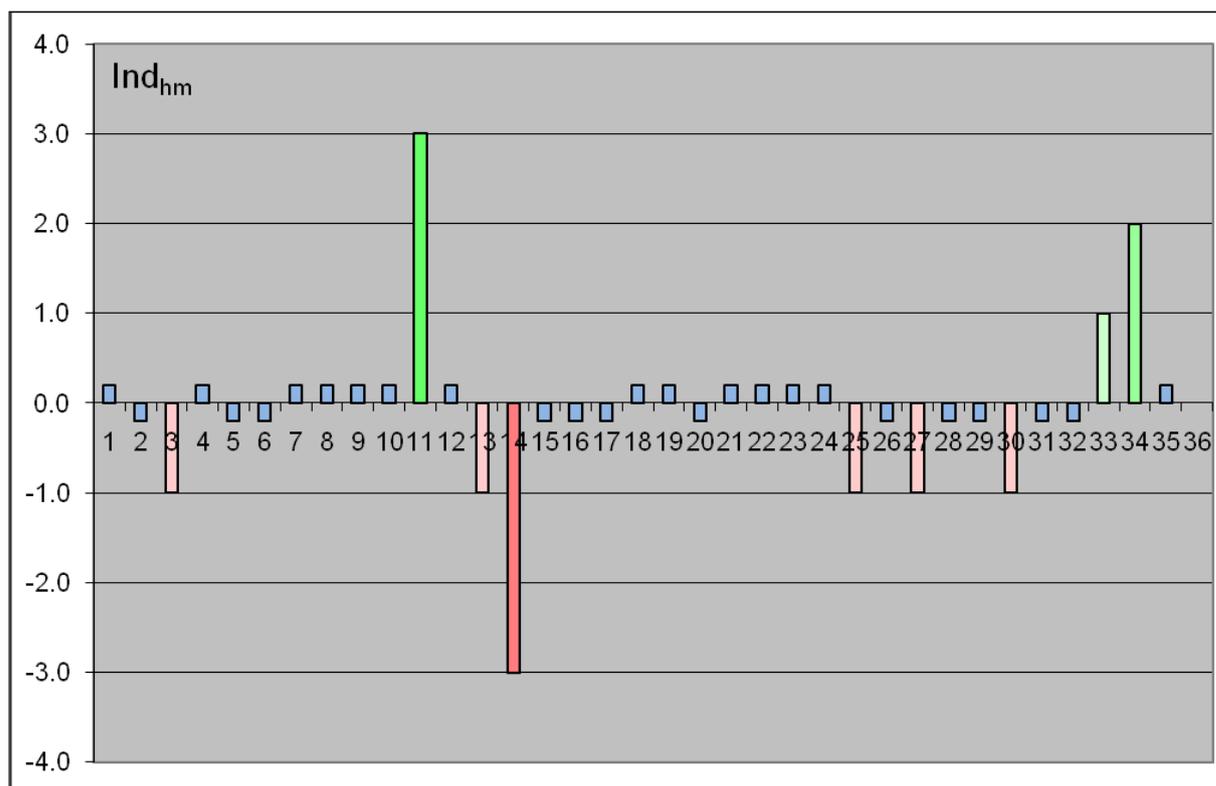


Рисунок 3.3 - Индексы влияния фрагментных признаков на отсутствие или наличие у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины высокой или умеренной прямой антикоагулянтной активности

Примечание: цифрами обозначены фрагментные признаки.

Интегральные показатели статистической значимости влияния фрагментных признаков на наличие выраженного уровня прямой антикоагулянтной активности приведены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Интегральные статистические оценки значимости влияния структурных фрагментов новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины на наличие выраженного уровня прямой антикоагулянтной активности

| № | Признак | Ind _h | Ind _{hm} | Ind |
|---|---------|------------------|-------------------|------|
| 1 | TrPyr | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 2 | TrTr | -1.0 | -0.2 | -0.6 |

| | | | | |
|----|------------------------|------|------|------|
| 3 | 12= | -3.0 | -1.0 | -2.0 |
| 4 | 23= | 2.0 | 0.2 | 1.1 |
| 5 | 34= | -1.0 | -0.2 | -0.6 |
| 6 | R1-2-C4H3S | 1.0 | -0.2 | 0.4 |
| 7 | R1=O | 2.0 | 0.2 | 1.1 |
| 8 | R1-OH | 3.0 | 0.2 | 1.6 |
| 9 | R1-CH2-2-C4H3S | 3.0 | 0.2 | 1.6 |
| 10 | R1-C6H4(3-NHCOCH2NH2) | -0.2 | 0.2 | 0.0 |
| 11 | R1-C6H5 | -1.0 | 3.0 | 1.0 |
| 12 | R1-C6H3(3,4-(OCH3)2) | -3.0 | 0.2 | -1.4 |
| 13 | R1-NH2 | -3.0 | -1.0 | -2.0 |
| 14 | R1-C6H2(2,3,4-(OCH3)3) | -2.0 | -3.0 | -2.5 |
| 15 | R1-C6H4(4-NHCOCH2NH2) | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 16 | R1-PHC6H5 | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 17 | R2-NO2 | 2.0 | -0.2 | 0.9 |
| 18 | R2-COOC2H5 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 19 | R2-OH | -0.2 | 0.2 | 0.0 |
| 20 | R2-CN | -4.0 | -0.2 | -2.1 |
| 21 | R3-2-C4H3O | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 22 | R3-2-(5-NO2-C4H2O) | 3.0 | 0.2 | 1.6 |
| 23 | R3-COOC2H5 | 3.0 | 0.2 | 1.6 |
| 24 | R3-SC2H5 | 3.0 | 0.2 | 1.6 |
| 25 | R3-SCH3 | -3.0 | -1.0 | -2.0 |
| 26 | R3-C6H5 | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 27 | R3-2-C4H3S | -2.0 | -1.0 | -1.5 |
| 28 | R3-3-C5H4N | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 29 | R3-SC3H7 | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 30 | R3-CH3 | -0.2 | -1.0 | -0.6 |

| | | | | |
|----|--|------|------|------|
| 31 | R3-SCH ₂ C ₆ H ₅ | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 32 | R3-SCH ₂ CCN | -0.2 | -0.2 | -0.2 |
| 33 | R4-2-C ₄ H ₃ S | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 34 | R4-CH ₃ | 3.0 | 2.0 | 2.5 |
| 35 | R4-C ₆ H ₅ | -3.0 | 0.2 | -1.4 |
| 36 | R4-C ₆ H ₄ (4-OCH ₃) | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

Примечание: Ind_h – индекс влияния признака на наличие или отсутствие высокой активности;
 nd_{hm} – индекс влияния признака на наличие или отсутствие высокой или умеренной активности;
 Ind – интегральный индекс влияния признака на наличие или отсутствие выраженной активности.

Диаграмма интегральных индексов влияния фрагментных признаков на отсутствие или наличие у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина выраженной прямой антикоагулянтной активности приведена на рисунке 3.4.

В таблице 3.6 и на рисунке 3.4. оттенками зеленого обозначены 11 признаков, положительно влияющих на наличие выраженного уровня прямой антикоагулянтной активности, а оттенками красного – 10 признаков, отрицательно влияющих на наличие выраженного уровня прямой антикоагулянтной активности.

Нумерация признаков на рисунке 3.4. соответствует нумерации признаков в таблице 3.6.

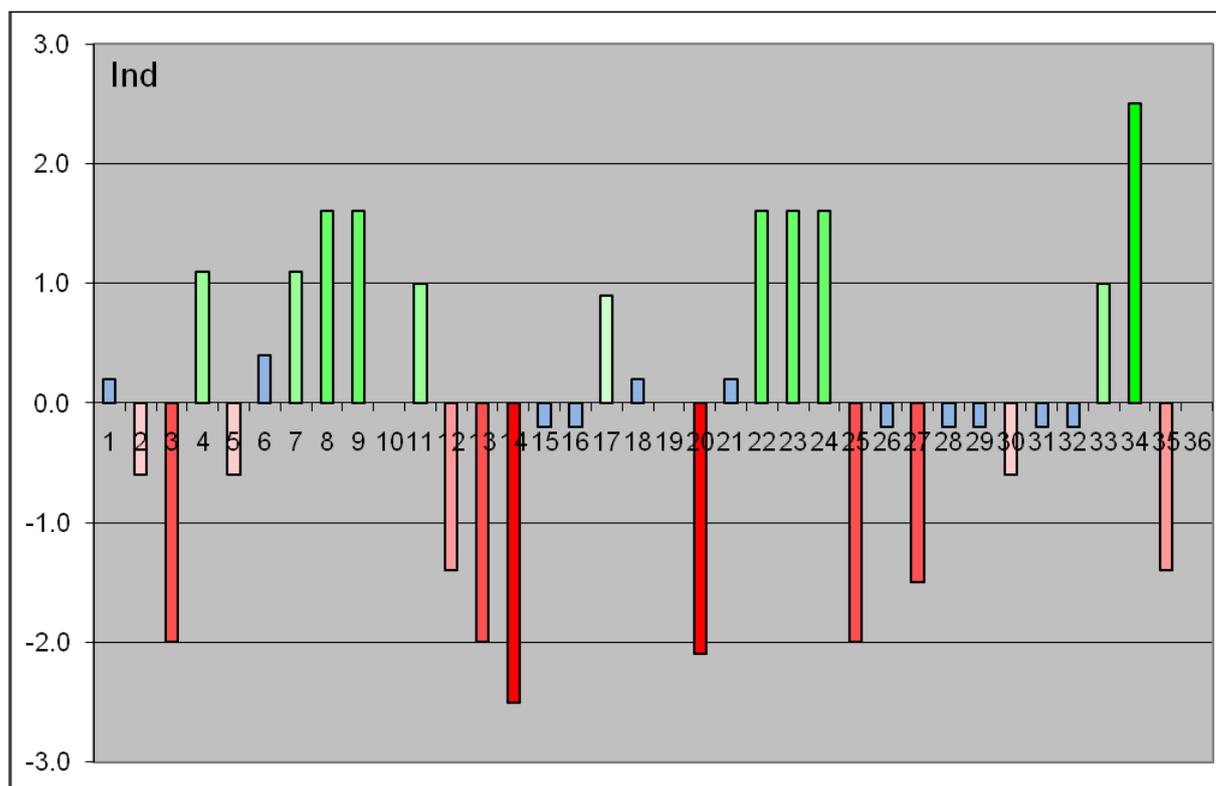


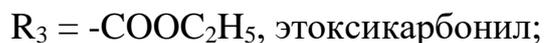
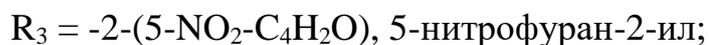
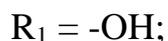
Рисунок 3.4 - Интегральные индексы влияния фрагментных признаков на отсутствие или наличие у новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина выраженной прямой антикоагулянтной активности

Примечание: цифрами обозначены фрагментные признаки.

В соответствии с полученными результатами, для исследуемых соединений тип скаффолда не оказывает существенного значения на уровень прямой антикоагулянтной активности. Однако, [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин, как базовая структура, проявляет тенденцию к снижению уровня активности. Поэтому предпочтительным кором в данном случае следует считать [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин.

Наиболее значимым положительно влияющим заместителем является $R_4 = -\text{CH}_3$, который характеризуется высоким значением индекса влияния $\text{Ind} = 2.5$. Среди достаточно активных веществ он присутствует в структуре соединений КС-G, НС-109, НС-11а, НС-71 и все они относятся к классу [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидинов.

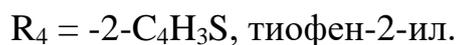
Весьма значимыми положительно влияющими заместителями с $\text{Ind} = 1.6$ являются:



Среди достаточно активных веществ эти заместители присутствует в структуре соединений Dr-497, HC-109, KC-G, KC-786 и все они, кроме Dr-497, относятся к классу [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидинов. Однако следует отметить, что производное [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины соединение Dr-497 содержит в своей структуре два положительно влияющих на активность заместителя.

Значимыми положительно влияющими признаками и заместителями являются также:

наличие в структуре [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина в положении 2,3 кратной связи;



Среди достаточно активных веществ эти заместители присутствует в структуре соединений HC-NAR-0273b, HC-82b, FV-174/Na, KC-G, KC-786, Dr-497, KC-984 и все они, кроме Dr-497, относятся к классу [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидинов.

Следует особо подчеркнуть, что все высокоактивные соединения содержат в своей структуре как минимум два заместителя, положительно влияющих на уровень прямой антикоагулянтной активности:



КС-G – четыре заместителя $R_1 = =O$, $R_2 = -NO_2$, $R_3 = -2-(5-NO_2-C_4H_2O)$ и $R_4 = -CH_3$;

КС-786 – три заместителя $R_1 = =O$, $R_2 = -COOC_2H_5$ и $R_3 = -COOC_2H_5$;

Dr-497 – три заместителя $R_1 = -OH$, $R_2 = -NO_2$ и $R_3 = -SC_2H_5$;

КС-984 – три заместителя $R_1 = =O$, $R_2 = -NO_2$ и $R_4 = -CH_3$;

НС-109 – три заместителя $R_1 = -CH_2-2-C_4H_3S$, $R_2 = -COOC_2H_5$ и $R_4 = -CH_3$.

Специально следует рассмотреть наиболее активное вещество НС-NAR-0273b, включающее в свою структуру два заместителя $-2-C_4H_3S$ (тиофен-2-ил). Указанный заместитель определен как положительно значимый, если он присутствует в положении R_4 . Наличие данной группы в положении R_1 также положительно влияет на уровень прямой антикоагулянтной активности, но это влияние достаточно слабое.

По-видимому, включение в структуру НС-NAR-0273b двух тиофен-2-ил групп порождает особые характеристики сопряженной пи-электронной системы данного соединения. Это, вероятно, способствует проявлению амфифильных свойств двух атомов серы, входящих в указанную молекулу, и может иметь определяющее значение при ее взаимодействии с биомолекулами, релевантными прямой антикоагулянтной активности.

По этим основаниям, вещество НС-NAR-0273b следует рассматривать как уникальное соединение, out-liner, с особыми свойствами.

Нитрогруппа в положении R_2 присутствует в структуре четырех высокоактивных соединений из семи. Весьма целесообразно было бы синтезировать аналог НС-NAR-0273b с заместителем $R_2 = -NO_2$, что могло бы увеличить активность найденного лидера.

Выше указано, что по результатам проведенного анализа заместитель $R_4 = -CH_3$ является наиболее значимым положительно влияющим на уровень прямой антикоагулянтной активности. Возможно, модификация структуры НС-NAR-0273b путем замены в положении R_4 тиофен-2-ила на метил позволит получить еще одно уникальное соединение с высокой прямой антикоагулянтной активностью.

3.3. Изучение наиболее активных соединений по влиянию на параметры коагулограммы (АЧТВ, тромбиновое время, протромбиновое время) *ex vivo*

В опытах на крысах в контроле показатель АЧТВ составил 38,3 секунды (таблица 3.7). При этом дабигатрана этексилат в дозе 12 мг/кг через 2 часа после однократного внутривенного введения достоверно удлинял данный показатель в 3,6 раза. Соединение HC-NAR-0273b в эквимолярной дабигатрану этексилату дозе 5,5 мг/кг через 2 часа после введения достоверно повышало данный показатель по отношению к контролю в 1,5 раза. Остальные соединения через различные временные промежутки не оказывали влияния на АЧТВ.

Таблица 3.7 - Влияние соединений HC-NAR-0273b, FV-174/Na, KC-G и KC-786 в эквимолярных дозах дабигатрану этексилату на показатели коагулограммы крыс при внутривенном введении ($M \pm m$) (n=5)

| № п/п | Тестируемый образец | Доза, мг/кг | Время забора крови после введения веществ, ч | Параметры коагулограммы | | |
|-------|-----------------------|-------------------|--|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| | | | | АЧТВ, с | Тромбиновое время, с | Протромбиновое время, с |
| 1. | Контроль | | | 38,3 ± 1,4 | 57,7 ± 1,8 | 28,1 ± 1,4 |
| 2. | Дабигатрана этексилат | 12,0 ¹ | 2 | 137,5 ± 2,2* | 603,9 ± 14,2* | 31,2 ± 1,3 |
| 3. | HC-NAR-0273b | 5,5 ² | 1 | 48,8 ± 1,3 | 255,5 ± 8,3 | 23,3 ± 1,2 |
| | | | 2 | 59,2 ± 8,3* | 325,3 ± 5,1* | 24,5 ± 1,1 |
| | | | 4 | 40,4 ± 1,4 | 76,2 ± 2,9 | 22,5 ± 0,7 |
| 4. | FV-174/Na | 5,8 ² | 1 | 27,9 ± 1,8 | 68,6 ± 2,6 | 29,3 ± 1,7 |
| | | | 2 | 28,5 ± 1,3 | 65,5 ± 4,5 | 28,4 ± 1,5 |
| | | | 4 | 27,0 ± 1,6 | 78,5 ± 2,0* | 31,2 ± 0,8 |
| 5. | KC-G | 5,8 ² | 1 | 46,2 ± 1,9 | 96,8 ± 4,6* | 30,1 ± 0,9 |
| | | | 2 | 53,9 ± 4,3 | 68,4 ± 9,9 | 32,9 ± 1,1 |
| | | | 4 | 40,6 ± 1,4 | 38,0 ± 4,5 | 30,9 ± 1,5 |
| 6. | | 5,4 ² | 1 | 31,3 ± 1,6 | 26,7 ± 2,2 | 22,5 ± 0,3 |

| | | | | | | |
|--|--------|--|---|------------|------------|------------|
| | КС-786 | | 2 | 33,6 ± 2,6 | 45,6 ± 2,5 | 29,5 ± 1,1 |
| | | | 4 | 37,1 ± 2,1 | 48,9 ± 3,4 | 28,1 ± 2,2 |

Примечание: ¹ - доза, полученная путем перерасчета с использованием межвидового коэффициента;

² - доза, эквивалентная дозе дабигатрана этексилата 12,0 мг/кг;

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

Тромбиновое время в крови контрольной группы крыс составило 57,7 минут. Препарат сравнения дабигатрана этексилат через 2 часа после внутрижелудочного введения увеличивал данный показатель в 10,5 раз. Под действием соединения НС-NAR-0273b через 1 час после его введения тромбиновое время удлинялось в 4,4 раза, а через два часа после введения в 5,6 раза. Вещество FV-174/Na достоверно удлиняло тромбиновое время в 1,4 раза только через 4 часа после введения. Соединение КС-G достоверно пролонгировало данный показатель в 1,7 раза только через 1 час после введения. Вещество КС-786 не оказывало влияния на исследуемый параметр.

Показатель протромбинового времени не менялся под действием исследуемых веществ и дабигатрана этексилата (таблица 3.7).

Таким образом, из четырех изученных соединений при однократном внутрижелудочном введении через различные интервалы времени выраженную антитромбиновую активность проявило соединение НС-NAR-0273b. Данное вещество при получении крысами через 2 часа удлиняло тромбиновое время в 5,6 раза относительно контрольных значений. Поэтому у соединения НС-NAR-0273b была в дальнейшем изучена величина острой токсичности (LD_{50}) и цитотоксичность для расчета условного терапевтического индекса.

3.4. Изучение цитотоксичности соединения НС-NAR-0273b

Оценивали цитотоксичность соединения НС-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата в концентрациях 10 нМ, 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ

и 100 мкМ на клетках линии НерG2 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) (рисунок 3.5.).

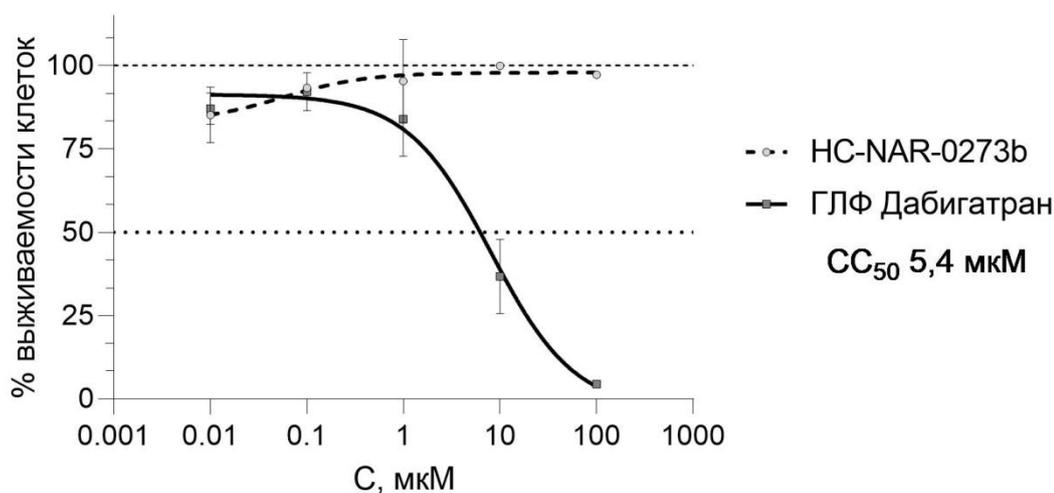


Рисунок 3.5 - Влияние соединения НС-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на метаболическую активность (жизнеспособность) клеток линии НерG2 при 48 часовой инкубации в МТТ-тесте

В результате исследования установлено, что для соединения НС-NAR-0273b в диапазоне исследованных концентраций 0,01-100 мкМ не характерно статистически значимого влияния на выживаемость клеток линии НерG2 при 48 часовой инкубации. Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии цитотоксических свойств у данного вещества в диапазоне концентраций 0,01-100 мкМ, уровень $CC_{50} \gg 100$ мкМ.

Для препарата сравнения дабигатрана этексилата было выявлено дозозависимое влияние на выживаемость клеток НерG2 в диапазоне концентраций 1-100 мкМ. В концентрациях 0,01 и 0,1 мкМ статистически значимого цитотоксического действия для препарата дабигатрана этексилата не выявлено.

Полученные данные для суспензии препарата дабигатрана этексилата позволили рассчитать концентрацию, вызывающую 50% цитотоксический эффект относительно интактных клеток (CC_{50}), которая составила $5,4 \pm 1,2$ мкМ ($R^2=0,92$).

Полученные данные соответствуют отсутствию изменений в морфологической картине клеток после 48 часовой инкубации в максимальной исследованной концентрации 100 мкМ с образцами вещества HC-NAR-0273b, но не гранулятом препарата дабигатрана этексилата (рисунок 3.6.). Целостность клеточной структуры при инкубации с последним не прослеживается.

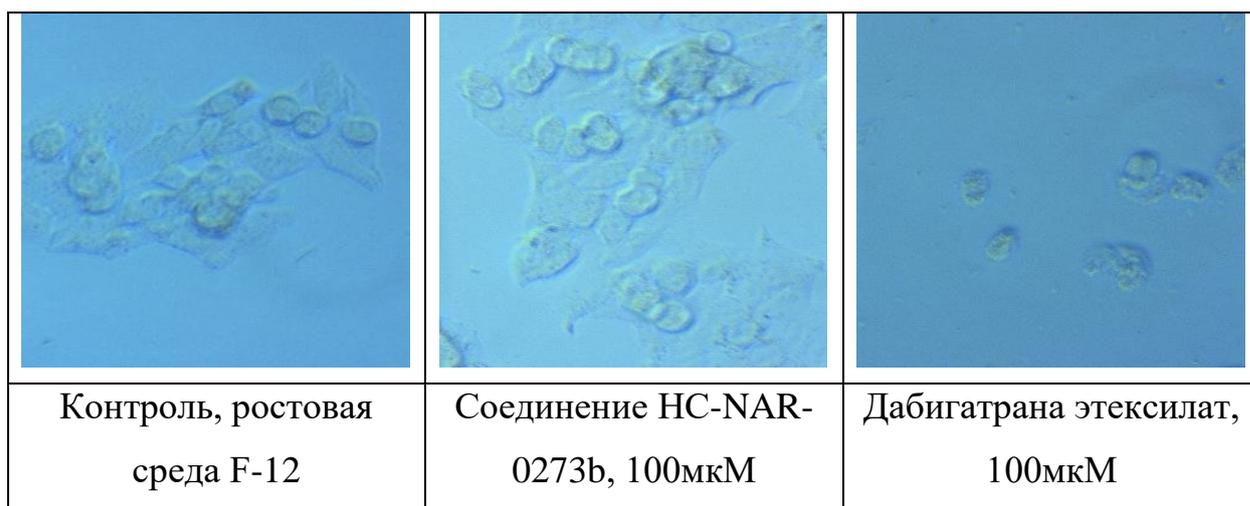


Рисунок 3.6 - Микрофотографии клеток линии НерG2 после 48 часовой инкубации с образцами соединения HC-NAR-0273b и препарата дабигатрана этексилата в концентрации 100 мкМ (фазовоконтрастная микроскопия, ×400)

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 \gg 80,0 (таблица 3.8).

Таблица 3.8 - Показатель УТИ соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата

| N п/п | Тестируемые образцы | EC ₅₀ , мкМ | Уровень CC ₅₀ , мкМ | УТИ |
|-------|-----------------------|------------------------|--------------------------------|-----|
| 1. | Дабигатрана этексилат | 1,4 | 5,4 | 3,8 |

| | | | | |
|----|--------------|------|-------|--------|
| 2. | НС-NAR-0273b | 1,25 | >>100 | >>80,0 |
|----|--------------|------|-------|--------|

Таким образом, по значению УТИ соединения НС-NAR-0273b превосходит более, чем в 21 раз препарат сравнения дабигатрана этексилат.

