

**СИРОТЕНКО ВИКТОР СЕРГЕЕВИЧ**

**АНТИАГРЕГАНТНЫЙ И АНТИТРОМБОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ  
НОВЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

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

**Научный консультант:**

Заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор

СПАСОВ Александр Алексеевич

**Научный консультант:**

Профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, доктор медицинских наук, профессор

КУЧЕРЯВЕНКО Аида Фатиховна

**Официальные оппоненты:**

Заведующая кафедрой фармацевтической химии и организации фармацевтического дела МГУ им. М.В. Ломоносова, доктор фармацевтических наук, профессор

КАЛЕНИКОВА Елена Игоревна

Заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

ЗИГАНШИН Айрат Усманович

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

ОКОВИТЫЙ Сергей Владимирович

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

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_\_\_ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)) ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент

Ольга Викторовна Шаталова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущее место в ряду причин смертности во всем мире [Бойцов С.А., 2021; Li F., 2022; Voutilainen A., 2022]. Ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт являются основными причинами инвалидности населения [Бокерия Л.А., 2022; Мазуров А.В., 2014; Петров В.И., 2020; Ткачёва О.Н., 2021; Kjeldsen E.W., 2022]. Ведущим фактором в развитии ишемических нарушений являются процессы тромбообразования. Активное участие тромбоцитов в тромбообразовании и многогранность их функциональной активности обуславливает целесообразность фармакологического влияния на тромбоцитарный гемостаз у пациентов с ишемическими нарушениями, фибрилляцией предсердий как с лечебной, так и с профилактической целью [Бокерия О.Л., 2016; Гончаров М.Д., 2022; Кузьмина И.М., 2021; Шляхто Е.В., 2020; Gulati A., 2021; Savage P., 2022; Udut V.V., 2020]. Снижение риска возникновения ишемических осложнений возможно с применением антиагрегантных средств. Выделяют несколько групп антиагрегантных средств, реализующих свое действие через определенные мишени: ингибиторы синтеза тромбоксана  $A_2$ ; антагонисты тромбоксановых рецепторов; блокаторы пуриновых  $P2Y_{12}$  рецепторов тромбоцитов; блокаторы рецепторов тромбина (PAR1); блокаторы гликопротеиновых IIb/IIIa; блокаторы гликопротеиновых VI рецепторов; ингибиторы фосфодиэстеразы [Арутюнов А.Г., 2021; Решетько О.В., 2020; Sharma R., 2020; Mendelson S.J., 2021]. Однако, проблемы в лечении пациентов, получающих антиагрегантную терапию, связаны с развитием ряда осложнений: повторных ишемических событий, гастропатий, резистентности к терапии, кровотечений или вторичного тромбоза стента ввиду остаточной реактивности тромбоцитов [Пряхин И.С., 2020; Решетько О.В., 2020; Рудой А.С., 2019; Сулимов В.А., 2012]. Кровотечения из верхних отделов желудочно-кишечного тракта одно из самых частых осложнений антитромботической терапии, ассоциирующихся с высокой летальностью [Комаров А.Л., 2021].

Немаловажной функцией кровяных пластинок является участие в иммунном ответе организма [Шахматова О.О., 2020; Kollikowski A.M., 2022]. Выраженный протромботический статус, который сопровождается большим количеством тромботических событий, в особенности венозных тромбоэмболических осложнений, вносит вклад в неблагоприятные исходы септических состояний на фоне вирусных или бактериальных инфекций, а также при онкологических процессах [Кубатиев А.А., 2016; Момот А.П., 2021; Ройтман Е.В., 2021; Bergmark B.A., 2022; Klomberg R.C.W., 2022; Xu W.H., 2022]. Это позволяет рассматривать необходимость в эффективной антиагрегантной терапии не только для коррекции нарушений тромбоцитарного гемостаза, но и при иммунотромботических состояниях.

**Степень разработанности проблемы.** Антиагрегантные средства являются ключевым звеном в терапии пациентов в острый период инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, а также в ходе эндоваскулярных вмешательств. На настоящий момент, в клинической практике имеется большое количество антиагрегантных средств, относящихся к разным группам по механизму действия [Бойцов С.А., 2023; Домбровский М.М., 2018; Angiolillo D.J., 2021; Xiong Y., 2020]. Однако, применение этих средств существенно ограничивается рядом осложнений: развитие кровотечений, гастропатий, резистентности, тромбоцитопений и т.п. [Costa F., 2023; Smits P.C., 2022; Wang J., 2023] Кроме того, в ряде случаев недостаточно применения одного антитромботического средства и необходимо прибегать к назначению двойной антитромбоцитарной терапии. Поэтому поиск и создание новых антиагрегантных средств является актуальной задачей. На базе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ имеется отлаженный методический подход к поиску и созданию антиагрегантных средств. С 1997 года сотрудниками кафедры совместно с коллегами других структурных подразделений ВолгГМУ и ВУЗов проведены исследования антиагрегантной активности оригинальных молекул, относящихся к различным химическим классам.

**Цель исследования** – изучение антиагрегантного и антитромбогенного потенциала новых оригинальных гетероциклических соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов через известные и потенциальные рецепторные механизмы, и систему внутриклеточных сигнальных посредников в норме и при иммунокоагуляционных нарушениях, проведение доклинического изучения наиболее активных соединений.

### **Задачи исследования:**

1. Провести *in vitro* поиск среди новых производных, принадлежащих к 12 новым скаффолдам на предмет антиагрегантной активности.
2. Провести анализ перспективности 12 новых скаффолдов для поиска высокоэффективных антиагрегантных средств.
3. Изучить возможные механизмы антиагрегантного действия наиболее активных соединений.

4. Оценить антитромботическую активность соединений-лидеров и их лекарственных форм на моделях артериального и венозного тромбозов.
5. Провести анализ фармакокинетических и токсикологических параметров наиболее активных соединений и их лекарственных форм.
6. Исследовать функциональную активность тромбоцитов в условиях гиперцитокинемии, а также провести анализ антиагрегантных свойств наиболее активных соединений (Ф-168, RU-891 и L-36) и некоторых противовирусных препаратов в условиях иммунокоагулопатии.

**Научная новизна исследования.** Впервые показано антитромботическое действие новых синтезированных