3.5. Изучение острой токсичности (LD₅₀) соединения НС-NAR-0273b

При изучении острой токсичности было показано, что при внутрижелудочном введении животным в увеличивающихся дозах - 5,5; 55; 550; 1200 и 2000 мг/кг соединение НС-NAR-0273b не приводило к их гибели. Состояние животных было в норме, животные реагировали на различные раздражители, изменений в поведенческом статусе не наблюдалось. За животными наблюдали в течение 2-х недель. Отдаленной гибели не наблюдалось.

В связи с отсутствием стопроцентной гибели крыс в опытных группах, LD₅₀ для внутрижелудочного введения соединения НС-NAR-0273b была определена условно > 2000 мг/кг (по максимальному количеству введенного вещества). Более высокую дозу исследуемого соединения ввести внутрижелудочно не удалось из-за недопустимости превышения объема жидкости. Патоморфологическое исследование крыс опытных групп не проводили ввиду отсутствия гибели животных. Таким образом, согласно результатам исследований соединения НС-NAR-0273b на мышах при внутрижелудочном введении с учетом классификации токсичности (Березовская И.В., 2003), изучаемое вещество, может быть отнесено к 4 классу малотоксичных соединений.

Заключение

В результате поиска соединений по влиянию на параметры коагулограммы было выявлено четыре наиболее активных веществ под шифром НС-NAR-0273b, FV-174/Na, КС-G и КС-786, удлиняющих показатель тромбинового времени. Все эти вещества являются представителями новых производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов, что указывает на перспективность данного класса для поиска соединений с антитромбиновой активностью. Далее был изучен данный вид

действия выявленных соединений в зависимости от концентрации с расчетом EC_{50} . В результате этого по EC_{50} антитромбиновой активности *in vitro* изученные соединения располагаются в следующем порядке: FV-174/Na > KC-G > KC-786 > HC-NAR-0273b > Дабигатрана этексилат.

На следующем этапе была выполнена оценка зависимости антикоагулянтного действия от химической структуры соединений (Приложение А, таблица А1). Была сформирована верифицированная база данных по структуре и прямой антикоагулянтной активности 42 новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина. 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. Найдены 11 структурных признаков, положительно влияющих на высокий 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]триазина ($23=$; R1 =O; R1 -OH; R1 -CH₂-2-C₄H₃S; R1 -C₆H₅; R2-NO₂; R3 -2-(5-NO₂-C₄H₂O); R3 -COOC₂H₅; R3 -SC₂H₅; R4 -2-C₄H₃S; R4 -CH₃).

При изучении данных соединений в опытах *ex vivo* антитромбиновое действие было выявлено только у соединения HC-NAR-0273b через 2 часа после внутрижелудочного введения крысам. Однако по способности пролонгировать тромбиновое время оно в 1,8 раза уступало дабигатрану этексилату. Поэтому соединение HC-NAR-0273b было выбрано для изучения величины острой токсичности (LD_{50}) и цитотоксичности с целью расчета условного терапевтического индекса. Согласно результатам исследований острой токсичности соединения HC-NAR-0273b на мышах при внутрижелудочном введении с учетом классификации токсичности по И.В. Березовской (2003), изучаемое вещество, может быть отнесено к 4 классу малотоксичных соединений. Далее было установлено, что для соединения HC-NAR-0273b не характерно наличие статистически значимого цитотоксического воздействия на клетки линии

НерG2 при 48-ми часовой инкубации в диапазоне концентраций 0,01-1000 мкМ, в отличие от препарата дабигатрана этексилата, для которого показано выраженное цитотоксическое влияние в концентрациях 1-100 мкМ. В связи с полученными данными о цитотоксичности были рассчитаны условные терапевтические индексы соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата. По данному показателю соединения НС-NAR-0273b активнее препарата сравнения в 21 раз.

Таким образом, в связи с наличием у нового производного 5,7-диметил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина под лабораторным шифром НС-NAR-0273b высокой антитромбиновой активности *in vitro* и *ex vivo* является обоснованным его дальнейшее углубленное исследование на различных моделях венозных тромбозов.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ НС-NAR-0273b НА ПРОЦЕССЫ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ

Основой патогенеза венозного тромбоза является венозный стаз, гиперкоагуляция и нарушение сосудистой стенки, которые могут быть обусловлены патологическими или физиологическими причинами. Венозные тромбозы формируются при изменении реологических свойств крови или как реакция на воспаление сосудистой стенки (Лагута П.С., 2015). Основу их составляет фибрин, заполненный эритроцитами, придающими тромбу красный оттенок, также в таких тромбах в небольших количествах присутствуют лейкоциты и тромбоциты. Красные тромбы хорошо отделяются от венозного эндотелия, поскольку поверхность их гладкая. Патологические процессы, связанные с тромбообразованием, чаще всего затрагивают крупные сосуды, например, бедренную вену, а также нижнюю полую вену. Чаще всего, тромб возникает именно в нижней полой вене, так как в силу действия фактора гравитации здесь создаются плохие условия для оттока крови. (Antonio A.Z., 2017). Чаще всего источником тромбоэмболов являются венозные тромбы, которые с током крови попадают в правые отделы сердца и, далее в систему легочной артерии, вызывая ее тромбоз (Otsui K., 2015). Поэтому изучение антитромботической активности потенциальных антикоагулянтных средств на различных моделях венозных тромбозов является актуальным.

4.1 Влияние соединения НС-NAR-0273b на выживаемость мышей в условиях тромбин-индуцированного тромбоза легких

Эксперименты выполнены на 30 белых беспородных мышках самцах согласно методу (Сонин Д.Л., 2014) Данные исследований антитромботической активности соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата введенных однократно внутривенно за 2 часа до моделирования тромбин-индуцированного тромбоза легких представлены в таблице 4.1.

Через 10-15 минут после внутривенного введения тромботического агента в дозе 40 ед. в группе контрольных животных из десяти погибали семь. Таким образом, выживаемость мышей составила 30%. При этом у животных наблюдалось учащенное поверхностное дыхание, судороги, парез задних конечностей.

Таблица 4.1 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата при внутрижелудочном введении на выживаемость белых беспородных мышей на модели тромбин-индуцированного тромбоза (40 ед.) ($M \pm m$) (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: * – ($p \leq 0,01$) 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.

Дабигатрана этексилат при однократном внутрижелудочном введении предотвращал гибель 60% животных по сравнению с контрольной группой. Соединение HC-NAR-0273b по антитромботической активности было сравнимо с дабигатраном этексилатом. При наблюдении за мышами, которые погибали на фоне введения препаратов, отмечалась их более выраженная активность по сравнению с погибающими животными группы контроля. Также менее выражены были двигательные нарушения и внешние проявления тромбоза развивались в течение 15-30 минут в отличие от группы контроля (10-15 минут). За группой

выживших животных наблюдали в течение 7 суток на предмет отдаленной гибели. Таким образом, по антитромботической активности на модели тромбин-индуцированного тромбоза соединение HC-NAR-0273b проявило одинаковое действие с препаратом сравнения дабигатраном этексилатом.

Морфологическое исследование легких

Микроскопическое исследование легочной ткани через 24 часа после введения тромботического агента показало, что у подопытных мышей развивались кровоизлияния очагового характера. Были обнаружены эритроцитарные сладжи, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла, отмечали расширение капилляров межальвеолярных перегородок, а также геморрагический экссудат в стенках и просветах альвеол. Преобладали альвеолы мелких и средних размеров, присутствовали явления дистелектаза (рисунок 4.1.).

При изучении парафиновых срезов легочной ткани, окрашенных по Carstairs, выявляли красные тромбы, состоявшие, преимущественно, из адгезированных эритроцитов и нитей фибрина как в просветах крупных, так и мелких сосудов (рисунок 4.2.А). Кроме того, отмечено наличие нитей фибрина и в просвете альвеол в составе экссудата (рисунок 4.2.Б).

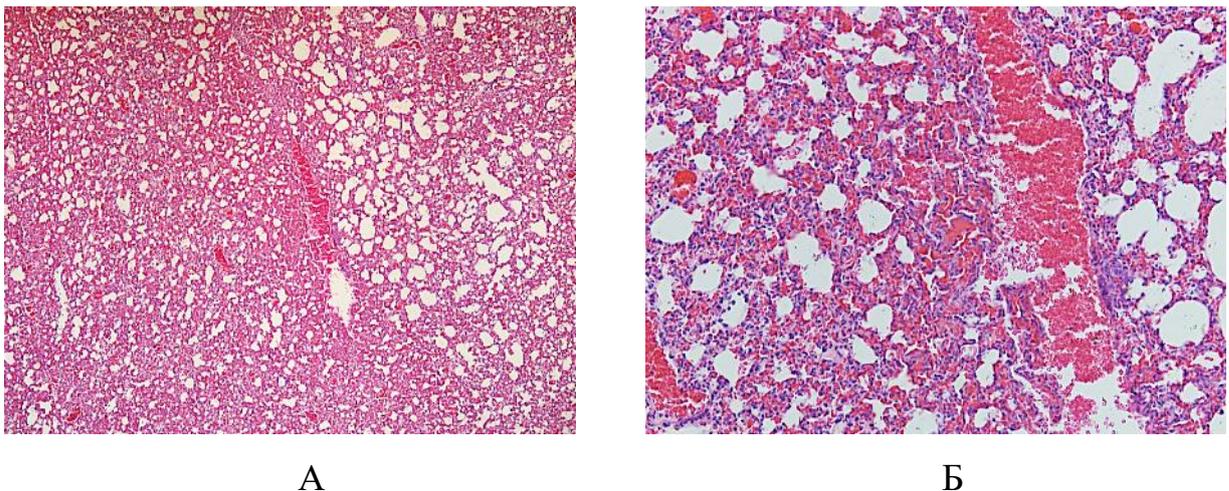


Рисунок 4.1 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей контрольной группы после введения тромботического агента. Окраска гематоксилин-эозином. Общее увеличение $\times 50$ (А); $\times 200$ (Б)

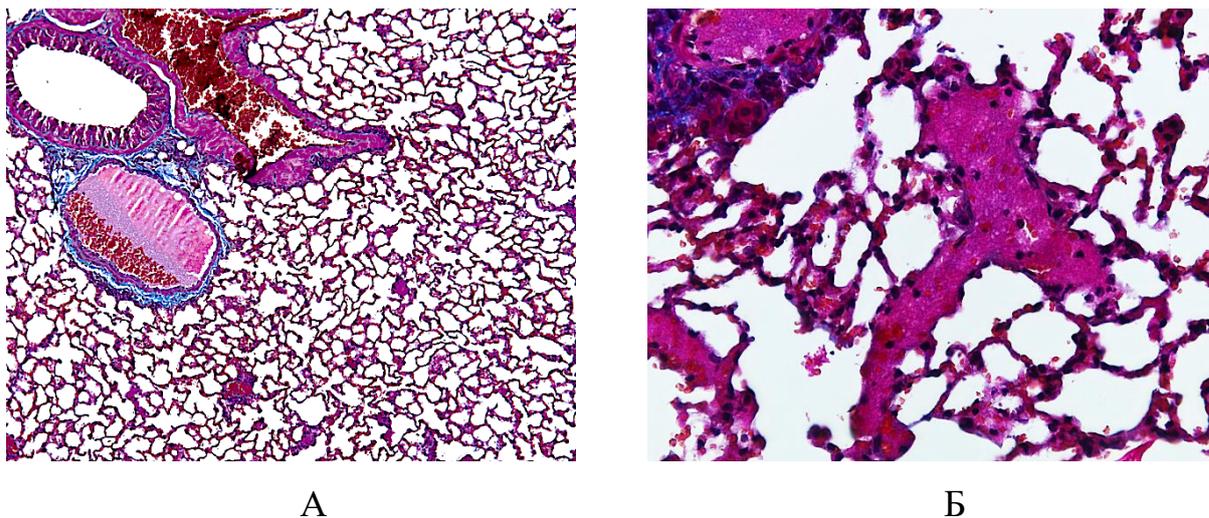
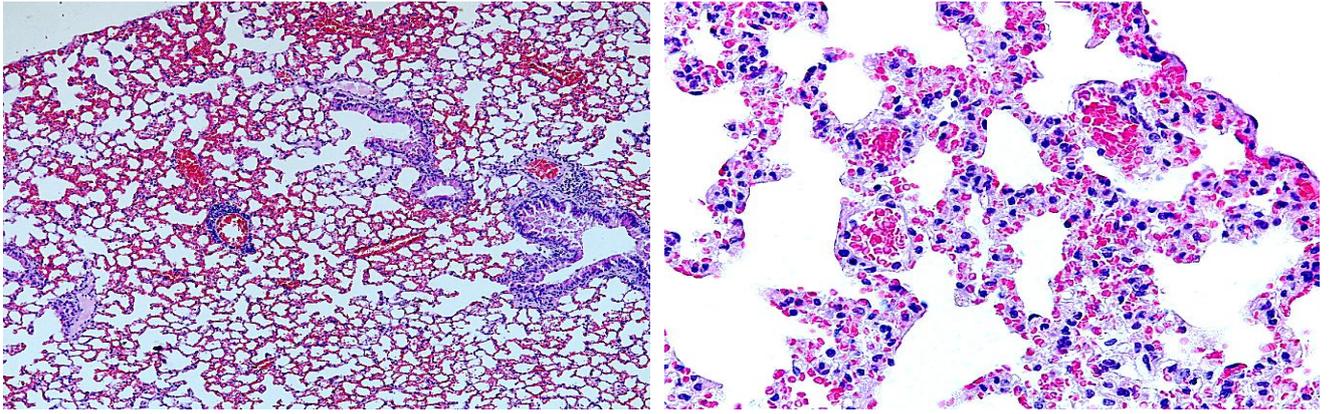


Рисунок 4.2 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей контрольной группы после введения тромботического агента. Трихромная окраска по Carstair.

Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б)

У животных, получавших на фоне тромбин-индуцированного тромбоза соединение HC-NAR-0273b, в легочной ткани отмечали явления эритроцитарных стазов и очаговые мелкие кровоизлияния. Кроме того, у 50% опытных мышей было обнаружено незначительное утолщение межальвеолярных перегородок, обусловленное диапедезом эритроцитов (рисунок 4.3.). Кроме того, отмечали выраженные признаки дистелектаза: эмфизематозно расширенные альвеолы чередовались со спавшими альвеолами.

Изучение препаратов легочной ткани, окрашенных по Carstair (Carstairs K.C., 1965) показало, что незначительный фибриновый компонент определялся только в просвете крупных сосудов (рисунок 4.4.А), а также в виде разрозненных тонких волокнистых структур в составе смешанного экссудата в просвете альвеол (рисунок 4.4.Б).

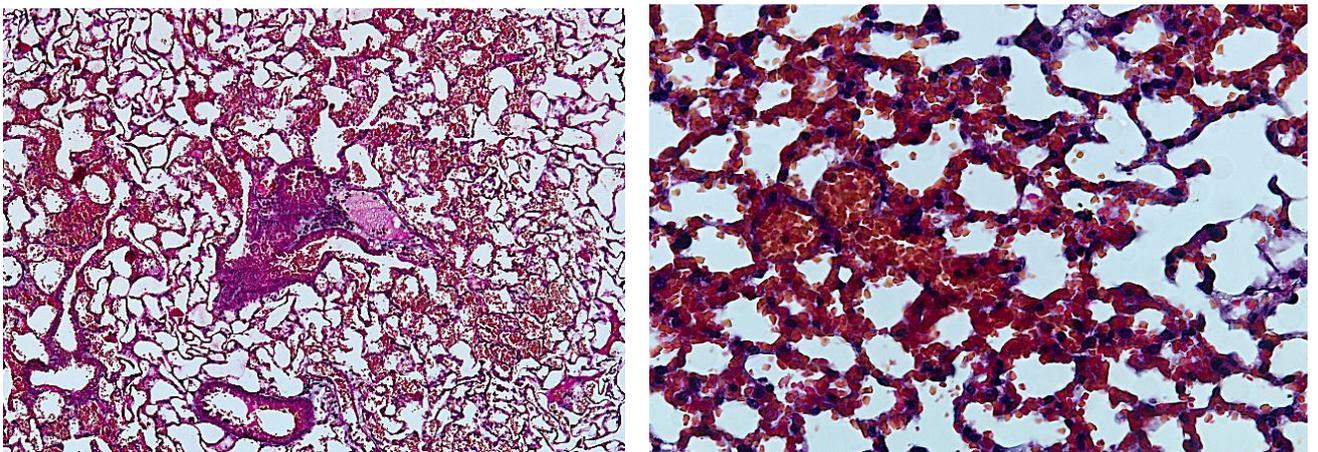


А

Б

Рисунок 4.3 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей, получавших соединение HC-NAR-0273b на модели тромбин-индуцированного тромбоза легких. Окраска гематоксилин-эозином.

Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б)



А

Б

Рисунок 4.4 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей, при внутрижелудочном введении соединения HC-NAR-0273b на модели тромбин-индуцированного тромбоза легких. Трихромная окраска по Carstairs.

Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 200$ (Б)

При микроскопическом исследовании ткани легких мышей, получавших дабигатрана этексилат, были выявлены кровоизлияния очагового характера, а также эритроцитозы в капиллярах межальвеолярных перегородок. При этом

толщина большей части межальвеолярных перегородок соответствовала толщине нормальных альвеол.

Кроме того, регистрировали адгезированные к сосудистой стенке сладжированные эритроциты (рисунок 4.5.).

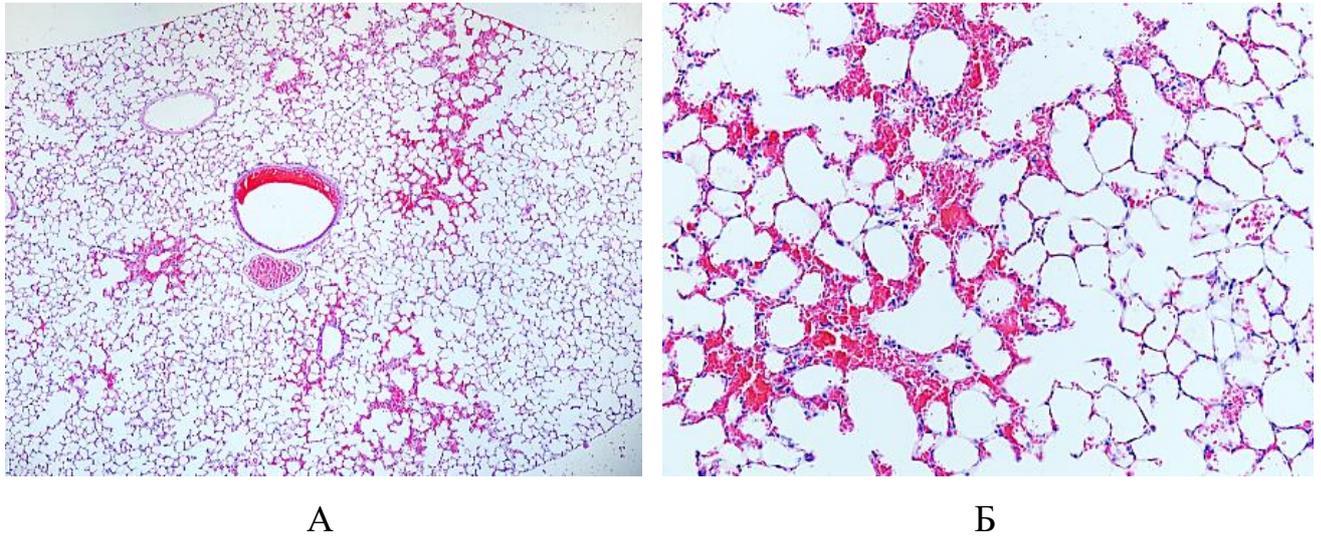


Рисунок 4.5 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей при однократном внутрижелудочном введении дабигатрана этексилата на модели тромбин-индуцированного тромбоза легких. Окраска гематоксилин-эозином. Общее увеличение $\times 50$ (А); $\times 200$ (Б)

Таким образом, согласно результатам морфологического исследования, препараты сравнения дабигатрана этексилата и соединения НС-NAR-0273b на модели тромбин-индуцированного тромбоза способствовали коррекции модельных нарушений реологических свойств крови, тормозя процесс образования внутрисосудистых фибриновых тромбов.

4.2 Антитромботическая активность соединения НС-NAR-0273b на модели тромбоза нижней полой вены

Исследования выполнены на 45 белых беспородных крысах самцах, массой 250,0-300,0 г. согласно методу (Henke P.K., 2007). Исследование антитромботической активности соединения НС-NAR-0273b и препарата

сравнения дабигатрана этексилата введенных однократно внутривенно в различных дозах за 2 часа до моделирования венозного тромбоза показало, что оно достоверно способно предотвращать венозный тромбоз нижней полой вены.

Группа ложно-оперированных животных была необходима для того, чтобы показать, что операционные манипуляции с животными не вызывают образование тромба в нижней полой вене. Это было подтверждено проведенными экспериментами (таблица 4.2). В группе контрольных животных после перевязки нижней полой вены через сутки наблюдалось образование тромбов, средняя масса которых составила 82,3 мг. В опытной группе животных, которым за два часа до перевязки данной вены вводился дабигатрана этексилат в дозе 12,0 мг/кг, средняя масса тромбов была достоверно ниже относительно значений, полученных в контроле на 98,7%. Тромбы, изъятые из вен животных, получивших соединение HC-NAR-0273b, масса составляла на 82,2% меньше контрольных значений, что было статистически значимо (таблица 4.2).

Для определения дозозависимой активности препарата сравнения дабигатрана этексилата и соединения HC-NAR-0273b, с целью расчета ED₅₀ они были дополнительно исследованы в дозах 3,0; 6,0 мг/кг и 1,25; 2,5; 11,0 мг/кг соответственно. Массы тромбов вен в группе животных, которым вводили препарат сравнения в дозах 3,0 и 6,0 мг/кг, были достоверно меньше контрольных значений на 86,6% и 30,5% соответственно (таблица 4.2). При этом ED₅₀ антитромботической активности дабигатрана этексилата составила 3,8 мг/кг.

В группе животных, получавших соединение HC-NAR-0273b в дозе 11 мг/кг, тромбы не обнаруживались. В дозе 2,5 мг/кг масса венозных тромбов достоверно снижалась на 74,2%. При дальнейшем уменьшении дозы исследуемого вещества еще в два раза до 1,25 мг/кг, средняя масса тромбов, изъятых из вен животных статистически значимо снижалась относительно группы контрольных животных на 39,3%. ED₅₀ антитромботической активности соединения HC-NAR-0273b составила 1,5 мг/кг.

Таблица 4.2 - Антитромботическая активность соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на модели тромбоза нижней полой вены при однократном внутривенном введении ($M \pm m$) (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 | НС-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, эквивалентная дозам, используемым для человека в клинической практике, с учетом межвидового коэффициента пересчета;

² – доза, эквимолярная дозе дабигатрана этексилата;

n – количество животных в группе.

Следовательно, по способности уменьшать массу тромба, полученного путем перевязки нижней полой вены и, в частности, по величине ED₅₀ соединение НС-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтную активность *in vitro* и *in vivo* превосходит известный антикоагулянт прямого действия дабигатрана этексилат в 2,5 раза.

4.3. Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b на модели тромбоза бедренной вены крыс, индуцированного аппликацией хлорида железа

При нанесении на бедренную вену крысы раствора хлорида железа возникает окислительный стресс, выброс медиаторов тромбообразования в результате чего из-за тромбоза возникает окклюзия сосуда (Marcinczyk N., 2017). Эксперименты были проведены на 35 крысах самцах, массой 230-280 г. согласно методу (Zhou J., 2009). При нанесении на бедренную вену крысы раствора хлорида железа через промежуток времени образуется тромб, показателем которого является остановка кровотока.

Время окклюзии бедренной вены в контрольной группе животных составило 9,3 мин. Влияние на данный параметр соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата, введенных однократно внутривенно за 2 часа до начала моделирования тромбоза в эквимолярных дозах представлено в таблице 4.3.

При этом, дабигатрана этексилат в дозе 3 мг/кг увеличивал время наступления окклюзии бедренной вены до 13,3 мин., что на 42,5% больше значений, полученных в контрольной группе животных. При увеличении дозы препарата сравнения до 6 и 12 мг/кг время окклюзии составило 18,3 и 29,7 минут соответственно. Таким образом, в дозе 6 мг/кг дабигатрана этексилат увеличивал время образования тромба на 96,2% относительно контрольной группы животных, а при повышении дозы до 12 мг/кг - на 219%. ED₅₀ антитромботической активности дабигатрана этексилата составила 3,5 мг/кг.

Соединение HC-NAR-0273b в дозе 1,25 мг/кг удлиняло время образования тромба до 12,8 минут, что на 37,1% больше контрольных показателей. В дозе 2,5 мг/кг тестируемое соединение удлиняло время наступления полной окклюзии бедренной вены до 18,8 минут, а в дозе 5,5 мг/кг – до 24,1 минуты. При этом время образования тромба при введении соединения HC-NAR-0273b в дозах 2,5 и 5,5

мг/кг пролонгировалось на 101,6 и 158,1% соответственно. ED₅₀ антитромботической активности тестируемого соединения составила 1,4 мг/кг.

Таблица 4.3 - Антитромботическая активность соединения НС-NAR-0273b и препарата сравнения при однократном внутривенном 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 | НС-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, эквивалентная дозам, используемым для человека в клинической практике, с учетом межвидового коэффициента пересчета;

² – доза, эквивалентная дозе дабигатрана этексилата;

n – количество животных в группе.

4.4. Антитромботическая активность соединения НС-NAR-0273b на модели тромбоза по Горюгу

Дополнительным лабораторным методом для определения антитромботических и тромболитических свойств тестируемых образцов является

метод GTT. В данном методе исследования проводилась оценка антитромботической активности соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата, где учитывалось время наступления окклюзии, а для оценки тромболитической активности - время лизиса, в тест-системе Горога согласно методике Otsui K. и Yamamoto J. (Otsui K., 2015; Yamamoto J., 2003). В контрольной группе животных среднее время окклюзии составило 93,3 с. Препарат дабигатрана этексилат при однократном внутрижелудочном введении достоверно увеличивал время окклюзии в 2,7 раза относительно контрольных значений (таблица 4.4). Соединение HC-NAR-0273b статистически значимо пролонгировало данный параметр относительно контрольных значений в 3 раза. Однако исследуемое соединение и препарат сравнения не влияют на время лизиса сгустка крови, следовательно, не проявляют фибринолитической активности (таблица 4.4).

Таблица 4.4 - Антитромботическая активность соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на модели тромбоза GTT (по Горогу) при однократном внутрижелудочном введении крысам-самцам ($M \pm m$) ($n=5$)

| № п/п | Тестируемый образец | Доза, мг/кг | ОТ, с | ЛТ, с |
|-------|-----------------------|-------------------|---------------|--------------|
| 1. | Контроль | | 93,3 ± 6,0 | 821,7 ± 27,2 |
| 2. | Дабигатрана этексилат | 12,0 ¹ | 253,2 ± 16,9* | 807,0 ± 30,0 |
| 3. | HC-NAR-0273b | 5,5 ² | 284,9 ± 57,9* | 798,7 ± 23,7 |

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

¹ - доза, эквивалентная дозам, используемым для человека в клинической практике, с учетом межвидового коэффициента пересчета;

² – доза, эквимольная дозе дабигатрана этексилата;

ОТ – время окклюзии тест-системы;

ЛТ – время лизиса сгустка;

n – количество животных в группе.

Заключение

Венозный тромбоз и связанная с ним тромбоэмболия лёгочных артерий является довольно частым осложнением. (Сонин Д. Л., 2014). Поэтому изучение антитромботической активности потенциального антикоагулянтного соединения HC-NAR-0273b на моделях венозных тромбозов является актуальным.

Тромбин-индуцированная тромбоэмболия у мышей является моделью острого и массивного внутрисосудистого отложения фибрина, преимущественно в легочные артерии, что приводит к гибели животных в течение нескольких минут. Соединение HC-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтную активность *in vitro* и *in vivo* при однократном 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. Полученные данные подтверждаются морфологическими исследованиями.

Наиболее тяжелые последствия наблюдаются при тромбозах крупных вен. Очень часто в экспериментальной фармакологии в качестве модели венозного тромбоза используется модель локальной гиперкоагуляции, которая достигается путем перевязки нижней полой вены (Zhou J., 2009). 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.

Другим способом моделирования венозного тромбоза является повреждение сосудистой стенки, что ведет к снижению ее тромборезистентности. С этой целью наиболее часто используют метод поверхностной аппликации 50% раствора хлорида железа на поверхность сосуда, что ведет к развитию реакции окислительного стресса, дисфункции эндотелия и процессам тромбообразования (Rettger C., 2005). В результате проведенных исследований на модели тромбоза бедренной вены, индуцированного 50% раствором FeCl₃ соединение HC-NAR-

0273b по показателю ED₅₀ антитромботической активности, превосходило препарат сравнения в 2,5 раза.

Глобальный тест на тромбоз — это комплексный тест на реактивность тромбоцитов, коагуляцию, а именно на генерацию тромбина и спонтанный тромболизис с использованием образцы крови без стабилизаторов (Yamamoto J., 2014). Соединение HC-NAR-0273b при однократном внутривенном введении при повышенной турбулентности тока крови вызывало увеличение времени образования тромба в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой, не вызывая лизис сгустка. По антитромботической активности на данной модели исследуемое соединение было сравнимо с дабигатраном этексилатом.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА АНТИКОАГУЛЯНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ HC-NAR-0273b

Существуют различные направления для исследований механизма антикоагулянтной активности веществ (Баркаган З. С., 2008). Первое направление – это исследование влияния на параметры коагулограммы. Так, определение тромбинового времени является базисным скрининговым тестом, который характеризует конечный этап процесса свертывания. Также используют методы хромогенно-фотометрического определение активности по расщеплению различных хромогенных субстратов. Данные исследования используются для выполнения скрининговых тестов, а также определения активности отдельных факторов свертывания и их ингибиторов. Хромогенные методы характеризуются высокой чувствительностью и имеют высокую воспроизводимость и специфичность. Другими методами являются иммуноферментный анализ, радиоиммуноанализ, которые используются для количественного определения. В результате поиска новых соединений, проявляющих антикоагулянтную активность, в ряду новых производных триазолопиримидинов было выявлено активное вещество HC-NAR-0273b, проявляющее выраженную антитромбиновую активность в опытах *in vitro* и *in vivo*. Исходя из этого, возникла необходимость подтверждения данного механизма действия, с использованием различных методов исследования.

5.1. Влияние соединения HC-NAR-0273b на способность связывать фактор Па на хромогенном субстрате S-2238 *in vivo*

Синтетические полипептидные хромогенные субстраты представляют собой высокоспецифические реагенты для оценки активности и количества компонентов гемокоагуляции фотометрическим методом. S – 2238 является хромогенным субстратом для тромбина. Способность связывать фактор Па (тромбин) на хромогенном субстрате соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилат при внутрижелудочном введении животным представлена в

таблице 5.1. и рисунке 5.1. При исследовании влияния препарата сравнения дабигатрана этексилата на связывание тромбина в дозе 3,0 мг/кг уровень свечения составил 0,46, что указывает на отсутствие эффекта. При увеличении дозы препарата сравнения до 6,0 мг/кг уровень свечения соответствовал свечению плазмы-калибратора S2, что аналогично 25% связывания тромбина. В дозе 12 мг/кг происходило связывания с тромбином на 64,5%. Согласно полученным данным показатель ED₅₀ дабигатрана этексилата составил 8,1 мг/кг (таблица 5.1).

Соединение HC-NAR-0273b в дозе 2,5 мг/кг не связывало Па фактор, так как уровень свечения на хромогенном субстрате соответствовал уровню свечения плазмы-калибратора S1 – 0,36. При увеличении дозы исследуемого соединения до 5,5 мг/кг уровень свечения уменьшался до 0,31, при этом связывание тромбина веществом составило 44,7%. При введении соединения HC-NAR-0273b в дозе 11,0 мг/кг уровень свечения составил 0,25, что соответствовало взаимодействию данного вещества с Па фактором на 67%. При этом ED₅₀ соединения HC-NAR-0273b составила 9,9 мг/кг (таблица 5.1).

Соединение HC-NAR-0273b обладает способностью связывать Па фактор на хромогенном субстрате S-2238, что подтверждает наличие у него антитромбиновой активности.

Таблица 5.1 - ED₅₀ соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата по способности связывать фактор Па на хромогенном субстрате S-2238 в тесте *in vivo* (n=5)

| № п/п | Тестируемый образец | Доза мг/кг | Уровень свечения | % связывания с фактором Па | ED ₅₀ , мг/кг |
|----------|---------------------|---------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1. | Буферный раствор | | 0,06±0,0 | | |
| 2. | S1 | | 0,36±0,01 | 0 | |
| 3. | S2 | | 0,33±0,01 | 25 | |

| | | | | | |
|----|--|------|-----------------|------|-----|
| 4. | S3 | | $0,30 \pm 0,01$ | 50 | |
| 5. | S4 | | $0,28 \pm 0,01$ | 75 | |
| 6. | S5 | | $0,23 \pm 0,01$ | 100 | |
| 7. | Бедная тромбоцитами плазма + НС-NAR-0273b | 2,5 | $0,36 \pm 0,01$ | 0 | 9,9 |
| | | 5,5 | $0,31 \pm 0,01$ | 44,7 | |
| | | 11,0 | $0,25 \pm 0,03$ | 67 | |
| 8. | Бедная тромбоцитами плазма + дабигатрана этексилат | 3,0 | $0,46 \pm 0,03$ | 0 | 8,1 |
| | | 6,0 | $0,33 \pm 0,02$ | 25 | |
| | | 12,0 | $0,28 \pm 0,01$ | 64,5 | |

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

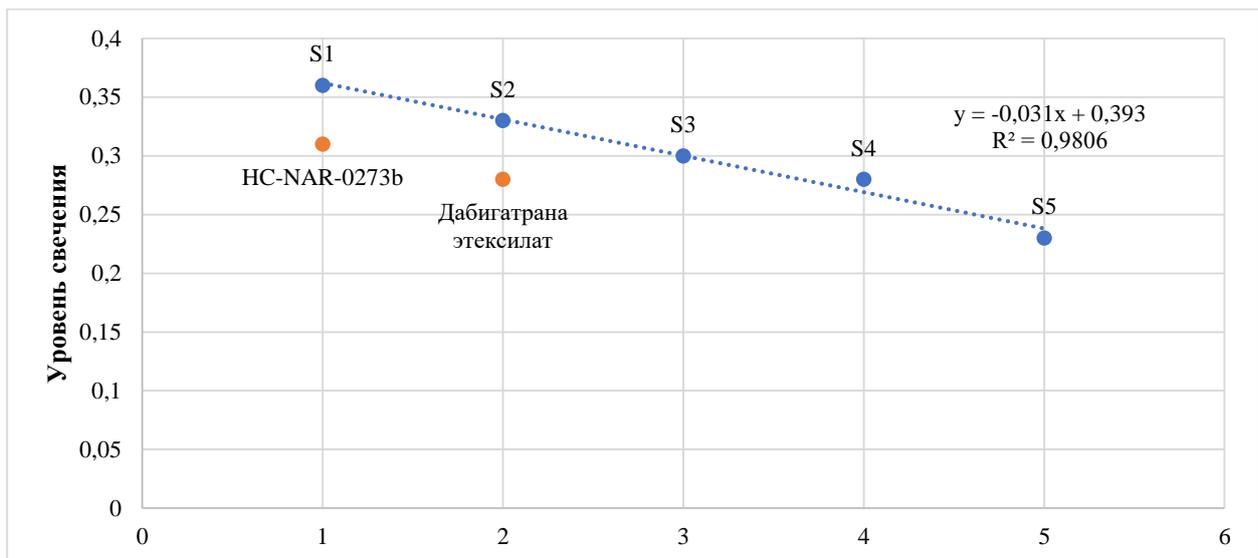


Рисунок 5.1 - Связывание тромбина соединением НС-NAR-0273b и препаратом сравнения дабигатраном этексилатом на хромогенном субстрате S-2238 в тесте *in vivo*

5.2. Изучение способности соединения НС-NAR-0273b связывать Па фактор методом ИФА

Влияние соединения НС-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на уровень связанного тромбина *in vivo* при однократном внутрижелудочном введении представлено на рисунке 5.2.

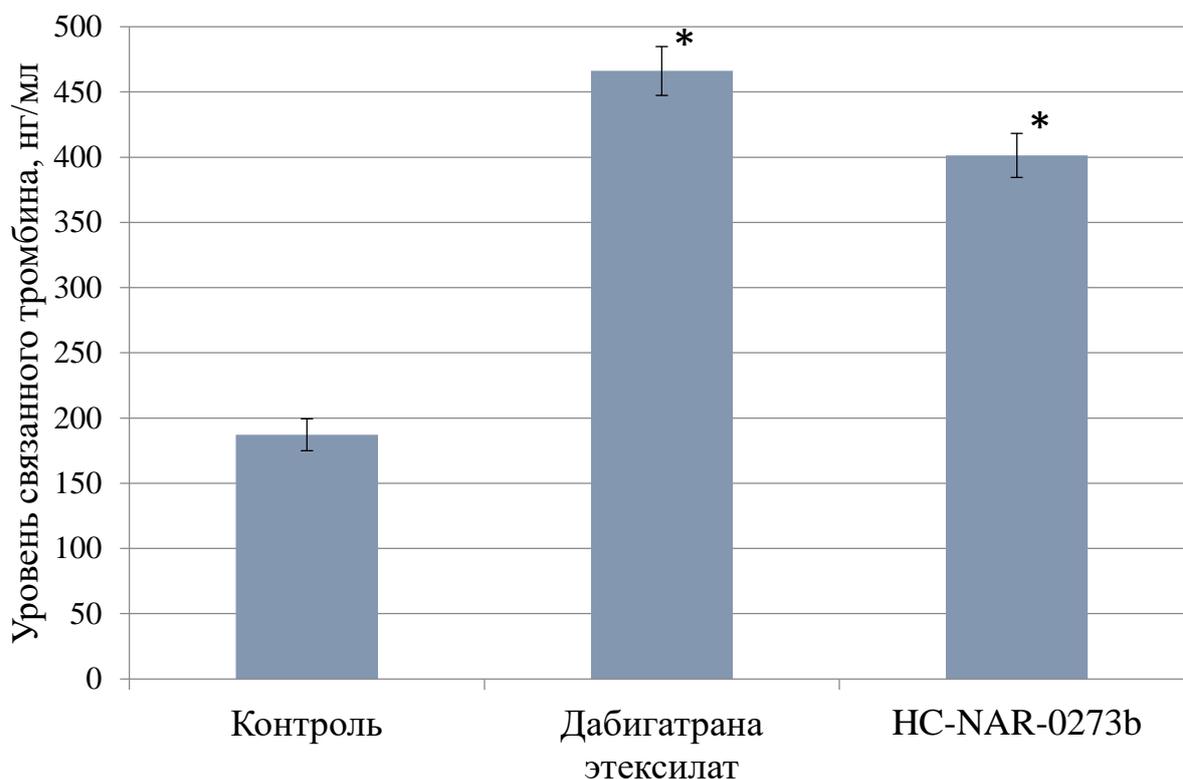


Рисунок 5.2 - Влияние соединения НС-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата в эквимольных дозах на уровень связанного тромбина методом иммуноферментного анализа *in vivo*

При изучении контрольных образцов, уровень связывания тромбина составил 187,2 нг/мл. При внутрижелудочном введении препарата сравнения дабигатрана в дозе 12 мг/кг уровень связывания с фактором Па составил 466,2 нг/мл. При этом у соединения НС-NAR-0273b в дозе 5,5 мг/кг значение связывания с тромбином составило 401,4 нг/мл. Таким образом, в результате проведенных исследований на предмет количественного связывания тромбина было показано,

что соединение HC-NAR-0273b проявляет способность статистически значимо связывать данный фактор, незначительно уступая препарату сравнения.

5.3. Влияние соединения HC-NAR-0273b на разведенное тромбиновое время с помощью Hemoclot kit теста

Анализ ингибиторов тромбина с помощью Hemoclot теста используют для определения антикоагулянтной активности дабигатрана в плазме с использованием простых и широкодоступных хронометрических устройств для коагуляции. Использование этого экспресс-теста, обеспечивает точные и последовательные результаты при оценке антикоагулянтной активности дабигатрана. Так как соединение HC-NAR-0273b, также, как и препарат сравнения дабигатран проявляет антитромбиновую активность оно было исследовано на способность сохранения антикоагулянтной активности при разведении плазмы животных, получавших данное вещество. Результаты исследования представлены в таблице 5.2.

При изучении контрольных образцов плазм крыс, разведенных в 8 и 20 раз при помощи пульной плазмы показатель тромбинового времени, практически не изменялся и составил 23,9 и 24,5 сек, соответственно. При внутрижелудочном введении соединения HC-NAR-0273b в дозе 5,5 мг/кг происходило статистически значимое удлинение тромбинового времени относительно контрольных значений в плазме, разведенной в 8 раз на 30,5% и разведенной в 20 раз на 19,2% соответственно. Препарат сравнения дабигатрана этексилат при однократном внутрижелудочном введении в дозе 12 мг/кг также пролонгировал показатель тромбинового времени в плазме, разведенной в 8 раз на 62,3% и разведенной в 20 раз на 49,4%. При разведении плазмы крыс, получавших соединение HC-NAR-0273b, сохранялась его антикоагулянтная активность.

Таблица 5.2 - Исследование влияния соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на показатель разведенного тромбинового времени в тесте Hemoclot

| № 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 ($p < 0,05$).

5.4. Влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры тромбоэластограммы

По влиянию на параметры тромбоэластограммы дабигатрана этексилат через два часа после внутрижелудочного введения статистически значимо увеличивал показатель R в 3,5 раза, что свидетельствует об увеличении времени образования первых нитей фибрина. Также препарат сравнения достоверно удлинял время от начала образования первых нитей фибрина в 6,7 раза. Кроме того, под его влиянием в 4,3 раза уменьшался угол α , т.е. снижалась скорость образования сгустка. Максимальная амплитуда, характеризующая функциональную активность тромбоцитов и максимальную прочность сгустков, снижалась в 1,7 раза (таблица 5.3).

Соединение HC-NAR-0273b достоверно, относительно контроля изменяло параметры тромбоэластограммы. Так, данное вещество через 2 часа после введения удлиняло показатель R в 1,4 раза, параметр K – в 2,5 раза и уменьшало показатель

угла α в 1,6 раза. При этом соединение HC-NAR-0273b не оказывало влияния на параметр МА (таблица 5.3, рисунок 5.3.).

Таблица 5.3 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на показатели тромбоэластограммы (ТЭГ) крыс при внутрижелудочном введении ($M \pm m$) (n=5)

| № п/п | Тестируемый образец | Доза, мг/кг | Параметры ТЭГ | | | |
|----------|-----------------------|----------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | | | R, мин | K, мин | Угол α , град. | МА, отн. ед. |
| 1. | Контроль | | $6,4 \pm 0,9$ | $2,5 \pm 0,1$ | $61,5 \pm 2,3$ | $65,5 \pm 1,2$ |
| 2. | Дабигатрана этексилат | $12,0^1$ | $22,8 \pm 3,3^*$ | $16,8 \pm 2,8^*$ | $14,1 \pm 3,1^*$ | $37,1 \pm 7,9^*$ |
| 3. | HC-NAR-0273b | $5,5^2$ | $8,7 \pm 0,2^*$ | $6,2 \pm 0,4^*$ | $38,8 \pm 3,7^*$ | $58,8 \pm 3,0$ |

Примечание: ¹ - доза, полученная путем перерасчета с использованием межвидового коэффициента;

² - доза, эквивалентная дозе дабигатрана этексилата 12,0 мг/кг;

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

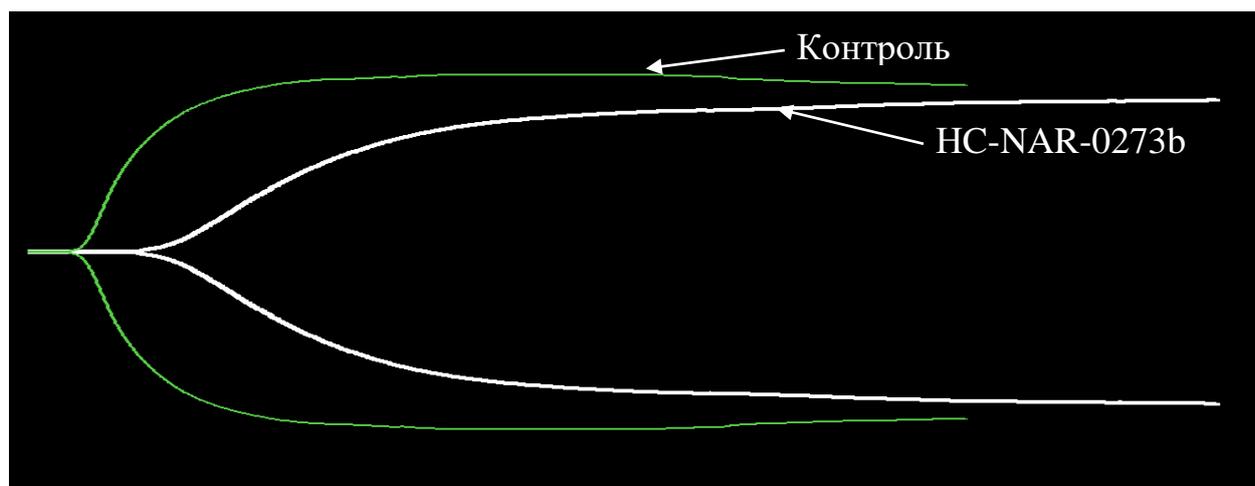


Рисунок 5.3 - Влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры коагулограммы крови крыс

Таким образом, в результате выполненных исследований соединение НС-NAR-0273b через два часа после однократного внутривенного введения изменяло параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции, однако уступая при этом дабигатрану этексилату.

5.5. Действие соединения НС-NAR-0273b на агрегацию тромбоцитов, вызванную тромбином

В контрольных образцах цельной крови кроликов, измеренной импедансным методом амплитуда агрегации тромбоцитов, индуцированных тромбином, составила 11,2 Ом (рисунок 5.4.). Препарат сравнения дабигатрана этексилат в концентрации 100 мкМ блокировал тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 100%. При этом соединение НС-NAR-0273b снижало уровень амплитуды агрегации тромбоцитов до 4 Ом, что соответствует блокированию тромбин-индуцированной агрегации на 64,3%.

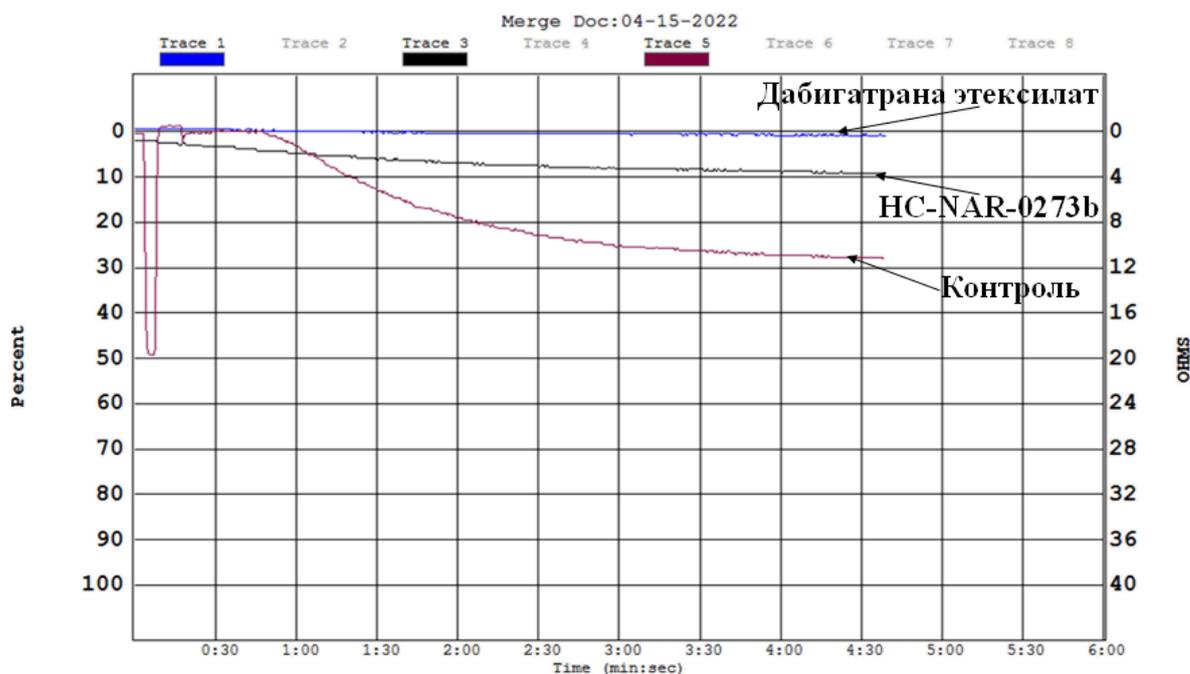


Рисунок 5.4 - Влияние соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата в концентрации 100 мкМ на тромбин-индуцированную агрегацию цельной крови кроликов

Заключение

В результате изучения механизма антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b была доказана его способность связывать тромбин методом количественного определения и на хромогенном субстрате S-2238 в тестах *in vivo*. Однако при этом данное соединение незначительно уступало препарату сравнения дабигатрану этексилату.

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 внутрижелудочного введения изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции, 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 тромбин.

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

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ NS-NAR-0273b В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЦИТОКИНЕМИИ

Основу защиты организма от воздействий внешней и внутренней среды составляют воспаление и свертывание крови, так называемая иммунокоагуляция, которая является частью врожденного иммунитета и может служить первой линией защиты от инфекции (Насонов Е.Л., 2020). Однако неконтролируемое воспаление связано с выраженной реакцией иммунной системы, что приводит к гиперкоагуляционному статусу, который проявляется развитием макро- и микросоудистых тромбозов венозного и артериального русла (Wong, J.P., 2017; Li H., 2020).

Необходимо отметить, что одним из схожих с цитокиновым штормом патологических состояний является сепсис, патофизиология которого сложна и сопровождается внутрисосудистой коагуляцией, вызванной иммунным ответом организма хозяина. Доклиническими и клиническими исследованиями подтверждена патологическая роль инициатора внешнего пути - тканевого фактора в возникновении эндотоксемии (Hottz E. D., 2020). В экспериментах было показано, что экзогенный липополисахарид (ЛПС) через толл-подобный рецептор 4 (TLR4 - Toll-like receptor) вызывает высвобождение и экспрессию тканевого фактора на поверхности клеток и приводит к септической смерти животных от тромботических осложнений (Zhang, H., 2020). Таким образом, взаимодействие между нарастающей иммунной дисфункцией и аномальной свертываемостью крови является основным событием, благоприятствующим осложнениям сепсиса и полиорганной недостаточности у людей, и должно быть стратегически направлено в терапевтических целях (Behrens E.M., 2017). Следовательно, использование антикоагулянтов при вирусных и бактериальных инфекциях позволяет предотвратить тромбообразование.

В связи с этим было изучено антикоагулянтное действие соединения NS-NAR-0273b в условиях гиперциитокинемии, вызванной ЛПС.

6.1. Влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры коагулограммы в условиях гиперцитокинемии *in vitro* и *in vivo*

Показатель тромбинового времени в контрольных образцах крови, обработанной липополисахаридом составил 9,3 секунд, что достоверно ниже этих данных в группе интактной крови (см. главу 3). Препарат сравнения дабигатрана этексилат в концентрации 10 мкМ достоверно удлинял данный показатель до 27,2 секунд, что соответствует достоверному увеличению его относительно контроля на 292,0% (таблица 6.1). При дальнейшем уменьшении концентрации до 5 и 1 мкМ тромбиновое время также статистически значимо пролонгировалось на 208,6 и 51,7% соответственно. В концентрации 0,1 мкМ дабигатрана этексилат не оказывал влияние на данный параметр. EC₅₀ антитромбиновой активности препарата сравнения в условиях гиперцитокинемии составило 0,76 мкМ (таблица 6.1).

Таблица 6.1 - EC₅₀ соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата по влиянию на тромбиновое время крови кроликов, в условиях гиперцитокинемии (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.

Соединение HC-NAR-0273b в концентрации 10 мкМ достоверно удлиняло показатель тромбинового времени до 33 секунд, что относительно контроля составило на 354,1% больше. При снижении концентрации вещества до 5 и 1 мкМ

тромбиновое время статистически значимо увеличивалось относительно контрольных значений на 194,1 и 46,5% соответственно. В концентрации 0,1 мкМ соединение НС-NAR-0273b не влияло на данный параметр. EC_{50} антитромбиновой активности в условиях гиперцитокинемии при этом было равно 0,78 мкМ (таблица 6.1).

Таким образом, в условиях гиперцитокинемии по EC_{50} антитромбиновой активности соединение НС-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 в условиях гиперцитокинемии соединение НС-NAR-0273b превосходит дабигатрана этексилат в 18 раз (таблица 6.2).

Таблица 6.2 - Показатель УТИ соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата в условиях гиперцитокинемии

| № п/п | Тестируемые образцы | EC_{50} , мкМ | Уровень CC_{50} , мкМ | УТИ |
|-------|-----------------------|-----------------|-------------------------|---------|
| 1. | Дабигатрана этексилат | 0,76 | 5,4 | 7,1 |
| 2. | Н | 0,78 | >>100 | >>128,2 |

Данные о способности тестируемых образцов пролонгировать тромбиновое время в условиях гиперцитокинемии *ex vivo* представлены в таблице 6.3.

Показатели коагулограммы в контрольных образцах крови достоверно изменялись в условиях системной воспалительной реакции. АЧТВ снижалось в 2,1 раза по отношению к контролю интактных животных, а также уменьшалось тромбиновое время в 1,3 раза, что свидетельствует об активации коагуляционного гемостаза у крыс.

Препарат сравнения достоверно уменьшал АЧТВ относительно контрольной крови крыс, которым вводили ЛПС в 2,2 раза. При этом тромбиновое время

статистически значимо удлинялось в 12,8 раза. Соединение HC-NAR-0273b также достоверно пролонгировало АЧТВ в 1,6 раза. При этом тромбиновое время крови крыс увеличивалось в 14,5 раза. Однако ни исследуемое соединение, ни дабигатрана этексилат не оказывали влияния на протромбиновое время. Таким образом, в условиях системной воспалительной реакции Соединение HC-NAR-0273b проявляет более выраженное антитромбиновое действие, чем в ее отсутствие, что свидетельствует о возможном действии данного вещества на воспалительные компоненты крови (рисунок 6.1., 6.2.).

Таблица 6.3 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата в эквимоллярных дозах на показатели коагулограммы крыс через 2 часа при однократном внутривенном введении в условиях гиперцитокинемии ($M \pm m$) (n=5)

| № п/п | Тестируемый образец | Доза, мг/кг | Параметры коагулограммы | | |
|-------|-------------------------|-------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| | | | АЧТВ, с | Тромбиновое время, с | Протромбиновое время, с |
| 1. | Контроль (физ.р-р) | | $38,3 \pm 1,7$ | $57,7 \pm 3,8$ | $28,1 \pm 1,4$ |
| 2. | Контроль (введение ЛПС) | | $18,4 \pm 0,8^{\#}$ | $44,1 \pm 1,7^{\#}$ | $21,2 \pm 1,3$ |
| 3. | Дабигатрана этексилат | $12,0^1$ | $41,0 \pm 2,0^*$ | $566,1 \pm 45,5^*$ | $31,1 \pm 1,0$ |
| 4. | Н | $5,5^2$ | $28,7 \pm 1,0^*$ | $640,3 \pm 7,4^*$ | $26,4 \pm 1,4$ |

Примечание: ¹ - доза, полученная путем перерасчета с использованием межвидового коэффициента;

² - доза, эквимоллярная дозе дабигатрана этексилата 12,0 мг/кг;

* - данные достоверны относительно контроля с ЛПС, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$);

[#] - данные, достоверны относительно контроля (физ. р-р).

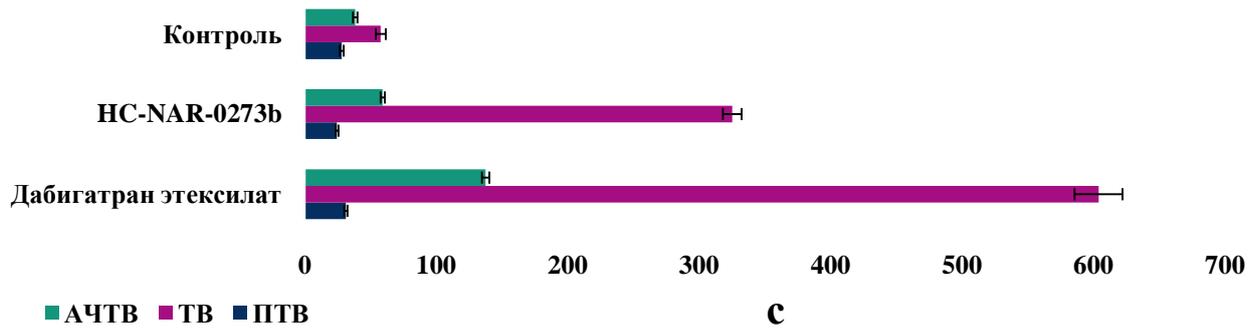


Рисунок 6.1 - Влияние соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на параметры коагулограммы крови интактных крыс

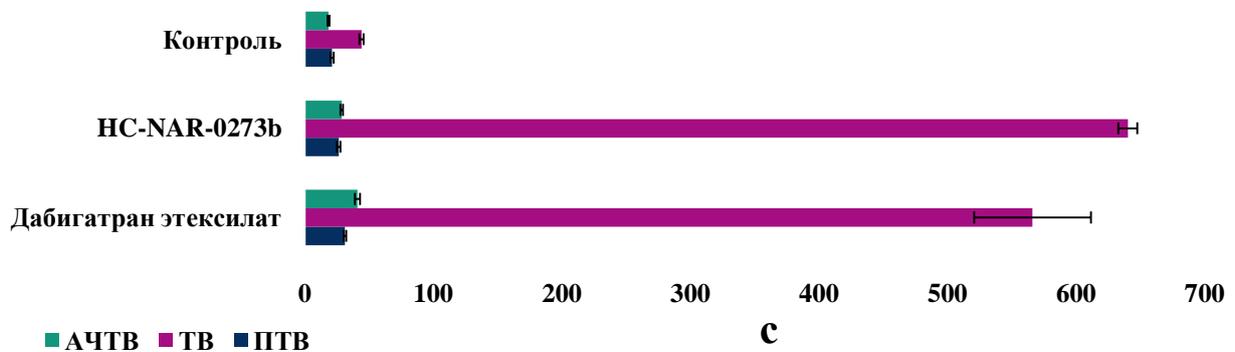


Рисунок 6.2 - Влияние соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на параметры коагулограммы крови крыс при гиперцитокинемии

6.2. Изучение антикоагулянтной активности соединения НС-NAR-0273b по влиянию на параметры тромбоэластографии без и в условиях гиперцитокинемии *ex vivo*

На первом этапе было исследовано влияние соединения НС-NAR-0273b и дабигатрана этексилата на параметры тромбоэластограммы интактных крыс.

Через два часа после внутрижелудочного введения дабигатрана этексилата статистически значимо увеличивал показатель R в 3,5 раза, что указывает на увеличение времени образования первых нитей фибрина. Кроме того, под его влиянием в 4,3 раза уменьшался угол α , т.е. снижалась скорость образования сгустка. Максимальная амплитуда, характеризующая функциональную активность

тромбоцитов и максимальную прочность сгустков, снижалась в 1,7 раза (таблица 6.4).

Соединение HC-NAR-0273b достоверно, относительно контроля изменяло параметры тромбоэластограммы. Так, данное вещество через 2 часа после введения удлиняло показатель R в 1,4 раза, параметр K – в 2,5 раза и уменьшало показатель угла α в 1,6 раза. При этом соединение HC-NAR-0273b не оказывало влияния на параметр MA. (таблица 6.4, рисунок 6.3.).

Таблица 6.4 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на показатели тромбоэластограммы (ТЭГ) крови крыс *ex vivo* при однократном внутривенном введении ($M \pm m$) (n=5)

| № п/п | Тестируемый образец | Доза, мг/кг | Время забора крови после введения вещества, ч | Параметры ТЭГ | | | |
|-------|-----------------------|-------------------|---|---------------|-----------|-----------------------|--------------|
| | | | | R, мин | K, мин | Угол α , град. | MA, отн. ед. |
| 1. | Контроль | | | 6,4±0,9 | 2,5±0,1 | 61,5±2,3 | 65,5±1,2 |
| 2. | Дабигатрана этексилат | 12,0 ¹ | 2 | 22,8±3,3* | 16,8±2,8* | 14,1±3,1* | 37,1±7,9* |
| 3. | HC-NAR-0273b | 5,5 ² | 2 | 8,7±0,2* | 6,2±0,4* | 38,8±3,7* | 58,8±3,0 |

Примечание: ¹ - доза, полученная путем перерасчета с использованием межвидового коэффициента;

² - доза, эквивалентная дозе дабигатрана этексилата 12,0 мг/кг;

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

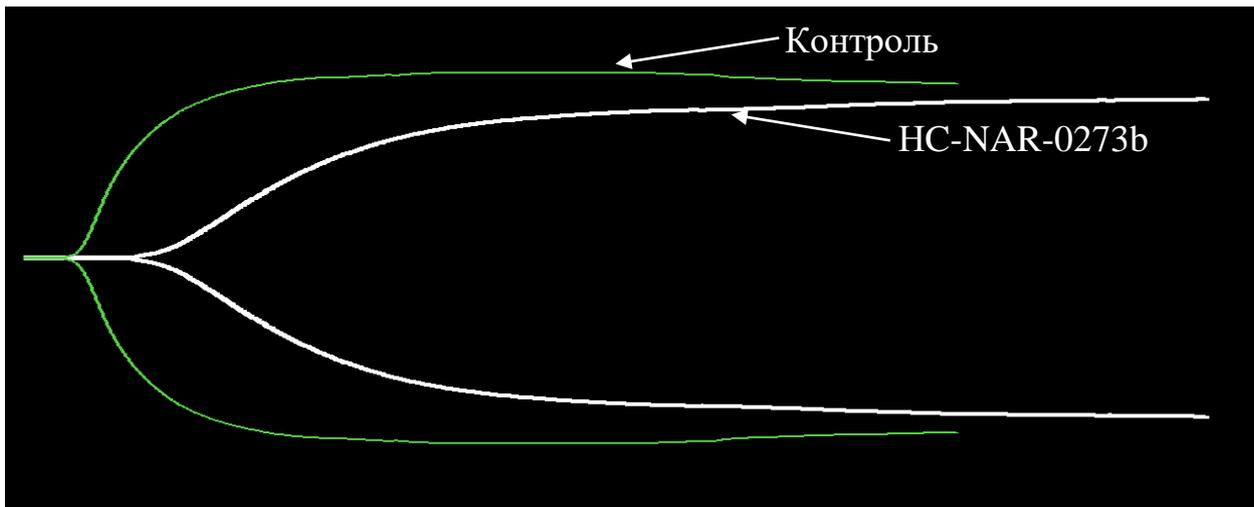


Рисунок 6.3 - Влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры коагулограммы крови крыс

Таким образом, в результате выполненных исследований на интактных животных соединение HC-NAR-0273b через два часа после внутрижелудочного введения изменяло параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции.

На втором этапе было исследовано влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры тромбоэластограммы в условиях системной воспалительной реакции, вызванной внутривенным введением ЛПС. Полученные данные представлены в таблице 6.5. Показатели R и K тромбоэластограммы крыс контрольной группой с системным воспалением достоверно укорачивались по сравнению с контрольной группой интактных животных, что свидетельствует об активации коагуляционного звена гемостаза (рисунок 6.4.).

Препарат сравнения дабигатрана этексилат увеличивал показатель R в 4,5 раза, при этом соединение HC-NAR-0273b также удлиняло этот параметр в 3,7 раза. Дабигатрана этексилат достоверно в 3 раза увеличивал показатель K. В сравнении с ним, исследуемое соединение не оказывало действия на данный параметр. Также под действием HC-NAR-0273b и препарата сравнения уменьшалась скорость образования сгустка в 1,4 и 1,9 раза соответственно.

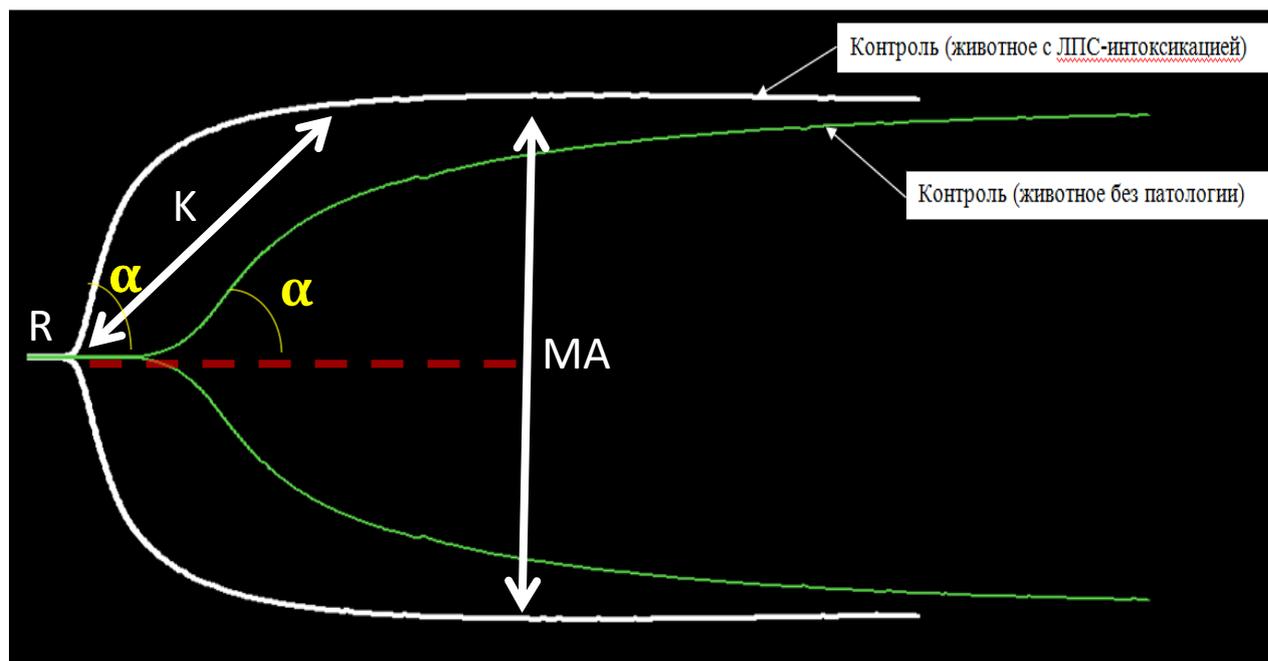


Рисунок 6.4 - Тромбоэластограмма интактных животных и животных с системной воспалительной реакцией (ЛПС-интоксикация)

R- время образования первых нитей фибрина

K- время образования стабильного сгустка

Угол α - скорость образования сгустка

МА - максимальная амплитуда, характеризующая функциональную активность тромбоцитов

Таблица 6.5 - Влияние соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата в эквимольных дозах на показатели тромбоэластограммы крови крыс *ex vivo* при однократном внутрижелудочном введении в условиях гиперцитокинемии ($M \pm m$) (n=5)

| № п/п | Тестируемый образец | Параметр тромбоэластограммы | | | |
|-------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|----------------|
| | | R, мин | K, мин | Угол, град. | МА, отн.ед. |
| 1. | Контроль (физ.р-р) | $6,4 \pm 0,9$ | $2,5 \pm 0,1$ | $61,5 \pm 2,3$ | $65,5 \pm 1,2$ |
| 2. | Контроль (введение ЛПС-токсина) | $4,7 \pm 0,3^{\#}$ | $1,4 \pm 0,2^{\#}$ | $69,2 \pm 1,4$ | $69,6 \pm 1,0$ |
| 3. | HC-NAR-0273b | $17,4 \pm 0,1^*$ | $5,5 \pm 0,3$ | $44,0 \pm 1,9^*$ | $62,1 \pm 3,8$ |
| 4. | Дабигатрана этексилат | $21,2 \pm 2,5^*$ | $7,6 \pm 1,2^*$ | $32,4 \pm 4,5^*$ | $55,1 \pm 7,0$ |

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

На рисунке 6.5. представлено влияние соединения HC-NAR-0273b на параметры тромбоэластограммы в условиях системной воспалительной реакции.

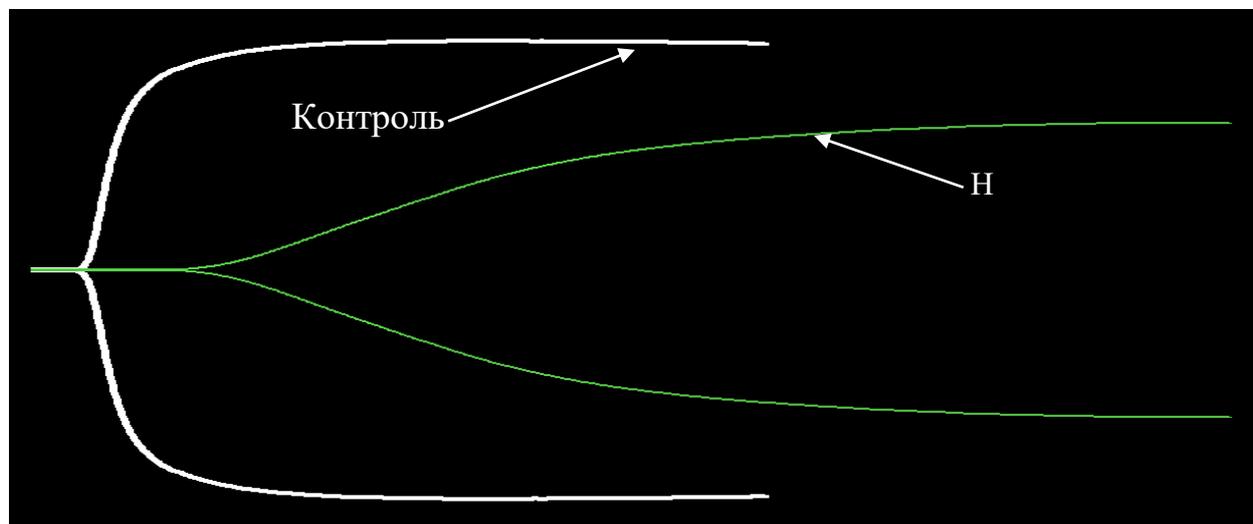


Рисунок 6.5 - Влияние HC-NAR-0273b на время образования первых нитей фибрина в условиях гиперцитокинемии.

Таким образом, в результате проведенных исследований соединение HC-NAR-0273b на животных с системной воспалительной реакцией изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции более выражено, чем в опытах на интактных крысах.

6.3. Влияние соединения HC-NAR-0273b на выживаемость мышей при моделировании ЛПС - индуцированного тромбоза легких на мышах

В результате выполненных исследований в группе контрольных животных отмечалась гибель 100% мышей (таблица 6.6). В течение суток после внутривенного введения ЛПС в дозе 2 мг/кг животные погибали.

Оценку влияния соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата, которые вводили за 2 часа до создания гиперцитокинемии, проводили через сутки после введения ЛПС. Дабигатрана этексилат при однократном внутривенном введении достоверно предотвращал гибель 6 животных из 10 по сравнению с контрольной группой, в которой погибли все 10 мышей. В группе животных, получавших соединение HC-NAR-0273b, погибло 2 мыши из 10 (таблица 6.6).

Таблица 6.6 - Действие соединения HC-NAR-0273b и препарата сравнения дабигатрана этексилата на выживаемость животных при моделировании ЛПС-индуцированного тромбоза легких (ЛПС - 2 мг/кг) на мышах (n=10)

| № п/п | Тестируемые образцы | Доза, мг/кг | Число погибших животных | Выжившие животные, % |
|-------|-----------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| 1. | Контроль | | 10 | 0 |
| 2. | Дабигатрана этексилат | 27,0 ¹ | 4 | 60* |
| 3. | Н | 13,0 ² | 2 | 80* |

Примечание: * – ($p \leq 0,01$) 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;

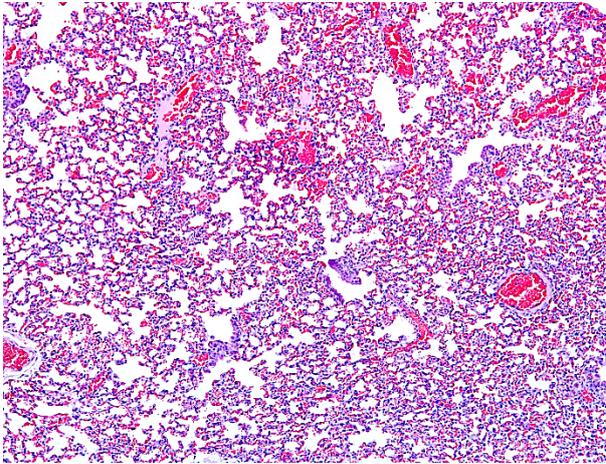
n – число животных.

Морфологическое исследование легких

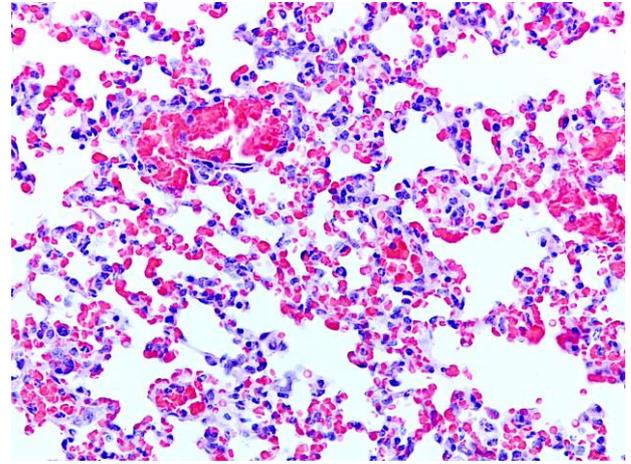
Микроскопическое исследование легочной ткани мышей через 24 часа после внутривенного введения бактериального липополисахарида в дозе 2 мг/кг показало, что в органе преобладали нарушения кровообращения, реализованные кровоизлияниями очагового характера, венозным полнокровием, геморрагическим и геморрагически-серозным экссудатом в стенках и просветах альвеол. Присутствовали признаки дистелектаза. Были обнаружены эритроцитарные сладжи в сосудах микроциркуляторного русла (рисунок 6.6.).

При изучении парафиновых срезов легочной ткани мышей, окрашенных по Carstair, через 24 часа после внутривенного введения бактериального липополисахарида в дозе 2 мг/кг, регистрировали венозное полнокровие и сладжированные эритроциты, формирующие первичные красные тромбы, обтурирующие просветы крупных и мелких сосудов (рисунок 6.7.А). В пристеночной части сосудов обнаруживались адгезированные сформированные фибриновые сгустки, в составе которых определялся незначительный

коллагеновый компонент. Кроме того, небольшие депозиты фибрина откладывались в стенках альвеол (рисунок 6.7.Б).



А

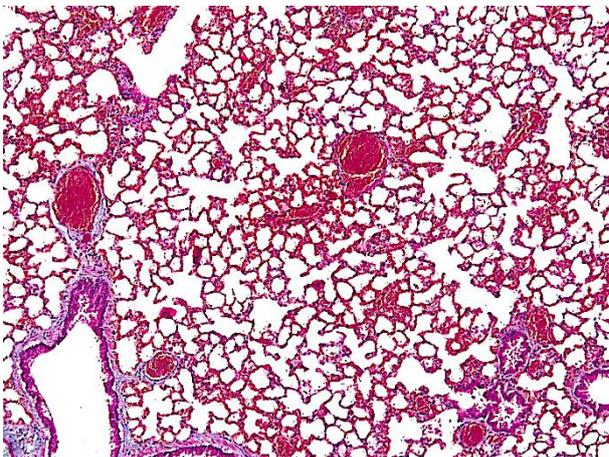


Б

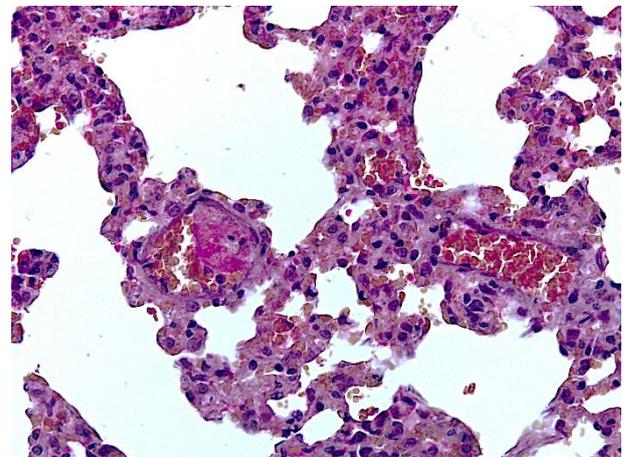
Рисунок 6.6 - Фотографии срезов гистологических образцов легких контрольной группы мышей через 24 часа после введения ЛПС в дозе 2 мг/кг.

Окраска гематоксилин-эозином.

Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б)



А



Б

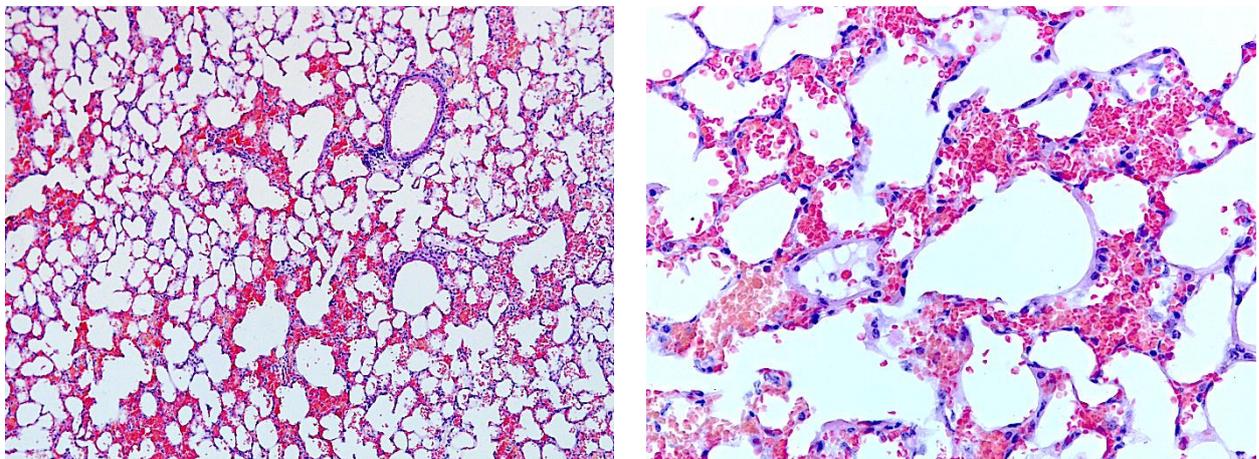
Рисунок 6.7 - Фотографии срезов гистологических образцов легких контрольной группы мышей через 24 часа после введения ЛПС в дозе 2 мг/кг.

Трихромная окраска по Carstairs.

Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б)

При микроскопическом исследовании ткани легких мышей, получавших соединение HC-NAR-0273b в дозе 13 мг/кг на фоне ЛПС-индуцированного генерализованного острого повреждения, у большинства подопытных животных патологический процесс был менее выражен и характеризовался преимущественно диапедезом эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в полости альвеол, очаговыми мелкими кровоизлияниями и явлениями дистелектаза. В альвеолярных полостях присутствовал геморрагический экссудат (рисунок 6.8.). В то же время общая гистоархитектоника легочной ткани была сохранена.

Окрашивание парафиновых срезов легочной ткани подопытных мышей трихромной окраской по Carstair показало, что в большинстве случаев тромбы были представлены сладжированными эритроцитами, обтурирующими просветы крупных сосудов (рисунок 6.9.А). При этом в отдельных случаях в просвете мелких сосудов выявлялся фибриновый компонент в виде тонких нитей (рисунок 6.9.Б).



А

Б

Рисунок 6.8 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей при внутрижелудочном введении соединения HC-NAR-0273b на фоне интоксикации липополисахаридом; Окраска гематоксилин-эозином.

Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б)

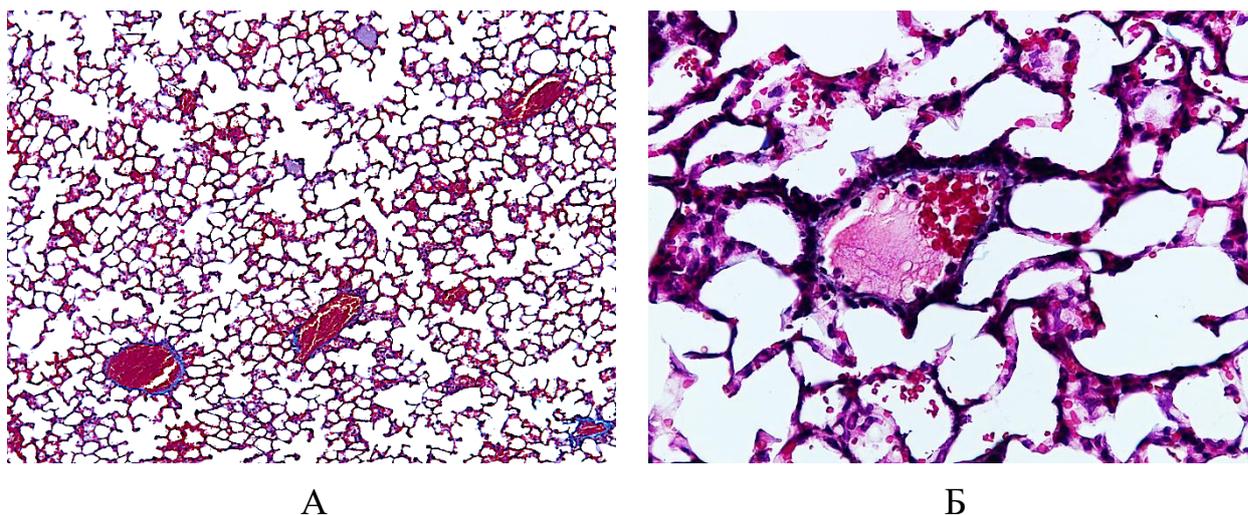
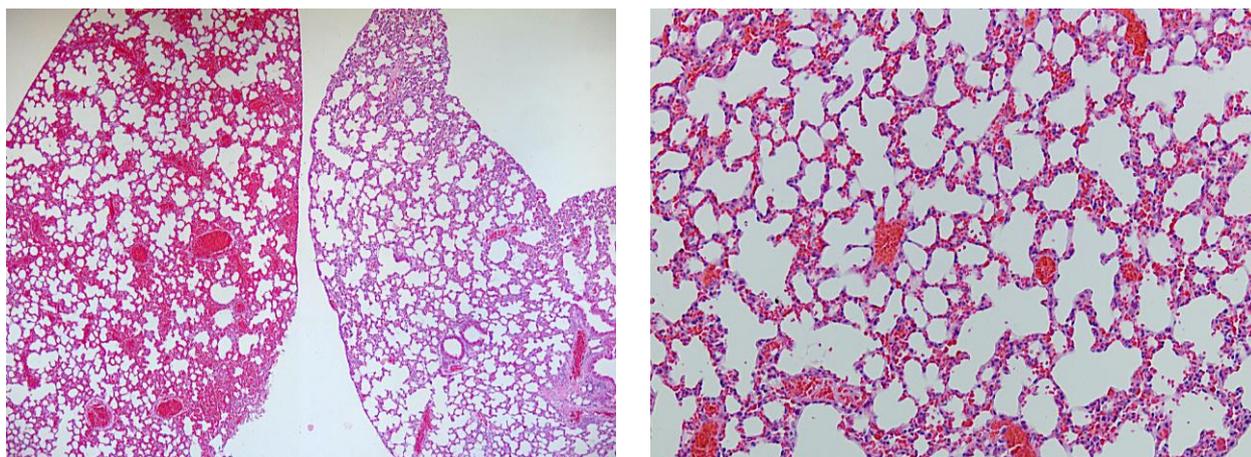


Рисунок 6.9 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей при внутрижелудочном введении соединения HC-NAR-0273b на фоне интоксикации липополисахаридом; Трихромная окраска по Carstairs. Общее увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б)

При микроскопическом исследовании ткани легких мышей, получавших дабигатрана этексилат, у половины подопытных животных были выявлены кровоизлияния очагового и сливного характера, а также полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок и венозное полнокровие. В альвеолярных полостях присутствовал геморрагический экссудат. Просветы мелких и крупных сосудов были практически полностью закрыты склеенными эритроцитами (рисунок 6.10.А).

У второй половины животных патологический процесс был менее выражен и характеризовался, преимущественно, диапедезом эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в полости альвеол, очаговыми мелкими кровоизлияниями и явлениями дистелектаза. Сладжированные эритроциты обтурировали просветы мелких сосудов (рисунок 6.10.Б).



А

Б

Рисунок 6.10 - Фотографии срезов гистологических образцов легких мышей при однократном внутрижелудочном введении дабигатрана этексилата на фоне интоксикации липополисахаридом. Окраска гематоксилин-эозином.

Общее увеличение $\times 50$ (А); $\times 200$ (Б)

Таким образом, согласно результатам морфологического исследования, однократное введение дабигатрана этексилата и соединения НС-NAR-0273b 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 НС-NAR-0273b.

Заключение

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.

У септических больных воспаление взаимосвязано как с гипер- так и гипокоагуляционными изменениями в организме. Клетки воспаления вызывают повреждение эндотелия сосудов путем выброса цитокинов. (Протасевич П.П.,

2009). Оказалось, что данное состояние является частым осложнением протекания новой коронавирусной инфекции COVID-19 (Fajgenbaum, D. C., 2020). 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 ЛПС. В результате выявлено, что соединение HC-NAR-0273b по сравнению с антитромбиновой активностью на интактных животных проявляет более выраженное действие в условиях гиперцитокинемии, как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*, что свидетельствует о возможном подавлении прокоагулянтных путей, вызванных воспалением.

Метод тромбоэластографии широко используется в экспериментальной и клинической медицине, так как позволяет оценить все звенья гемостаза (Burton A.G., 2020). В результате проведенных исследований было показано, что b на животных с системной воспалительной реакцией изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции более выраженно, 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 вышеизложенного, усиление антикоагулянтного действия соединения HC-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.

ГЛАВА 7. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ НС-NAR-0273b ПО МЕТОДУ IRWIN S

По результатам исследований острой токсичности соединения НС-NAR-0273b (глава 3), был определен показатель LD_{50} , который условно составил более 2,0 г/кг. Таким образом, данное вещество можно отнести к малотоксичным соединениям. Однако, при изучении специфической токсичности новых соединений необходимо проводить оценку их токсического действия на вегетативные параметры и нейротоксические нарушения. Исследование нейротоксических эффектов с использованием многопараметрового теста по Irwin S. (1964) необходимо для оценки влияния новых веществ на ЦНС, поведенческие реакции, нервно-мышечную возбудимость, а также на вегетативную систему. В связи с тем, что данный метод исследования дает возможность определить дозы, при которых возникают нежелательные эффекты, является целесообразным изучение возможности проявления общетоксических свойств соединения НС-NAR-0273b.

7.1. Влияние соединения НС-NAR-0273b при внутрижелудочном введении на эмоциональный статус, нервно-мышечную возбудимость, рефлексы и двигательную координацию

При исследовании влияния соединения НС-NAR-0273b на эмоциональный статус животных (включая пугливость, вокализацию, агрессивность и пассивность) не наблюдались изменения на всем протяжении эксперимента в диапазоне исследуемых доз. Также во всех опытных группах у животных не наблюдалось стереотипного поведения.

При исследовании влияния соединения НС-NAR-0273b на состояние слухового, роговичного, и ипсилатерального сгибательного рефлексов у животных при внутрижелудочном введении в дозах 5,5; 55; 550 мг/кг не наблюдалось видимых изменений. В дозе 2000 мг/кг через час после начала исследования происходило недостоверное снижение исследуемых рефлексов на 15 % по отношению к контрольным значениям. Однако данное изменение проявлялось

только в данной временной точке, после этого все значения возвращались к исходным.

Также на протяжении всего времени исследования во всем диапазоне доз соединения HC-NAR-0273b не отмечались парезы, тремор, судороги, изменения положения хвоста животных, который свидетельствовал бы о наличие синдрома Штраубе. Не было выявлено изменения ответа на прикосновение, реакцию на боль. У всех групп исследуемых животных не наблюдались горбатость и ригидность.

Далее было исследовано влияние соединения HC-NAR-0273b на двигательную и мышечную координацию. При этом проводились наблюдение за положением тела и конечностей, дискоординации, тонуса конечностей, изменения в чувстве равновесия, изменения в двигательной активности в тесте «Ротарод», тестах удерживания на проволоке и сетке, а также регистрировалась реактивность (при этом учитывалось время от начала движения животного с места). В результате проведенных наблюдений было выявлено отсутствие изменений положения тела и конечностей у всех в группе животных, получавших внутрижелудочно соединение HC-NAR-0273b в дозах 5,5; 55; 550 мг/кг на всем протяжении исследования.

В дозе 2000 мг/кг к второму часу исследования в тестах удерживания на проволоке и сетке происходило недостоверное по отношению к контролю изменение мышечной координации животных, при котором наблюдалось не полное захватывание прутьев конечностями. Такое изменение наблюдалось вплоть до конечной временной точки эксперимента.

При внутрижелудочном введении соединения HC-NAR-0273b в терапевтической дозе - 5,5 мг/кг, а также в дозе 55 мг/кг не наблюдалось влияния на длительность удержания мышей на вращающемся стержне по сравнению с группой контроля. Время удерживание в группе контроля и группах животных, получавших исследуемое соединение в дозах 5,5 и 55,0 мг/кг соответствовало норме – 30,0 сек. В дозе 550 мг/кг у животных определялось снижение данного показателя на 20% через 2 часа после исследования (таблица 7.1). Более выраженное уменьшение тонуса конечностей наблюдалось в группе животных,

получавших соединение НС-NAR-0273b в дозе 2000 мг/кг. Эти изменения наблюдались после первого часа исследования, затем происходила выраженная тенденция по уменьшению времени удерживания мышей на вращающемся стержне в диапазоне времени.

Таблица 7.1 - Влияние соединения НС-NAR-0273b (при однократном внутрижелудочном введении) на рефлекс и параметры мышечной координации мышей ($M \pm m$)

| Интервалы времени наблюдения, мин | Удерживание на сетке и проволоке | | | | | Изменение двигательной активности (Ротарод-тест) | | | | |
|--|-------------------------------------|-----|----|-----|------|---|-----|----|-----------|-----------|
| | Доза, мг/кг | | | | | Доза, мг/кг | | | | |
| | Кон- троль (физ. р-р) | 5,5 | 55 | 550 | 2000 | Кон- троль (физ. р-р) | 5,5 | 55 | 550 | 2000 |
| Исход | - | - | - | - | - | N | N | N | N | N |
| 30 | - | - | - | - | - | N | N | N | N | N |
| 60 | - | - | - | - | - | N | N | N | N | 29,0±0,5 |
| 120 | - | - | - | - | 25%↓ | N | N | N | 27,4±1,2 | 26,8±1,0 |
| 180 | - | - | - | - | 25%↓ | N | N | N | 24,6±1,3* | 23,8±1,0* |
| 240 | - | - | - | - | 25%↓ | N | N | N | 24,0±1,7* | 20,0±1,4* |

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

N-вариант нормы.

Для проведения оценки реакции животных на изменения в окружающей обстановке проводился отсчет времени от момента перемещения животного на открытое пространство хвостом к экспериментатору до начала его движения. При оценке результатов изменения двигательной активности животных было показано, что в контрольной и во всех опытных группах происходило статистически незначимое удлинение данного показателя начиная от начала эксперимента, вплоть до его завершения (таблица 7.2).

Таблица 7.2 - Влияние соединения НС-NAR-0273b на реактивность мышей ($M \pm m$)

| Время регистрации, мин | Контроль | Доза, мг/кг | | | |
|------------------------|----------|-------------|----------|-----------|----------|
| | | 5,5 | 55 | 550 | 2000 |
| Исход | 7,4±1,6 | 5,8±0,6 | 9,4±1,8 | 7,2±1,4 | 6,8±2,8 |
| 30 | 8,8±2,8 | 12,8±2,9* | 9,6±1,3 | 8,9±1,9 | 7,2±1,4 |
| 60 | 8,0±2,1 | 14,0±5,3* | 10,4±1,3 | 10,8±1,7 | 7,8±0,4 |
| 120 | 8,2±0,8 | 12,2±5,5* | 10,2±1,7 | 13,0±2,4* | 9,4±0,7 |
| 180 | 8,0±1,3 | 13,2±2,2* | 10,4±1,4 | 15,6±3,3* | 9,6±0,4 |
| 240 | 9,8±2,2 | 14,0±1,5* | 10,0±2,7 | 12,8±2,2* | 11,6±1,1 |

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

7.2. Изучение поведенческой реакции мышей (тест «открытое поле») при внутрижелудочном введении соединения НС-NAR-0273b

При изучении поведенческой активности в тесте «открытое поле» оценивали следующие показатели: поисковая активность, горизонтальная активность, вертикальная активность, болюсы, груминг, уринация, выходы в центр, время выхода из центра (Воронина Т.А., 2005).

При внутрижелудочном введении соединения НС-NAR-0273b в различных дозах наблюдалось постепенное снижение всех регистрируемых параметров при увеличении времени исследования, что коррелирует с данными, описанными в группе интактного контроля. Такая же тенденция была характерна при увеличении дозы исследуемого вещества относительно контрольной группы животных и внутри каждой опытной группы. Статистически незначимое относительно исходного уровня снижение горизонтальной активности в более чем 4 раза наблюдается к концу эксперимента в дозах 55; 550; 2000 мг/кг (таблица 7.3).

Таблица 7.3 - Влияние соединения HC-NAR-0273b (при однократном внутрижелудочном введении) на поведенческую активность мышей в установке «открытое поле» на горизонтальную активность ($M \pm m$)

| Тип активности | Время измерения, мин | Контроль (физ. р-р) | Доза мг/кг | | | |
|--|----------------------|---------------------|------------|----------|----------|----------|
| | | | 5,5 | 55 | 550 | 2000 |
| Горизонтальная двигательная активность | Исход | 53,8±8,4 | 52,0±2,5 | 62,2±8,4 | 51,6±5,3 | 57,2±5,8 |
| | 30 | 48,0±7,5 | 39,8±9,3 | 33,0±7,8 | 28,6±8,4 | 42,0±8,9 |
| | 60 | 30,0±10,7 | 22,4±9,3 | 19,8±2,9 | 18,6±9,1 | 19,2±6,5 |
| | 120 | 28,4±5,0 | 16,0±7,1 | 16,8±0,9 | 16,2±5,7 | 13,8±4,4 |
| | 180 | 25,8±10,4 | 15,2±7,1 | 14,6±0,4 | 11,8±2,7 | 11,4±2,1 |
| | 240 | 22,4±8,6 | 11,4±4,8 | 13,2±1,5 | 11,6±1,4 | 11,4±1,4 |

В ходе исследования вертикальной активности было показано, что в опытных группах вне зависимости от дозы, происходило статистически незначимое снижение двигательной активности во всех временных точках (таблица 7.4).

Таблица 7.4 - Влияние соединения HC-NAR-0273b (при однократном внутрижелудочном введении) на поведенческую активность мышей в установке «открытое поле» на вертикальную активность ($M \pm m$)

| Тип активности | Время измерения, мин | Контроль | Доза мг/кг | | | |
|--------------------------------------|----------------------|----------|------------|----------|---------|----------|
| | | | 5,5 | 55 | 550 | 2000 |
| Вертикальная двигательная активность | Исход | 8,4±2,6 | 7,2±2,1 | 20,2±2,9 | 8,8±3,0 | 14,2±0,6 |
| | 30 | 5,2±1,7 | 5,2±1,6 | 4,2±2,6 | 7,8±3,7 | 8,6±1,6 |
| | 60 | 2,6±1,3 | 2,2±0,7 | 1,8±1,1 | 5,4±4,0 | 4,0±2,8 |
| | 120 | 1,8±0,9 | 1,0±0,3 | 2,0±1,6 | 6,6±4,3 | 2,4±1,5 |
| | 180 | 1,2±0,8 | 0,8±0,4 | 1,6±1,4 | 3,2±2,5 | 2,6±1,4 |
| | 240 | 0,6±0,6 | 0,2±0,2 | 2,0±1,1 | 2,8±2,3 | 1,2±1,0 |

Поисковая активность мышей оценивалась по числу изученных животным отверстий на дне установки «Открытое поле». Данный параметр отражал

исследовательский интерес мыши к новым пространствам или объектам, в обычных условиях подавленный тревожным влиянием освещенной территории (таблица 7.5).

Таблица 7.5 - Влияние соединения HC-NAR-0273b (при однократном внутрижелудочном введении) на поведенческую активность мышей в установке «открытое поле» на поисковую активность ($M \pm m$)

| Тип активности | Время измерения, мин | Контроль | Доза мг/кг | | | |
|----------------------|----------------------|----------|------------|----------|----------|----------|
| | | | 5,5 | 55 | 550 | 2000 |
| Поисковая активность | Исход | 4,6±1,5 | 7,1±1,9 | 7,2±2,6 | 5,1±1,8 | 6,2±1,6 |
| | 30 | 8,4±2,0 | 5,1±1,7 | 2,8±1,7* | 0,6±0,2* | 2,0±0,7* |
| | 60 | 1,2±0,8 | 2,0±0,9 | 0,6±0,06 | 0,4±0,2 | 0,8±0,2 |
| | 120 | 1,0±0,4 | 1,0±0,3 | 0,4±0,2 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 |
| | 180 | 0,6±0,4 | 0,8±0,4 | 0,2±0,2 | - | 1,0±0,4 |
| | 240 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 |

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

При изучении влияния на эмоциональный статус оценивалось изменение актов груминга. В группе мышей, которым вводилось соединение HC-NAR-0273b в возрастающих дозах, происходила регистрация снижения данного показателя, начиная с 30-й минуты исследования вплоть до полного его исчезновения. В опытных группах, которые получали соединение HC-NAR-0273b в дозах 550 и 2000 мг/кг, с начала исследования наблюдалось постепенное снижение количества актов груминга. Однако после 2 часов и до конца исследования отмечалось полное отсутствие груминга во всех группах (таблица 7.6).

Таблица 7.6 - Влияние соединения HC-NAR-0273b (при однократном внутрижелудочном введении) на поведенческую активность мышей в установке «открытое поле» на груминг ($M \pm m$)

| Тип активности | Время измерения, мин | Контроль | Доза, мг/кг | | | |
|---------------------------|----------------------|----------|-------------|---------|---------|---------|
| | | | 5,5 | 55 | 550 | 2000 |
| Количество актов груминга | Исход | 3,2±1,2 | 4,2±0,4 | 5,0±1,6 | 4,2±0,5 | 3,2±1,2 |
| | 30 | 0,2±0,2 | 1,0±0,6 | 0,4±0,4 | 0,3±0,2 | 0,4±0,4 |
| | 60 | 0,8±0,6 | - | 1,0±0,8 | 0,6±0,6 | 1,2±0,4 |
| | 120 | - | - | 0,2±0,2 | - | - |
| | 180 | 0,2±0,2 | 0,4±0,4 | 0,2±0,2 | - | - |
| | 240 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 | 0,2±0,2 | - | - |

7.3. Влияние соединения HC-NAR-0273b на вегетативную функцию нервной системы

В результате исследования соединения HC-NAR-0273b в возрастающих дозах во всех группах животных не наблюдалось птоза и экзофтальма, и изменения цвета кожи животных (цианоз). При зажиме основания хвоста у мышей не изменялся показатель болевой чувствительности, во всех группах присутствовала ответная реакция на раздражение, также не наблюдалось изменения ректальной температуры. Выявленного влияния соединения HC-NAR-0273b на частоту дыхательной активности не было отмечено в ходе эксперимента (таблица 7.7.).

Таблица 7.7 - Влияние соединения HC-NAR-0273b на изменение показателя частоты дыхательной активности ($M \pm m$)

| Доза, мг/кг | Интервалы регистрации показаний | | | | | |
|-------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | Исход | 30 мин | 60 мин | 120 мин | 180 мин | 240 мин |
| Контроль | 170,8±4,9 | 172,0±1,7 | 169,2±3,0 | 168,0±2,0 | 165,8±2,9 | 166,4±2,7 |
| 5,5 | 156,2±3,1 | 155,2±5,1 | 156,6±4,9 | 156,4±6,5 | 150,4±6,6 | 146,4±5,0* |
| 55 | 170,4±6,0 | 172,0±2,2 | 170,4±3,2 | 166,4±2,0 | 166,8±2,8 | 165,6±2,4 |

| | | | | | | |
|------|------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|
| 550 | 145,6±7,5* | 144,8±7,1* | 154,0±5,5 | 152,8±5,9* | 157,6±3,9 | 156,0±1,8 |
| 2000 | 167,2±7,9 | 169,2±4,7 | 169,2±2,9 | 165,2±0,8 | 161,6±5,2 | 162,4±5,0 |

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

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что НС-NAR-0273b вызывает изменение исследуемых параметров только в максимальной дозе - 2000 мг/кг. При этом наблюдается обратимое снижение рефлексов, незначительное миорелаксирующее действие. При проведении теста удержания на стержне - снижается двигательная активность. При проведении тестов «удерживание на проволоке» и «удерживание на сетке» это изменение носит временный характер и проявляется только в последний час исследования. В результате, можно сделать вывод о том, что соединение НС-NAR-0273b не вызывает влияния на двигательную и мышечную координацию, а также на реактивность животных. Также соединение НС-NAR-0273b не оказывает влияние 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.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В силу распространённости с венозными тромбозами и связанной с ними тромбоземболией лёгочных артерий может столкнуться специалист, работающий в любой области клинической медицины. (Lanthier L., 2011). Риск венозных тромбозов возрастает при увеличении продолжительности оперативного вмешательства, при проведении ортопедических операций на нижних конечностях по замене суставов, при остеосинтезе (Kafeza M., 2017; Kitano D., 2021). Хорошо известен высокий риск развития флеботромбоза у больных с онкологическими заболеваниями, когда при контакте опухолевых клеток с кровью выделяются прокоагулянтные компоненты – тканевой фактор и тромбин (Cohen O., 2021). Также велика вероятность тромбообразования у пациентов с хроническими аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, хронической сердечной недостаточностью, вирусными и бактериальными инфекциями (Wong, J. P., 2017; Goldhaber S.Z., 2020; Zervou M.I., 2021).

Коагуляционный гемостаз обеспечивает образование фибринового сгустка в месте повреждения стенки сосуда и является многоступенчатым ферментативным процессом (He S., 2021). Он состоит из «внутреннего», «внешнего» и «общего» каскада свертывания. Тромбин играет роль финального ключевого медиатора в каскаде коагуляции, который протеолитически расщепляет фибриноген, высвобождая фибринопептиды для образования фибрина, а затем полимеризуется с образованием гемостатической пробки на месте повреждения сосуда. Состояние, характеризующееся чрезмерной коагуляцией крови и тромбообразованием, ведет к ишемии тканей и органов (Taher A.T., 2018; Schwann T.A., 2010).

Среди средств, для предотвращения венозных тромбозов лидирующее место занимают антикоагулянты. В настоящее время в качестве НОАК используют прямые ингибиторы IIa и Xa фактора (Burnett A.E., 2016). Дабигатран является пероральным прямым ингибитором тромбина/фактора IIa предотвращая расщепление фибриногена на фибрин, тем самым блокируя каскад свертывания и тромбоз (Beyer-Westendorf J., 2021). Три других препарата ривароксабан,

апиксабан и эдоксабан являются пероральными селективными ингибиторами фактора Ха (Roehrig S., 2005; Бокарев И.Н., 2016). Их антикоагулянтный эффект более предсказуем и стабилен и не требует рутинного лабораторного мониторинга. Кроме этого, класс новых оральных антикоагулянтов демонстрирует сопоставимую эффективность и значительно более низкий риск кровотечений по сравнению с варфарином (Stanifer J.W., 2020). Однако данная группа препаратов имеет свои недостатки, так как вступает в нежелательные фармакодинамические взаимодействия с пищевыми продуктами, растительными добавками и лекарственными средствами (Di Minno A., 2017). Большинство используемых в настоящее время лекарств для предотвращения тромбоза имеют очень высокую стоимость и поставляются из-за рубежа. Поэтому поиск новых отечественных оральных антикоагулянтов является весьма актуальным.

На основании литературного обзора и данных, полученных на базе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, было установлено, что гетероциклические структуры способны оказывать влияние на систему коагуляционного гемостаза (Спасов А.А., 2009; Кучерявенко А.Ф., 2016; Khalid W., 2018; Gurevich K.G., 2021; Savateev K.V., 2022).

В результате поиска 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 *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. Данные соединения являются представителями производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов, что указывает на перспективу данного класса для поиска соединений с антитромбиновой активностью. В качестве препарата сравнения был исследован ингибитор IIa фактора (тромбин) дабигатрана этексилат. Для расчета EC_{50} была изучена способность 4 активных соединений и препарата сравнения удлинять тромбиновое время, в зависимости от концентрации. В результате этого по EC_{50} антитромбиновой активности *in vitro* исследованные

соединения располагаются в следующем порядке: FV-174/Na > KC-G > KC-786 > HC-NAR-0273b > Дабигатрана этексилат.

Далее была проведена оценка зависимости антикоагулянтного действия от химической структуры соединений. Была сформирована верифицированная база данных по структуре и прямой антикоагулянтной активности, включающая 42 новых производных [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина и [1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины. 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. Найдены 11 структурных признаков, положительно влияющих на высокий 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. По результатам проведенного анализа заместитель $R_4 = -CH_3$ является наиболее значимым положительно влияющим на уровень прямой антикоагулянтной активности.

При изучении данных соединений в опытах *ex vivo* антитромбиновое действие было выявлено только у соединения HC-NAR-0273b через 2 часа после внутрижелудочного введения крысам в дозе эквимольной препарату сравнения. Данное соединение пролонгировало показатель тромбинового времени в 6 раз относительно контроля, однако в 1,8 раза по влиянию на данный параметр уступало дабигатрану этексилату. Соединения под шифром FV-174/Na, KC-G и KC-786 не проявили антитромбиновой активности при внутрижелудочном введении крысам, что может указывать на особенности их фармакокинетики. Поэтому для дальнейшего изучения было выбрано соединение HC-NAR-0273b.

Величина острой токсичности является важным показателем лекарственных средств. Согласно результатам исследований острой токсичности соединения HC-NAR-0273b на мышах при однократном внутрижелудочном введении с учетом классификации токсичности по И.В.Березовской (2003) изучаемое вещество, может быть отнесено к 4 классу малотоксичных соединений. Далее было установлено, что для соединения HC-NAR-0273b не характерно наличие

статистически значимого цитотоксического воздействия на клетки линии HepG2 при 48-ми часовой инкубации в диапазоне концентраций 0,01-1000 мкМ, в отличие от препарата дабигатрана этексилата, для которого показано выраженное цитотоксическое влияние в концентрациях 1-100 мкМ. В связи с полученными данными о цитотоксичности были рассчитаны условные терапевтические индексы соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана этексилата. По данному показателю соединения HC-NAR-0273b превышает препарат сравнения в 21 раз.

В связи с выявленной антитромбиновой активностью у нового производного 5,7-диметил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидина под лабораторным шифром HC-NAR-0273b в тестах *in vitro* и *ex vivo* обосновано его дальнейшее изучение в норме и при экспериментальной патологии.

Актуальным является изучение антитромботической активности потенциального антикоагулянтного соединения HC-NAR-0273b на моделях венозных тромбозов.

Тромбин-индуцированная тромбоэмболия у мышей очень чувствительна именно к ингибиторам тромбина (Zhou J., 2009). Соединение HC-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтную активность *in vitro* и *in vivo* при однократном 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. Гистология легочной ткани показала, что соединение HC-NAR-0273b на модели тромбин-индуцированного тромбоза легких способствовало коррекции модельных нарушений реологических свойств крови, тормозя процесс образования внутрисосудистых фибриновых тромбов.

В качестве моделей венозного тромбоза используется состояние венозного стаза, который достигается путем пережатия крупной вены, в частности нижней полой вены. Механизм тромбообразования на данной модели связан с расширением вены дистальнее места наложения лигатуры. В образовании тромба принимает участие фактор XIII (FXIII), который активируется тромбином до

образования FXIIIa и стабилизирует фибрин путем перекрестного связывания мономеров фибрина и поперечного связывания альфа2-антиплазмина ($\alpha 2$ -AP) с фибриногеном и фибрином (Muszbek L., 1999; Ariens R.A., 2002; Hethershaw E.L., 2014). Так как при ингибировании тромбина будет уменьшаться активация FXIII, то это будет приводить к образованию нестабильного сгустка. На модели тромбоза нижней полой вены соединение HC-NAR-0273b, уменьшает 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.

Оценкой эффективности потенциальных антикоагулянтов по скорости образования тромба в реальном времени с использованием доплерографии, при повреждении сосудистой стенки тромботическим агентом, является одним из способов моделирования венозного тромбоза является. Таким тромботическим агентом является хлорид железа (Rettger C., 2005). По данным Zhang Y. при наложении хлорида железа на вену усиливаются процессы перекисного окисления липидов и возникает окислительный стресс. Это вызывает выделение тканевых факторов эндотелия и через минуты после повреждения формируется окклюзирующий тромб (Zhang Y., 2017; Marcinczyk N., 2017). В результате проведенных исследований на модели тромбоза бедренной вены, индуцированного 50% раствором FeCl₃ соединение HC-NAR-0273b по показателю ED₅₀ антитромботической активности, превосходило препарат сравнения в 2,5 раза.

Глобальный тест на тромбоз — это комплексный тест на реактивность тромбоцитов, коагуляцию, а именно на генерацию тромбина и спонтанный тромболизис с использованием образцов крови без стабилизаторов. Соединение HC-NAR-0273b при однократном внутривенном введении в тест-системе Горога увеличивало время образования тромба в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой, не вызывая при этом лизис тромба. По антитромботической активности на данной модели исследуемое соединение было сравнимо с дабигатраном этексилатом.

Таким образом, полученные данные по изучению антитромботической активности соединения HC-NAR-0273b свидетельствуют о его способности предотвращать возникновение венозных тромбозов.

Далее было 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*. По показателю ED₅₀ данное соединение было сравнимо с ингибитором тромбина дабигатраном. Также способность соединением 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 Hemoclot 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 внутрижелудочного введения изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции, что также подтверждает его антикоагулянтное действие. Блокирование тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов цельной крови кроликов на 64,3% также доказывает его ингибирующее влияние на тромбин. Таким образом, на основании изучения механизма антикоагулянтного действия соединения HC-NAR-0273b можно заключить, что он связан с ингибированием IIa фактора.

Частым осложнением протекания вирусных, в том числе COVID-19 (SARS-CoV-2) и бактериальных заболеваний является гиперцитокинемия, связанная с выраженной реакцией иммунной системы (Mirzaei R., 2020). Данное состояние вызывает повреждение эндотелия легочных сосудов и нарушение всех его защитных функций, так как снижается выделение оксида азота и PGI₂, которые

подавляют активацию и адгезию лейкоцитов. Генерация тромбина приводит к образованию фибрина, активации тромбоцитов и эндотелиальных клеток через PAR-1 рецепторы, что вызывает увеличение фактора фон Виллебранда, усиливает воспаление, вызывая активацию Р-селектина, активирует лейкоциты и гладкие мышцы эндотелия, что приводит к развитию цитокинового шторма (Mehta P., 2020). Следовательно, системная дисфункция эндотелия и коагулопатия при вирусных и бактериальных инфекциях ассоциированы с повышением риска летального исхода (Llitjos J.F., 2020; Klok F.A., 2020). Необходимо отметить, что одним из схожих с цитокиновым штормом патологических состояний является сепсис, патофизиология которого сложна и сопровождается внутрисосудистой коагуляцией, вызванной иммунным ответом хозяина (Behrens, E. M., 2017). В норме, это так называемая иммунокоагуляция, является частью врожденного иммунитета и может служить первой линией защиты от инфекции. Кроме того, доклиническими и клиническими исследованиями подтверждена патологическая роль инициатора внешнего пути - тканевого фактора в возникновении эндотоксемии (Pawlinski, R., 2004; Wu, C., 2019).

Известно, что экзогенный липополисахарид через TLR4 - Toll-like receptor 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 ЛПС. В результате выявлено, что соединение HC-NAR-0273b по сравнению с антитромбиновой активностью на интактных животных проявляет более выраженное действие в условиях гиперцитокинемии, что свидетельствует о возможном подавлении прокоагулянтных путей, вызванных воспалением.

Метод тромбоэластографии широко используется в экспериментальной и клинической медицине, так как позволяет оценить все звенья гемостаза (Burton A.G., 2020). В результате проведенных исследований было показано, что соединение HC-NAR-0273b на животных с системной воспалительной реакцией

изменяет параметры тромбоэластограммы в сторону гипокоагуляции более выражено, чем в опытах на интактных крысах. Также на модели ЛПС-индуцированного тромбоза легких соединение НС-NAR-0273b увеличивало выживаемость мышей, превосходя препарат сравнения в 1,3 раза.

Исходя из полученных результатов, 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, в условиях вирусных и бактериальных инфекций.

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.

Таким образом, в ряду производных триазолопиримидинов в результате экспериментального скрининга было выявлено соединение НС-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтную активность, связанную с ингибированием тромбина (IIa фактор). При этом антикоагулянтное действие данного вещества усиливается в условиях системной воспалительной реакции. Данный факт свидетельствует о влиянии соединения НС-NAR-0273b 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]триазина.
2. В результате экспериментального скрининга среди 42 производных триазоло[1,5-*a*]пиримидина и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина 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 тромбоемболии 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 НС-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 Па 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 0,01-1000 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).

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГГ – антигемофильный глобулин (VIII фактор свертывания крови)

ЛПС – липополисахарид

НОАК – новые оральные антикоагулянты

ПТВ – протромбиновое время

ТВ – тромбиновое время

ТЭГ – тромбоэластограмма

ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

УТИ – условный терапевтический индекс

ФП – фибрилляции предсердий

ЧДД – частота дыхательных движений

АТ – антитромбин III

СС₅₀ – средний показатель цитостатического эффекта (выживаемости клеток)

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

ЕРС – эндотелиальный протеин С

ЕРСR – рецептор эндотелиального протеина С

FII – протромбин

FIIa – тромбин (активированный фактор II)

FIV – кофактор, ионы кальция

FIX – профермент, фактор Кристмасса; антигемофильный фактор В

FV – кофактор, проакцелерин

FVIIa – активированный фактор VII

FIXa – активированный фактор X (протромбиназа)

FXI – гликопротеин, плазменный предшественник тромбопластина

FXIIa – фактор Хагемана, контактный фактор (активированный фактор XII)

GTT – глобальный тест на тромбоз

F XIII – фибринстабилизирующий фактор (фибриназа)

IC₅₀ – ингибирующая концентрация, в которой вещество блокирует процессы коагуляции на 50%

Ind – интегральный индекс воздействия признака на выраженную активность

Ind_h – индекс воздействия признака на отсутствие или наличие высокой активности

LD₅₀ – средняя доза, вызывающая гибель половины животных испытываемой группы

PCT-фактор – плазменный компонент тромбопластина (фактор Кристмасса; IX фактор свертывания крови)

PAR-1 – протеазо-активированные рецепторы 1 типа

PGI₂ – простаглицлин

pH – водородный показатель

pNA – отщепление паранитроанилина

pooled PPP – пульная бедная тромбоцитами плазма

PTA-фактор – плазменный предшественник тромбопластина (XI фактор свертывания крови)

TF – тканевой фактор (FIII – фактор свертывания крови III)

TFI – ингибитор тканевого фактора

TFPI – ингибитор пути тканевого фактора

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза // - М.: Ньюдиамед. 2008. - С. 292.
2. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим. фарм. журнал. - №3. 2003. - С. 32-34.
3. Бокарев И.Н. Антикоагулянты сегодня// Клиническая медицина. 2016. - 94(1). - С. 5-9.
4. Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Сокольская М.А. Венозный тромбоз эмболизм - современные аспекты этиологии, патогенеза, диагностики и лечения // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2009. - 10(6). - С. 11-20.
5. Буреш Я. и др. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения // - М.: Высшая школа. 1991. - С. 399.
6. Ройтман Е., Мумладзе Р.Б., Белоусов Д. и др. Клинико-экономический анализ профилактики послеоперационных венозных тромбоз эмболических осложнений. Качественная клиническая практика. 2018. - (1). - С. 51-63.
7. Васильев П.М., Спасов А.А., Ленская К.В., Анисимова В.А. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных циклических гуанидинов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2014. – № 3(51). – С. 28-30.
8. Воробьева Н.А., Елизаров М.В., Аверьянова А.В., Путанов М.А., Шемякина Н.Я. Периоперационное ведение пациента с наследственным дефицитом фактора свертывания крови XII при кардиохирургической операции (клинический случай) // Анестезиология и реаниматология. 2019. №3. 2019. - С. 97-104. doi:10.17116/anaesthesiology201903197.
9. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Перспективы поиска новых анксиолитиков // Эксперим. и клинич. фармакология. 2002. - Т. 65. - №5. - С. 4- 17.

10. Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. Биометрия: Учеб. пособие/ Под ред. М.М. Тихомировой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. - С. 264.
11. Голендер В.Е., Розенблит А.Б. Вычислительные методы конструирования лекарств // Рига: Зинатне. 1978. - С. 232.
12. Касьяненко К.В., Козлов К.В., Мальцев О.В., Лапиков И.И., Гордиенко В.В. и др. Оценка эффективности Риамиловира в комплексной терапии больных COVID-19// Терапевтический архив. 2021. - 93 (3). - С. 290–294.
13. Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А., Гайдукова К.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А., и др. Антиагрегантная активность нового трициклического производного 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. - Т. 79. - №5. - С. 29-32.
14. Лагута П.С. Венозные тромбозы: современное лечение // Атеротромбоз. 2015. - №2. - С. 7-16.
15. Литвицкий П.Ф. Патология системы гемостаза // Вопросы современной педиатрии. 2014. - 13(2). - С. 65-76.
16. Лобастов К.В., Дементьева Г.И., Лаберко Л.А. Современные представления об этиологии и патогенезе венозного тромбоза: переосмысление триады Вирхова // Флебология. 2019. - 13(3). - С. 227-235.
17. Люсов В., Белоусов Ю. Метод графической регистрации агрегации тромбоцитов и изменение ее при ишемической болезни сердца // Лабораторное дело. 1971. - №8. - С. 459-461.
18. Мазур Б.С. Тромбоэмболия легочной артерии. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2012. С. 40.
19. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М. и др. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз // В книге: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. - Москва: Гриф и К. 2012. - С. 453-479.

20. Миронов А., Бунатян Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // М: Гриф и К. 2012. – С. 80-93.
21. Насонов Е.Л., Бекетова Т.В., Решетняк Т.М., Лиля А.М., Ананьева Л.П. и др. Коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19) и иммуновоспалительные ревматические заболевания: на перекрестке проблем тромбовоспаления и аутоиммунитета // Научно-практическая ревматология. 2020. - 58(4). – С. 353–367.
22. Петров В.И., Шаталова О.В., Маслаков А.С., Горбатенко В.С. Анализ фармакотерапии тромбоза глубоких вен нижних конечностей (фармакоэпидемиологическое исследование) // Флебология. 2014. - 8(3). - С. 32-37.
23. Протасевич П.П., Спас В.В., Киселевский Ю.В. Коагуляционные механизмы при сепсисе (особенности патогенеза и диагностики) // Журнал ГрГМУ. 2009. - №1. - С. 23-26.
24. Верткин А., Родюкова И., Прохорович Е. «Молчащая эпидемия»: тромбоэмболия легочной артерии в практике клинициста // МС. 2011. №5-6.
25. Сонин Д.Л., Петрищев Н.Н., Тюкавин А.И., Ивкин Д.Ю. Экспериментальные модели венозного тромбоза на мелких лабораторных животных // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2014. - 13(2). - С. 11-20.
26. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Майстренко Б.П. Антиагрегантная активность гипогликемических средств // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. - Т. 72. - №6. - С. 27-29.
27. Шелковникова Т.В., Тахчиди Х.П., Вавин Г.В., Шишлянникова Н.Ю. Венозные тромбоэмболические осложнения: случай из практики // Клиническая офтальмология. 2019. - 19(4). - С. 246-250.

28. Afzal A., Suhong L., Gage B.F., Schoen M.W., Carson K. et al. Splanchnic vein thrombosis predicts worse survival in patients with advanced pancreatic cancer // *Thromb Res.* 2020. - 185. - C. 125-131.
29. Ait-Daoud N., Hamby A.S., Sharma S., Blevins D. A Review of Alprazolam Use, Misuse, and Withdrawal. // *J. Addict. Med.* 2018. - 12(1). - C. 4-10.
30. Al-Horani R.A., Afosah D.K. Recent advances in the discovery and development of factor XI/XIa inhibitors // *Med. Res. Rev.* 2018. - 38(6) - C. 1974-2023.
31. Almalki A.S.A., Nazreen S., Malebari A.M., Ali N.M., Elhenawy A.A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 1,2,3-Triazole Tethered Thymol-1,3,4-Oxadiazole Derivatives as Anticancer and Antimicrobial Agents. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021. - 14(9). – C. 866.
32. Aouad M.R., Khan D.J.O., Said M.A., Al-Kaff N.S., Rezki N. et al. Novel 1,2,3-Triazole Derivatives as Potential Inhibitors against Covid-19 Main Protease: Synthesis, Characterization, Molecular Docking and DFT Studies. // *Chemistry Select.* 2021. - 6(14). - C. 3468-3486.
33. Asgari M.S., Mohammadi-Khanaposhtani M., Sharafi Z., Faramarzi M.A., Rastegar H. et al. Design and synthesis of 4,5-diphenyl-imidazol-1,2,3-triazole hybrids as new anti-diabetic agents: in vitro alpha-glucosidase inhibition, kinetic and docking studies // *Mol. Divers.* 2021. - 25(2). - C. 877-888.
34. Ashooriha M., Khoshneviszadeh M., Khoshneviszadeh M., Moradi S.E., Rafiei A. et al. 1,2,3-Triazole-based kojic acid analogs as potent tyrosinase inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation. // *Bioorg. Chem.* 2019. - 82. - C. 414-422.
35. Ataullakhanov F.I. Koltsova E.M., Balandina A.N., Serebriyskiy I.I., Vuimo T.A., et al. Classic and Global Hemostasis Testing in Pregnancy and during Pregnancy Complications // *Semin. Thromb. Hemost.* 2016. - Vol. 42. - №7. - C. 696–716.
36. Bansal Y., Silakari O. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. // *Bioorg Med Chem.* 2012. - 20(21). - C. 6208-6236.
37. Barr D., Epps Q.J. Direct oral anticoagulants: a review of common medication errors // *J Thromb. Thrombolysis.* 2019. - 47(1). - C. 146-154.

38. Behrens E.M., Koretzky G.A. Review: Cytokine Storm Syndrome: Looking Toward the Precision Medicine Era // *Arthritis & Rheumatology*. 2017. - 69(6). - C. 1135–1143.
39. Behrens, E.M., Koretzky, G.A. Review: Cytokine Storm Syndrome: Looking Toward the Precision Medicine Era // *Arthritis & Rheumatology*. 2017. - 69(6). - C. 1135–1143.
40. Belfeki N., Khanfir M.S., Said F., Houman M.H. Thrombophilia in systemic lupus erythematosus: A case-control study // *J Med Vasc*. 2018. – Dec. 43(6). - C. 347-353.
41. Bethke T., Mehl H., Meyer W., Schmitz W., Scholz H. et al. Effects of the triazolopyrimidine trapidil on force of contraction, beating frequency and phosphodiesterase I–IV activity in guinea-pig hearts // *Arzneimittelforschung*. 1991. - 41(5). - C. 461-468.
42. Beyer-Westendorf J. Direct Oral Anticoagulants in Atrial Fibrillation: Practical Considerations and Remaining Issues // *Hamostaseologie*. 2021. - 41(1). - C. 35-41.
43. Bickmann J.K., Baglin T., Meijers J.C.M., Renné T. Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk// *Curr. Opin. Hematol*. 2017. - 24(5). - C. 419-426.
44. Bozorov K., Zhao J., Aisa H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview // *Bioorg. Med. Chem*. 2019. - №27(16). - C. 3511–3531.
45. Bravo-Pérez C., Vicente V., Corral J. Management of antithrombin deficiency: an update for clinicians // *Expert Rev. Hematol*. 2019. - 12(6). - C. 397-405.
46. Burnett A.E., Mahan C.E., Vazquez S.R., Oertel L.B., Garcia D.A. et al. Guidance for the practical management of the direct oral anticoagulants (DOACs) in VTE treatment // *J. Thromb. Thrombolysis*. 2016. - 41(1). – C. 206-232.
47. Burton A.G., Jandrey K.E. Use of Thromboelastography in Clinical Practice // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract*. 2020. - 50(6). – C. 1397-1409.

48. Byon W., Garonzik S., Boyd R.A., Frost C.E. Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review // *Clin. Pharmacokinet.* 2019. - 58(10). - C. 1265-1279.
49. Carstairs K.C. The identification of platelets and platelet antigens in histological sections // *J.Pathol. Bacteriol.* 1965. - 90(01). – C. 225–231.
50. Cervantes C.E., Merino J.L., Barrios V. Edoxaban for the prevention of stroke in patients with atrial fibrillation // *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2019. - 17(4). - C. 319-330.
51. Cohen O., Caiano L.M., Tufano A., Ageno W. Cancer-Associated Splanchnic Vein Thrombosis.//*Semin. Thromb. Hemost.* 2021. - 47(8). - C. 931-941.
52. Coutinho J.M. Cerebral venous thrombosis // *J. Thromb. Haemost.* 2015. - 13(1). - C. 238-244.
53. Cuker A., Siegal D.M., Crowther M.A., Garcia D.A. Laboratory measurement of the anticoagulant activity of the non-vitamin K oral anticoagulants // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. - 64(11). - C. 1128-1139.
54. Dadashpour S., Küçükılınç T.T., Ercan A., Hosseinimehr S.J., Naderi N. et al. Synthesis and Anticancer Activity of Benzimidazole/Benzoxazole Substituted Triazolotriazines in Hepatocellular Carcinoma // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2019. - 19(17). - C. 2120-2129.
55. Dhillon S. Ticagrelor: a review of its use in adults with acute coronary syndromes // *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2015. - 15(1). - C. 51-68.
56. Di Minno A., Frigerio B., Spadarella G., Ravani A., Sansaro D. et al. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions // *Blood Rev.* 2017. - 31(4). - C. 193-203.
57. Eitzman D.T., Bodary P.F., Shen Y., Khairallah C.G., Wild S.R. et al. Fabry disease in mice is associated with age-dependent susceptibility to vascular thrombosis // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003. - 14(2). - C. 298-302.

58. El-Gendy M.M., Shaaban M., Shaaban K.A., El-Bondkly A.M., Laatsch H. Essramycin: a first triazolopyrimidine antibiotic isolated from nature // *J. Antibiot.* (Tokyo). 2008. - 61(3). - C. 149-157.
59. Ellery P.E., Adams M.J. Tissue factor pathway inhibitor: then and now // *Semin. Thromb. Hemost.* 2014. - 40(8). - C. 881-886.
60. Fajgenbaum, D. C., June, C. H. Cytokine Storm // *New England Journal of Medicine.* 2020. - 383(23). - C. 2255–2273.
61. Felicetti T., Pismataro M.C., Cecchetti V., Tabarrini O., Massari S. Triazolopyrimidine Nuclei: Privileged Scaffolds for Developing Antiviral Agents with a Proper Pharmacokinetic Profile // *Curr. Med. Chem.* 2022. - 29(8). - C. 1379-1407.
62. Franco Moreno A.I., Martín Díaz R.M., García Navarro M.J. Direct oral anticoagulants: An update // *Med. Clin. (Barc).* 2018. - 151(5). - C. 198-206.
63. Gajanan Khanage S., Raju A., Baban Mohite P., Bhanudas Pandhare R. Analgesic activity of some 1,2,4-triazole heterocycles clubbed with pyrazole, tetrazole, isoxazole and pyrimidine // *Adv. Pharm. Bull.* 2013. - 3(1). - C. 13-18.
64. Garcia-Ferrer I., Marrero A., Gomis-Rüth F.X., Goulas T. Alpha(2)-Macroglobulins: Structure and Function // *Subcell Biochem.* 2017. - 83. - C. 149-183.
65. Gialeraki A., Valsami S., Pittaras T., Panayiotakopoulos G., Politou M. Oral Contraceptives and HRT Risk of Thrombosis // *Clinical and applied thrombosis and hemostasis.* 2018. - 24(2). - C. 217-225.
66. Goldhaber S.Z. Venous Thromboembolism in Heart Failure Patients: Pathophysiology, Predictability, Prevention // *Journal of the American College of Cardiology.* 2020. - 75(2). - C. 159-162.
67. Grigolo T.A., Braga C.B., Ornelas C., Russowsky D., Ferreira-Silva G.A. et al. Hybrids of 4-hydroxy derivatives of goniothalamine and piplartine bearing a diester or a 1,2,3-triazole linker as antiproliferative agents // *Bioorg. Chem.* 2021. – C. 116.

68. Guerrini M., Bisio A. Low-molecular-weight heparins: differential characterization/physical characterization // *Handb Exp. Pharmacol.* 2012. - (207). - C. 127-157.
69. Guo D., Xia L., Van Veldhoven J.P., Hazeu M., Mocking T. et al. Binding kinetics of ZM241385 derivatives at the human adenosine A2A receptor // *Chem. Med. Chem.* 2014. - 9(4). - C. 752-761.
70. Gurevich K.G., Urakov A.L., Rozit G.A., Klen E.É., Samorodov A.V. et al. Synthesis and Antiplatelet and Anticoagulant Activity of Thietane-Containing 2-(5-Bromo-2,4-Dihydro-3-Oxo-1,2,4-Triazolyl-4)Acetate Salts // *Pharm. Chem. J.* 2021. - 14. - C. 1-6.
71. Hackeng T.M., Maurissen L.F., Castoldi E., Rosing J. Regulation of TFPI function by protein S // *J. Thromb. Haemost.* 2009. - 7(1). – C. 165-168.
72. He S., Cao H., Thålin C., Svensson J., Blombäck M. et al. The Clotting Trigger is an Important Determinant for the Coagulation Pathway in vivo or in vitro-Inference from Data Review // *Semin. Thromb. Hemost.* 2021. - 47(1). - C. 63-73.
73. Hepner M., Karlaftis V. Protein C // *Methods Mol. Biol.* 2013. - 992. - C. 365-372.
74. Hethershaw E.L., Cilia La Corte A.L., Duval C., Ali M., Grant P.J. et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis // *Journal of thrombosis and haemostasis.* - 12(2). - C. 197–205.
75. Hillisch A., Gericke K.M., Allerheiligen S., Roehrig S., Schaefer M. et al. Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of a Neutral, Non-Prodrug Thrombin Inhibitor with Good Oral Pharmacokinetics // *J. Med. Chem.* 2020. - 63(21). - C. 12574-12594.
76. Hottz E.D., Azevedo-Quintanilha I.G., Palhinha L., Teixeira L., Barreto E.A. et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19 // *Blood.* 2020. - 136. - C. 1330-1341.
77. Hou C., Moffat K.A., Gangji A.S., Ning S. Circulating heparin-like anticoagulants: Case report and review of literature // *Transfusion.* 2021. - 61(3). - C. 968-973.

78. Irwin S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // *Psychosomatics*. 1964. – Vol. 5. - C. 174-179.
79. Ismail, Kuthati B., Thalari G., Bommarapu V., Mulakayala C. et al. Synthesis of novel spiro[pyrazolo[4,3-d]pyrimidinones and spiro[benzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine-2,3'-indoline]-2',4(3H)-diones and their evaluation for anticancer activity // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. - 27(6). - C. 1446-1450.
80. Ito T., Kakihana Y., Maruyama I. Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases // *Expert Opin. Ther. Targets*. 2016. - 20(2). - C. 151-158.
81. Jayne C.L., Andreani T., Chan T.Y., Chelliah M.V., Clasby M.C. et al. Discovery of hydroxy pyrimidine Factor IXa inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020. - 30(15). – C. 127.
82. Ji K., Zhou C., Wu L., Li W., Jia M. et al. Risk Factors for Severe Residual Headache in Cerebral Venous Thrombosis // *Stroke*. 2021. - 52(2). - C. 531-536.
83. Jorpes E. Heparin: A mukopolysaccharide and an active antithrombotic drug. In: A history of anticoagulants // New York: Grune and Statton. 1959. - C. 87-91.
84. Kafeza M., Shalhoub J., Salooja N., Bingham L., Spagou K. et al. A systematic review of clinical prediction scores for deep vein thrombosis. // *Phlebology*. 2017. - 32(8). - C. 516-531.
85. Kamboj V.K., Verma P.K., Dhanda A., Ranjan S. 1,2,4-triazole derivatives as potential scaffold for anticonvulsant activity // *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 2015. - 15(1). - C. 17-22.
86. Katneni U.K., Alexaki A., Hunt R.C., Schiller T., DiCuccio M. Coagulopathy and Thrombosis as a Result of Severe COVID-19 Infection: A Microvascular Focus // *Thromb Haemost.* 2020. - 120(12). - C. 1668-1679.
87. Kearon C., Akl E.A. Duration of anticoagulant therapy for deep vein thrombosis and pulmonary embolism // *Blood*. 2014. - 20. - 123(12). – C. 1794-1801.
88. Kelemen H., Ancu G., Papp L.A. Analytical methodologies for the determination of ticagrelor // *Biomed. Chromatogr.* 2019. - 33(7). – C. 4528.

89. Khalid W., Badshah A., Khan A.U., Nadeem H., Ahmed S. Synthesis, characterization, molecular docking evaluation, antiplatelet and anticoagulant actions of 1,2,4-triazole hydrazone and sulphonamide novel derivatives // *Chem. Cent. J.* 2018. - 12(1). – C. 11.
90. Khan B., Naiyer A., Athar F., Ali S., Thakur S.C. Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity evaluation of 1,2,4-triazole and its derivatives as a potential scaffold for the synthesis of drugs against prostaglandin-endoperoxide synthase // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021. - 39(2). - C. 457-475.
91. Khattab R.R., Hassan A.A., Osman D.A., Abdel-Megeid F.M., Awad H.M. et al. Synthesis, anticancer activity and molecular docking of new triazolo[4,5-d]pyrimidines based thienopyrimidine system and their derived N-glycosides and thioglycosides // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2021. - 40(11). - C. 1090-1113.
92. Kitano D., Yonezawa K., Iwae S., Sakakibara S. Internal jugular vein thrombosis and pulmonary thromboembolism after head and neck reconstructive surgery // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2021. - 74(6). - C. 1239-1245.
93. Klok F.A., Kruip M.J. H.A., Van der Meer N.J.M., Arbous M.S., Gommers D. et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: an updated analysis // *Thromb. Res.* 2020. - (191). - C. 148–150.
94. Koehl J.L., Hayes B.D., Al-Samkari H., Rosovsky R. A comprehensive evaluation of apixaban in the treatment of venous thromboembolism // *Expert Rev. Hematol.* 2020. - 13(2). - C. 155-173.
95. Konno S., Matsuya Y., Kumazawa M., Amano M., Kokubo T. et al. Studies on as-triazine derivatives. XIX. Synthesis of 2,3-diarylpyrazine 2,3-diarylpyridine derivatives as blood platelet aggregation inhibitors // *Yakugaku Zasshi.* 1993. - 113(1). - C. 40-52.
96. Korff M., Imberg L., Will J.M., Bückreiß N., Kalinina S.A. et al. Acylated 1H-1,2,4-Triazol-5-amines Targeting Human Coagulation Factor XIIa and Thrombin:

- Conventional and Microscale Synthesis, Anticoagulant Properties, and Mechanism of Action // *J. Med. Chem.* 2020. - 63(21). - C. 13159-13186.
97. Kubier A., O'Brien M. Endogenous anticoagulants // *Top Companion Anim. Med.* 2012. - 27(2). - C. 81-87.
98. Küçükgülzel Ş.G., Çıkla-Süzgün P. Recent advances bioactive 1,2,4-triazole-3-thiones // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. - 97. - C. 830-870.
99. Kumar S., Deep A., Narasimhan B. Pyrimidine derivatives as potential agents acting on central nervous system // *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 2015. - 15(1). - C. 5-10.
100. Kushwaha N., Sharma C.S. The Chemistry of Triazine Isomers: Structures, Reactions, Synthesis and Applications // *Mini Rev. Med. Chem.* 2020. - 20(20). - C. 2104-2122.
101. Lanthier L., Bécharde D., Viens D., Touchette M. Evaluation of thromboprophylaxis in patients hospitalized in a tertiary care center: an applicable model of clinical practice evaluation. Revision of 320 cases // *J. Mal. Vasc.* 2011. - 36(1). - C. 3-8.
102. Laporte S., Rosencher N., Girard P., Llau J. et al. Rivaroxaban or Enoxaparin in Nonmajor Orthopedic Surgery // *N. Engl. J. Med.* 2020. - 382(20). - C. 1916-1925.
103. Lee S.W.H. Warfarin and food, herbal or dietary supplement interactions: A systematic review // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2021. - (2). - C. 352-374.
104. Leite P.M., Martins M.A.P., Castilho R.O. Review on mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy // *Biomed. Pharmacother.* 2016. - 83. - C. 14-21.
105. Lentz S.R. Thrombosis in the setting of obesity or inflammatory bowel disease // *Blood.* 2016. - 128(20). - C. 2388-2394.
106. Li H., Liu L., Zhang D., Xu J., Dai H. et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses // *Lancet.* 2020. - (395). - C. 1517-1520.
107. Llitjos J.F., Leclerc M., Chochois C., Monsallier J.M., Ramakers M. et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients // *J. Thromb. Haemost.* 2020. - 18(7). - C. 1743-1746.

108. Low Y.S., Garcia M.D., Lonhienne T., Fraser J.A., Schenk G. et al. Triazolopyrimidine herbicides are potent inhibitors of *Aspergillus fumigatus* acetohydroxyacid synthase and potential antifungal drug leads // *Sci Rep.* 2021. - 11(1). – C. 21055.
109. Mahajan A., Brunson A., White R., Wun T. The Epidemiology of Cancer-Associated Venous Thromboembolism: An Update // *Semin Thromb Hemost.* 2019. - 45(4). - C. 321-325.
110. Makatsariya A., Bitsadze V., Khizroeva J., Makatsariya A., Bitsadze V. et al. Neonatal thrombosis // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 2022. - 35(6). – C. 1169-1177.
111. Marcinczyk N., Jarmoc D., Leszczynska A., Zakrzewska A. et al. Antithrombotic Potential of Tormentil Extract in Animal Models // *Front. Pharmacol.* 2017. - 15(8). – C. 534.
112. Marwaha A., White E.I., Mazouni F., Creason S.A., Kokkonda S. et al. Bioisosteric transformations and permutations in the triazolopyrimidine scaffold to identify the minimum pharmacophore required for inhibitory activity against *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase // *J. Med. Chem.* 2012. - 55(17). - C. 7425-7436.
113. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // *Lancet.* 2020. - 395(10229). - C. 1033-1034.
114. Microsoft Office: Официальный сайт компании Microsoft, Inc. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.office.com/> (дата обращения 15.05.2019).
115. Mirzaei R., Goodarzi P., Asadi M., Soltani A., Aljanabi H.A.A., et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2 // *IUBMB Life.* 2020. - 72(10). - C. 2097-2111.
116. Mitchell W.B. Thromboinflammation in COVID-19 acute lung injury // *Paediatric Respiratory Reviews.* 2020. - 35. - C. 20–24.;
117. Miyoshi R., Nishikawa S., Tamari S., Noguchi M., Hijiya K. et al. Asian Pulmonary vein thrombosis after lobectomy with vein stump closure by ligation // *Cardiovasc. Thorac. Ann.* 2018. - 26(7). - C. 546-551.

118. Mohammed I., Mohmand-Borkowski A., Burke J.F., Kowey P.R. // *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*. 2012. - 13(2). - C. 73-85.
119. Morische S.K., Kramer M.W., Merseburger A.S., Gieseler F., Cordes J. Rate of thrombosis and bleeding after urological surgery under standardized anticoagulation // *Urologe A*. 2020. - 59(1). - C. 40-51.
120. Morrow J.D. Fluconazole: a new triazole antifungal agent // *Am. J. Med. Sci.* 1991. - 302(2). – C. 129-132.
121. Muszbek L., Yee V.C., Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function // *Thromb. Res.* 1999. - 94. – C. 271–305.
122. Nettekoven M., Adam J.M., Bendels S., Bissantz C., Fingerle J. et al. Novel Triazolopyrimidine-Derived Cannabinoid Receptor 2 Agonists as Potential Treatment for Inflammatory Kidney Diseases // *Chem. Med. Chem.* 2016. -11(2). - C. 179-189.
123. Novichikhina N., Ilin I., Tashchilova A., Sulimov A., Kutov D. et al. Synthesis, Docking, and In Vitro Anticoagulant Activity Assay of Hybrid Derivatives of Pyrrolo[3,2,1-ij]Quinolin-2(1H)-one as New Inhibitors of Factor Xa and Factor XIa // *Molecules*. 2020. - 25(8). – C. 1889.
124. Onishi A., St Ange K., Dordick J.S., Linhardt R.J. Heparin and anticoagulation // *Front. Biosci (Landmark Ed)*. 2016. - 21(7). - C. 1372-1392.
125. Oto J., Fernández-Pardo A., Miralles M., Plana E., España F. et al. Activated protein C assays: A review // *Medina P. Clin. Chim. Acta*. 2020. - 502. - C. 227-232.
126. Otsui K., Gorog D.A., Yamamoto J., Yoshioka T., Iwata S. et al. Global Thrombosis Test – a possible monitoring system for the effects and safety of dabigatran // *Thrombosis Journal*. 2015. - C. 13-39.
127. Packham M.A., Livne A.A., Ruben D.H., Rand M.L. Activation of phospholipase C and protein kinase C has little involvement in ADP-induced primary aggregation of human platelets: effects of diacylglycerols, the diacylglycerols, the diacylglycerol

- kinase inhibitor R59022, staurosporine and okadaic acid // *Biochem. J.* 1993. - 290 (3). – C. 849-856.
128. Palta S., Saroa R., Palta A. Overview of the coagulation system // *Indian J. Anaesth.* 2014. - 58(5). - C. 515-523.
129. Pawlinski R., Pedersen B., Schabbauer G., Tencati M., Holscher T. et al. Role of tissue factor and protease activated receptors in a mouse model of endotoxemia // *Blood.* 2004. - 103. - C. 1342–1347.
130. Pendyal A., Chien C.V., Mudd J.O., Gelow J.M. Minimally Invasive LVAD Deactivation in a 65-Year-Old Man with Recurrent Pump Thrombosis and Left Ventricular Recovery // *Tex. Heart Inst. J.* 2017. - 44(1). – C. 70-72.
131. Peraramelli S., Thomassen S., Heinzmann A., Hackeng T.M., Hartmann R. et al. Role of exosite binding modulators in the inhibition of FXa by TFPI // *Thromb Haemost.* 2016. - 115(3). - C. 580-590.
132. PerkinElmer/Chemistry: Официальный сайт компании PerkinElmer, Inc. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.cambridgesoft.com/>.
133. Henke P.K., Varma M.R., Moaveni D.K., Dewyer N.A., Moore A.J. et al. Fibrotic injury after inperimental deep vein thrombosis determined by the mechanism of thrombogenesis // *Thromb. Haemost.* 2007. - 98. - C. 1045–1055.
134. Pishko A.M., Cuker A. Heparin-induced thrombocytopenia and cardiovascular surgery // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program.* 2021. - (1). - C. 536-544.
135. Polyantsev A.A., Mozgovoy P.V., Frolov D.V., Linchenko A.M., Shchelokova Y.V. et al. Pathogenesis and prevention of venous and arterial thromboembolic events in patients after deep vein thrombosis of lower extremities // *Khirurgiia (Mosk).* 2018. - (1). - C. 33-40.
136. Poonia N., Kumar A., Kumar V., Yadav M., Lal K. Recent Progress in 1H-1,2,3-triazoles as Potential Antifungal Agents // *Current topics in medicinal chemistry.* 2021. - 21(23). - C. 2109-2133.

137. Poulakos M., Walker J.N., Baig U., & David T. Edoxaban: A direct oral anticoagulant. *American journal of health-system pharmacy: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2017. - 74(3). - C. 117-129.
138. Proietti M., Romanazzi I., Romiti G.F., Farcomeni A., Lip G.Y.H. Real-World Use of Apixaban for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Stroke*. 2018. - 49(1). - C. 98-106.
139. Quan M.L., Ellis C.D., Liauw A.Y., Alexander R.S., Knabb R.M. et al. Design and synthesis of isoxazoline derivatives as factor Xa inhibitors. // *Journal of medicinal chemistry*. 1999. - 42(15). - P. 2760-2773.
140. Quan M.L., Wexler R.R. The design and synthesis of noncovalent factor Xa inhibitors // *Current topics in medicinal chemistry*. 2001. - 1(2). - C. 137-149.
141. QunFu H., Yang T., Xiao W., Fan L., Wu Y. et al. Prolonged Neuroinflammation after Lipopolysaccharide Exposure in Aged Rats // *PLoS One*. 2014. - 9(8). - C. 106.
142. Raboisson P., Baurand A., Cazenave J.P., Gachet C., Schultz D. et al. A general approach toward the synthesis of C-nucleoside pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazines and their 3',5'-bisphosphate C-nucleotide analogues as the first reported in vivo stable P2Y(1)-receptor antagonists // *The Journal of organic chemistry*. 2002. - 67(23). - C. 8063-8071.
143. Raymond J., Imbert L., Cousin T., Duflot T., Varin R. et al. Pharmacogenetics of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review // *J. Pers. Med*. 2021. - 11(1). - C. 37.
144. Renon F., Rago A., Liccardo B., D'Andrea A., Riegler L. et al. Direct Oral Anticoagulants Plasma Levels Measurement: Clinical Usefulness from Trials and Real-World Data // *Semin. Thromb. Hemost*. 2021. - 47(2). - C. 150-160.
145. Renyu Q., Yuchao L., Kandegama W.M., Qiong C., Guangfu Y. Recent Applications of Triazolopyrimidine-Based Bioactive Compounds in Medicinal and Agrochemical Chemistry // *Mini Rev. Med. Chem*. 2018. - 18(9). - C. 781-793.
146. Roehrig S., Straub A., Pohlmann J., Lampe T., Pernerstorfer J. et al. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-

- oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor // *Journal of medicinal chemistry*. 2005. - 48(19). – C. 5900–5908.
147. Rottenstreich A., Gershgoren H., Spectre G., Da'as N., Bentur O.S. et al. Factors associated with pregnancy outcomes in women with a history of cerebral sinus venous thrombosis // *J. Thromb. Thrombolysis*. 2020. - 50(1). - C. 151-156.
148. Rettger C., Madlener K., Heil M., Gerriets T., Walberer M., et al. Is heparin treatment the optimal management for cerebral venous thrombosis? Effect of abciximab, recombinant tissue plasminogen activator, and enoxaparin in experimentally induced superior sagittal sinus thrombosis // *Stroke*. 2005. – Apr. - 36(4). – C. 841-846.
149. Rudd K.E., Johnson S.C., Agesa K.M., Shackelford K.A., Tsoi D., et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study // *Lancet (London, England)*. 2020. - 395(10219). - C. 200–211.
150. Ruiz-Tovar J., Priego P. Portal Vein Thrombosis After Splenic and Pancreatic Surgery // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2017. - 906. - C. 241-251.
151. Said S.A., Amr Ael-G., Sabry N.M., Abdalla M.M. Analgesic, anticonvulsant and anti-inflammatory activities of some synthesized benzodiazepine, triazolopyrimidine and bis-imide derivatives // *European journal of medicinal chemistry*. 2009. -44(12). - C. 4787-4792.
152. Sang Y., Roest M., de Laat B., de Groot P.G., Huskens D. Interplay between platelets and coagulation // *Blood Rev*. 2021. – 46. – C. 733.
153. Santana-Romo F., Lagos C.F., Duarte Y., Castillo F., Moglie Y. et al. Innovative Three-Step Microwave-Promoted Synthesis of N-Propargyltetrahydroquinoline and 1,2,3-Triazole Derivatives as a Potential Factor Xa (FXa) Inhibitors: Drug Design, Synthesis, and Biological Evaluation // *Molecules*. 2020. - 25(3). – C. 491.
154. Santos M.E. Hormone replacement therapy and venous disease // *Acta Chir. Belg*. 2006. - 106(6). - C. 659-661.

155. Savateev K.V., Fedotov V.V., Rusinov V.L., Kotovskaya S.K., Spasov A.A. et al. Azolo[1,5-*a*]pyrimidines and Their Condensed Analogs with Anticoagulant Activity // *Molecules*. 2022. - № 27(1). - C. 274.
156. Schwann T.A., Kistler L., Engoren M.C., Habib R.H. Incidence and predictors of postoperative deep vein thrombosis in cardiac surgery in the era of aggressive thromboprophylaxis // *Ann Thorac. Surg*. 2010. - 90(3). - C. 760-766.
157. Scott L.J. Rivaroxaban: A Review for Secondary CV Prevention in CAD and PAD // *Drugs*. 2020. - 80(14). - C. 1465-1475.
158. Shah D.R., Modh R.P., Chikhalia K.H. Privileged s-triazines: structure and pharmacological applications // *Future Med. Chem*. 2014. - 6(4). - C. 463-477.
159. Shahzad K., Kohli S., Al-Dabet M.M., Isermann B. Cell biology of activated protein C // *Curr. Opin. Hematol*. 2019. - 26(1). - C. 41-50.
160. Shetty P., Praveen B.M., Raghavendra M., Manjunath K., Cheruku S. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel 4-amino-6-(1,3,4-oxadiazolo/1,3,4-thiadiazolo)-pyrimidine derivatives // *Mol. Divers*. 2016. - 20(2). - C. 391-398.
161. Signorelli S.S., Scuto S., Marino E., Giusti M., Xourafa A. et al. Anticoagulants and Osteoporosis // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. - 20(21). – C. 5275.
162. Simurova N.V., Maiboroda O.I. Antiviral activity of 1,2,4-triazole derivatives (microreview) // *Chem. Heterocycl. Compd. (N Y)*. 2021. - 57(4). - C. 420-422.
163. Srivastava K., Patel N., Tabbara M., Liew A., Zaghloul I. et al. Thromboembolism, Bleeding, and Mortality Incidence of Direct Oral Anticoagulants Versus Warfarin Postbariatric Surgery // *Am. J. Med*. 2021. - 134(11). – C. 1403-1412.
164. Stampfuss J., Kubitza D., Becka M., Mueck W. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther*. 2013. - 51(7). - C. 549-561.
165. Stangier J., Stahle H., Rathgen K. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor, are not affected by moderate hepatic impairment // *J. Clin. Pharmacol*. 2008. - 48. - C. 1411–1419.

166. Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate // *Clin. Pharmacokinet.* 2008. - 47. –С. 285–295.
167. Stanifer J.W., Pokorney S.D., Chertow G.M., Hohnloser S.H., Wojdyla D.M. et al. Apixaban Versus Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation and Advanced Chronic Kidney Disease // *Circulation.* 2020. - 141(17). - С. 1384-1392.
168. Statistica: Официальный сайт компании [Электронный ресурс]. URL: <http://statistica.io/> (дата обращения 23.05.2020).
169. Struble E., Fadiran E., Soule L. Thrombosis during pregnancy: Risks, prevention, and treatment for mother and fetus // *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 2015. - 105(3). – С. 157-158.
170. Sylvester K.W., Connors J.M. Betrixaban in the prevention of venous thromboembolism in medically ill patients // *Future Cardiol.* 2018. - 14(6). - С. 455-470.
171. Taher A.T., Cappellini M.D., Bou-Fakhredin R., Coriu D., Musallam K.M. Hypercoagulability and Vascular Disease // *Hematology/oncology clinics of North America.* 2018. - 32(2). - С. 237-245.
172. Tamboli R.S., Giridha R., Gandhi H.P., Kanhed A.M., Mande H.M., et al. Design, green synthesis and pharmacological evaluation of novel 5,6-diaryl-1,2,4-triazines bearing 3-morpholinoethylamine moiety as potential antithrombotic agents // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2016. - 31(5). - С. 704-713.
173. Tan Z., Deng J., Ye Q., Zhang Z. Triazole-containing hybrids with anti-Myco bacterium tuberculosis potential - Part I: 1,2,3-Triazole // *Future Med. Chem.* 2021. - 13(7). - С. 643-662.
174. Tarasov D.N., Tovbin D.G., Malakhov D.V., Aybush A.V., Tserkovnikova N.A. et al. The Development of New Factor Xa Inhibitors Based on Amide Synthesis // *Curr Drug Discov. Technol.* 2018. - 15(4). - С. 335-350.
175. Tiwari A., Lester W., Tang T.Y. Varicose Veins and Deep Venous Thrombosis // *JAMA.* 2018. - 320(5). - С. 509-510.

176. Trutyak R.I. Anticoagulant therapy in patients, suffering idiopathic deep veins thrombosis // *Klin Khir.* 2016. - (10). - C. 48-50.
177. Turpie A.G., Bauer K.A., Davidson B.L., Fisher W.D., Gent M. et al. A randomized evaluation of betrixaban, an oral factor Xa inhibitor, for prevention of thromboembolic events after total knee replacement (EXPERT) // *Thrombosis and haemostasis.* 2009. - 101(1). - C. 68–76.
178. Udayachalerm S., Rattanasiri S., Angkananard T., Attia J., Sansanayudh N. et al. The Reversal of Bleeding Caused by New Oral Anticoagulants (NOACs): A Systematic Review and Meta-Analysis // *Clinical and applied thrombosis and hemostasis.* 2018. – 24(9). - C. 117-126.
179. Ueno H., Yokota K., Hoshi J., Yasue K., Hayashi M. et al. Synthesis and structure-activity relationships of novel selective factor Xa inhibitors with a tetrahydroisoquinoline ring // *Journal of medicinal chemistry.* 2005. - May. 19. - 48(10). - C. 3586-3604.
180. Umar T., Gusain S., Raza M.K., Shalini S., Kumar J. et al. Naphthalene-triazolopyrimidine hybrid compounds as potential multifunctional anti-Alzheimer's agents. // *Bioorg. Med. Chem.* 2019. - 27(14). - C. 3156-3166.
181. Van Adrichem R.A., Debeij J., Nelissen R.G., Schipper I.B., Rosendaal F.R., et al. Below-knee cast immobilization and the risk of venous thrombosis: results from a large population-based case-control study // *Journal of thrombosis and haemostasis.* 2014. - 12(9). – C. 1461–1469.
182. Varala R., Bollikolla H.B., Kurmarayuni C.M. Synthesis of Pharmacological Relevant 1,2,3-Triazole and Its Analogues-A Review // *Curr. Org. Synth.* 2021. - 18(2). - C. 101-124.
183. Varnes J.G., Wacker D.A., Jacobson I.C., Quan M.L., Ellis C.D. et al. Design, structure-activity relationship, and pharmacokinetic profile of pyrazole-based indoline factor Xa inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 2007. - 17(23). - C. 6481-6488.

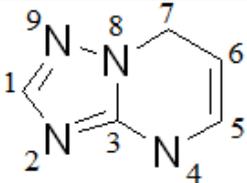
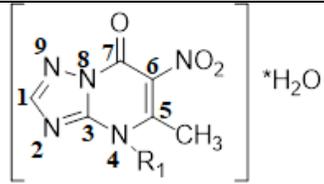
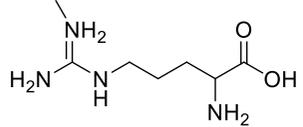
184. Verma T., Sinha M., Bansal N. Heterocyclic Compounds Bearing Triazine Scaffold and Their Biological Significance: A Review // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2020. - 20(1). - C. 4-28.
185. Wang W., Yuan J., Fu X., Meng F., Zhang S. et al. Novel Anthranilamide-Based FXa Inhibitors: Drug Design, Synthesis and Biological Evaluation // *Molecules* (Basel, Switzerland). 2016. - Apr. 14. - 21(4). - C. 491.
186. Wang Y., Sun X., Yang D., Guo Z., Fan X. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship of novel and effective apixaban derivatives as FXa inhibitors containing 1,2,4-triazole/pyrrole derivatives as P2 binding element // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. - 24(21). - C. 5646-5661.
187. Weiler H., Isermann B.H. Thrombomodulin // *J Thromb. Haemost.* 2003. - 1(7). - C. 1515-1524.
188. Wen X., Zhou Y., Zeng J., Liu X. Recent Development of 1,2,4-triazole-containing Compounds as Anticancer Agents // *Current topics in medicinal chemistry.* 2020. - 20(16). - C. 1441-1460.
189. Witt D.M., Clark N.P., Kaatz S., Schnurr T., Ansell J.E. Guidance for the practical management of warfarin therapy in the treatment of venous thromboembolism // *Journal of thrombosis and thrombolysis.* 2016. - Jan. - 41(1). - C. 187-205.
190. Wong J.P., Viswanathan, S., Wang, M., Sun, L.Q., Clark, G.C. et al. Current and future developments in the treatment of virus-induced hypercytokinemia // *Future Medicinal Chemistry.* 2017. -9(2). - C. 169–178.
191. Wu C., Lu W., Zhang Y., Zhang G., Shi X. et al. Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis // *Immunity.* 2019. - 50. - C. 1401–1411.
192. Yamamoto J., Inoue N., Otsui K., Ishii H., Gorog D.A. Global Thrombosis Test (GTT) can detect major determinants of haemostasis including platelet reactivity, endogenous fibrinolytic and thrombin generating potential // *Thromb. Res.* 2014. - 133(5). - C. 919-926.

193. Yamamoto J., Yamashita T., Ikarugi H., Taka T., Hashimoto M. et al. Görög Thrombosis Test: a global in-vitro test of platelet function and thrombolysis // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2003. - 14(1). - C. 31–39.
194. Yang G., Su G., Ren Y., Chen Y. Synthesis of 3,4-diaminobenzoyl derivatives as factor Xa inhibitors // *J. Med. Chem.* 2015. – 101. – C. 41-51.
195. Yang, H., Ren Y., Gao X. Gao Y. Synthesis and anticoagulant bioactivity evaluation of 1,2,5-trisubstituted benzimidazole fluorinated derivatives // *Chem. Res. Chin. Univ.* 2016. - 32. - C. 973–978.
196. Yang, X., Cheng X., Tang Y., Qiu X., Wang Y et al. Bacterial endotoxin activates the coagulation cascade through gasdermin D-dependent phosphatidylserine exposure // *Immunity*. 2019. -51. - C. 983–996.
197. Young, R.J., Borthwick A.D., Brown, D., Burns-Kurtis, C.L. et al. Structure and property based design of factor Xa inhibitors: Pyrrolidin-2-ones with biaryl P4 motifs // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. - 18. - C. 23–27.
198. Zervou M.I., Goulielmos G.N. Comment on: The risk and trend of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in rheumatoid arthritis: a general population-based study // *Rheumatology (Oxford)*. 2021. - 60(7). - C. 266-267.
199. Zhang B. Comprehensive review on the anti-bacterial activity of 1,2,3-triazole hybrids // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. - 168. - C. 357-372.
200. Zhang J., Wang S., Ba Y., Xu Z. 1,2,4-Triazole-quinoline/quinolone hybrids as potential anti-bacterial agents // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. - 174. - C. 1-8.
201. Zhang, H., Zeng L., Xie M., Liu J., Zhou B. et al. TMEM173 drives lethal coagulation in sepsis // *Cell host & microbe*. 2020. - vol. 27,4. - C. 556–570.
202. Zhou J., May L., Liao P., Gross P.L., Weitz J.I. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009. – №29. – C. 863-869.
203. Zhou L., Ismaili J., Stordeur P., Thielemans K., Goldman M. et al. Inhibition of the CD40 pathway of monocyte activation by triazolopyrimidine // *Clin. Immunol.* 1999. - 93(3). - C. 232-238.

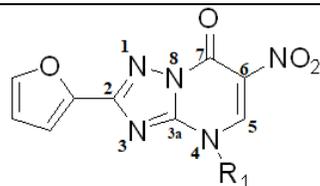
204. Zuniga E.S., Korkegian A., Mullen S., Hembre E.J., Ornstein P.L. et al. The synthesis and evaluation of triazolopyrimidines as anti-tubercular agent // *Bioorg. Med. Chem.* 2017. - 25(15). - C. 3922-3946.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 - Зависимость антикоагулянтной активности от химической структуры новых конденсированных производных триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов

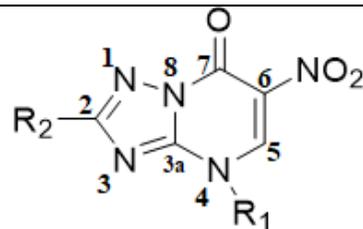
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---------------------------|---|----------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------------------------|--|
| № п/п | Тестируемые соединения | Структура заместителя | | | | Солевой остаток | Антикоагулянтная активность (M±m) | |
| | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | | ТВ, с | ТВ _{опыт} /ТВ _{контроль} |
| I. Триазоло[1,5-<i>a</i>]пиримидины: | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 5-метил-6-нитро-7-оксо-7 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-4-ид | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | |
| 1. | TD - Триазид |  | - | - | - | - | 37,9 ± 1,1* | 3,2 |
| | | L-Аргинин | - | - | - | | | |

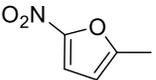
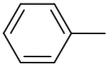
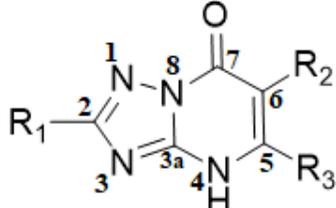
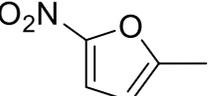
2-(фуран-2-ил)- 6-нитро-7-оксо-7H-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-4-ид

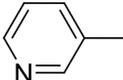
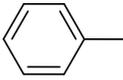
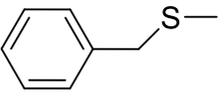
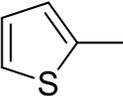
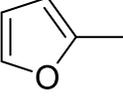
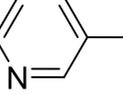


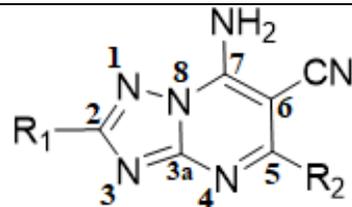
| | | | | | | | | |
|----|-----------|-----------------|---|---|---|---|---------------|------|
| 2. | FV-174/Na | Na | - | - | - | - | 146,7 ± 5,2*# | 12,5 |
| | | натрий | - | - | - | | | |
| 3. | KC-1304 | NH ₄ | - | - | - | - | 31,7 ± 1,8* | 2,7 |
| | | аммоний | - | - | - | | | |
| 4. | KC-1317 | | - | - | - | - | 34,8 ± 1,4* | 3,0 |
| | | морфолин-4-ий | - | - | - | | | |
| 5. | KC-SH4 | | - | - | - | - | 34,8 ± 1,8* | 3,0 |
| | | L-Аргинин | - | - | - | | | |

6-нитро-2-метил-7-оксо-7H-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-4-ид

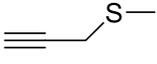
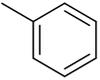
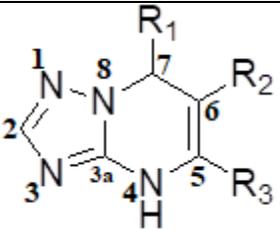
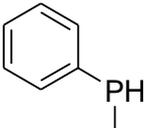
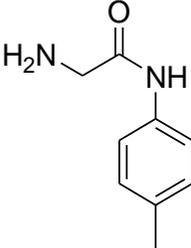
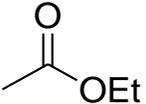


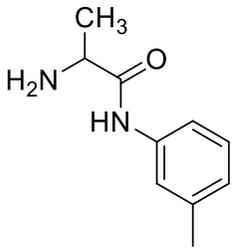
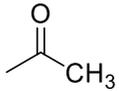
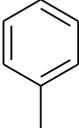
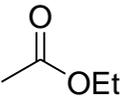
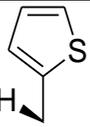
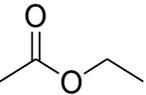
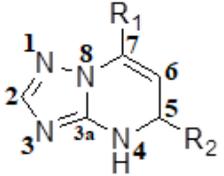
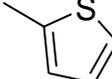
| | | | | | | | | | |
|--|---------|---|--|---|---|---|----------------|------|--|
| 6. | КС-984 |  |  | - | - | - | 97.9 ± 9.1*# | 8,4 | |
| | | пиридин-1-иний | 5-нитрофуран-2-ил | - | - | - | | | |
| 7. | КС-1183 |  |  | - | - | - | 31,0 ± 1,3* | 2,7 | |
| | | пиридин-1-иний | тиофен-2-ил | - | - | - | | | |
| 8. | КС-955 |  |  | - | - | - | 29.1 ± 1,3* | 2,5 | |
| | | пиридин-1-иний | фенил | - | - | - | | | |
| 2,5,6-триметил-7-оксо-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин | | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | | |
| 9. | КС-786 | EtOOC— | —COOEt | - | - | - | 108.7 ± 8,2*# | 9,3 | |
| | | этоксикарбонил | этоксикарбонил | - | - | - | | | |
| 10. | КС-G |  |  |  | - | - | 134,8 ± 10,4*# | 11,5 | |
| | | 5-нитрофуран-2-ил | нитро | метил | - | - | | | |

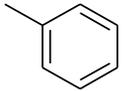
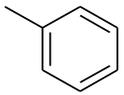
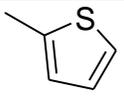
| | | | | | | | | |
|-----|---------|---|--|---|---|---|------------------|-----|
| 11. | КС-956 |  |  | - | - | - | $33,7 \pm 2,1^*$ | 2,9 |
| | | пиридин-3-ил | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 12. | КС-960 |  |  | - | - | - | $37,9 \pm 1,5^*$ | 3,2 |
| | | фенил | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 13. | КС-965 |  |  | - | - | - | $29,1 \pm 1,6^*$ | 2,5 |
| | | бензилтио | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 14. | КС-986 |  |  | - | - | - | $28,4 \pm 1,1^*$ | 2,4 |
| | | тиофен-2-ил | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 15. | КС-1301 |  |  | - | - | - | $30,3 \pm 1,9^*$ | 2,6 |
| | | фуран-2-ил | этоксикарбонил | - | - | - | | |
| 16. | КС-1318 |  |  | - | - | - | $30,1 \pm 2,5^*$ | 2,6 |
| | | пиридин-3-ил | нитро | - | - | - | | |

7-амино-2,5-диметил-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбонитрил

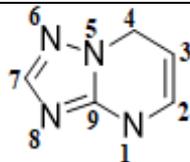
| | | | | | | | | |
|-----|-------|-------------|----------------|---|---|---|-------------|-----|
| 17. | B-270 | | | - | - | - | 36,2 ± 1,6* | 3,1 |
| | | фуран-2-ил | фенил | - | - | - | | |
| 18. | B-286 | | | - | - | - | 29,0 ± 2,7* | 2,5 |
| | | тиофен-2-ил | 4-метоксифенил | - | - | - | | |
| 19. | B-349 | | | - | - | - | 36,7 ± 1,5* | 3,1 |
| | | тиофен-2-ил | фенил | - | - | - | | |
| 20. | BS-3 | | | - | - | - | 31,7 ± 2,3* | 2,7 |
| | | фуран-2-ил | 4-метоксифенил | - | - | - | | |
| 21. | B309 | | | - | - | - | 21,7 ± 0,5* | 1,9 |
| | | метилтио | 4-метоксифенил | - | - | - | | |

| | | | | | | | | | |
|--|--------|--|---|--|---|---|-------------|-----|--|
| 22. | B275 |  |  | - | - | - | 21,7 ± 0,5* | 1,9 | |
| | | пропаргилтио | фенил | - | - | - | | | |
| 5,6,7-триметил-4,7-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин | | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | | |
| 23. | HC-6a |  |  | - | - | - | 22,4 ± 0,6* | 1,9 | |
| | | фенилфосфатметил | нитро | - | - | - | | | |
| 24. | HC-10a |  |  |  | - | - | 27,1 ± 0,9* | 2,3 | |
| | | 4-(2-аминоацетамидо)фенил | этоксикарбонил | метил | - | - | | | |

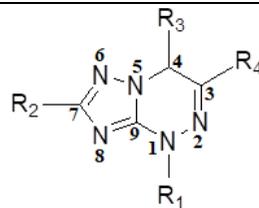
| | | | | | | | | | |
|--|--------|---|---|---|---|---|--------------|-----|--|
| 25. | НС-11a |  |  |  | - | - | 48,6 ± 14,9* | 4,1 | |
| | | 3-(2-аминопропанамидо)фенил | ацетил | метил | - | | | | |
| 26. | НС-71 |  |  |  | - | - | 34,7 ± 1,7* | 3,0 | |
| | | фенил | этоксикарбонил | метил | - | | | | |
| 27. | НС-109 |  |  |  | - | - | 66,6 ± 4,6* | 5,7 | |
| | | (тиофен-2-ил)метил | этоксикарбонил | метил | - | | | | |
| 5,7-диметил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин | | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | | |
| 28. | НС-82a |  |  | - | - | - | 41,4 ± 1,6* | 3,5 | |
| | | фенил | | - | - | | | | |

| | | | | | | | | |
|-----|--------------|---|--|---|---|---|---------------|------|
| 29. | НС-82b |  |  | - | - | - | 43,8 ± 1,5* | 3,7 |
| | | фенил | фенил | - | - | - | | |
| 30. | НС-82c |  |  | - | - | - | 21,0 ± 0,1* | 1,8 |
| | | тиофен-2-ил | фенил | - | - | - | | |
| 31. | НС-NAR-0273b |  |  | - | - | - | 154,4 ± 11,1* | 13,2 |
| | | тиофен-2-ил | тиофен-2-ил | - | - | - | | |

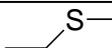
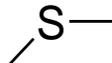
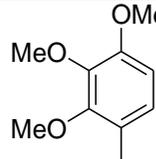
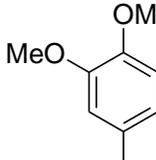
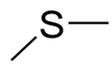
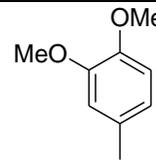
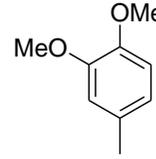
II. Триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины:

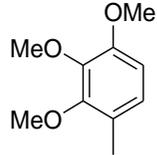
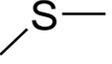
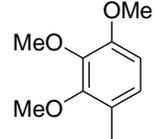
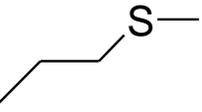
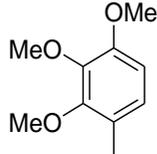
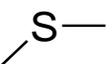
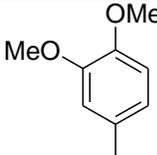
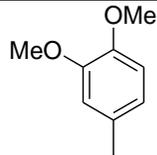


1,3,4,7-тетраметил-1,4-дигидро-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин

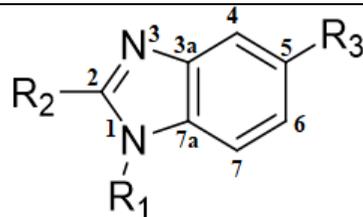


| | | | | | | | | |
|-----|-----|-------|---|------|------|---|-------------|-----|
| 32. | Be7 | Н |  | $=O$ | ОН | - | 39,1 ± 2,2* | 3,3 |
| | | гидро | метилтио | оксо | окси | | | |

| | | | | | | | | |
|-----|--------|-------|---|---|----------------|---|---------------------|-----|
| 34. | Dr-497 | Н |  | ОН | $-\text{NO}_2$ | - | $98,2 \pm 7,6^{*#}$ | 8,4 |
| | | гидро | этилтио | окси | нитро | | | |
| 35. | Dr-744 | Н |  |  | $-\text{NO}_2$ | - | $31,5 \pm 0,7^*$ | 2,7 |
| | | гидро | метилтио | 2,3,4-триметоксифенил | нитро | | | |
| 36. | Dr-758 | Н | - |  | $-\text{NO}_2$ | - | $36,5 \pm 2,1^*$ | 3,1 |
| | | гидро | - | 3,4-диметоксифенил | нитро | | | |
| 37. | Dr-761 | Н |  |  | $-\text{CN}$ | - | $34,0 \pm 2,0^*$ | 2,9 |
| | | гидро | метилтио | 3,4-диметоксифенил | циано | | | |
| 38. | Dr-762 | Н | $\text{H}_3\text{C}-$ |  | $-\text{NO}_2$ | - | $32,3 \pm 1,5^*$ | 2,8 |
| | | гидро | метил | 3,4-диметоксифенил | нитро | | | |

| | | | | | | | | |
|-----|--------|-------|--|---|----------------|---|------------------|-----|
| 39. | Dr-763 | Н | $\text{H}_3\text{C}-$ |  | $-\text{NO}_2$ | - | $29,4 \pm 1,5^*$ | 2,5 |
| | | гидро | метил | 2,3,4-триметоксифенил | нитро | | | |
| 40. | Dr-765 | Н |  |  | $-\text{CN}$ | - | $21,5 \pm 1,3^*$ | 1,8 |
| | | гидро | метилтио | 2,3,4-триметоксифенил | циано | | | |
| 41. | Dr-767 | Н |  |  | $-\text{CN}$ | - | $32,8 \pm 1,9^*$ | 2,8 |
| | | гидро | пропилтио | 2,3,4-триметоксифенил | циано | | | |
| 42. | VP-4 | Н |  |  | $-\text{NO}_2$ | - | $29,6 \pm 1,7^*$ | 2,5 |
| | | гидро | метилтио | 3,4-диметоксифенил | нитро | | | |
| 43. | VP-6 | Н | - |  | $-\text{CN}$ | - | $39,0 \pm 2,0^*$ | 3,3 |
| | | гидро | - | 3,4-диметоксифенил | циано | | | |

Препараты сравнения:



1,2,5-триметил-1*H*-бензо[*d*]имидазол

| | | | | | | | | |
|-----|--------------------------|----------------------|--|---|---|------------|-------------|-----|
| 44. | Дабигатрана этексилат | H_3C | | | - | - | 69,5 ± 4,5* | 5,9 |
| | | метил | гексил(Е)-(амино(4-(этиламино)фенил метилен)карбамат | 3-(N-(пиридин-2-ил) ацетамидо)пропаноат | - | | | |
| 45. | Контроль | - | - | - | - | 11,7 ± 0,1 | - | |

Примечание: * - ($p \leq 0,05$) изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони;

- ($p \leq 0,05$) изменения статистически значимы по отношению к препарату сравнения дабигатрана этексилату, критерий ANOVA с поправкой Бонферрони.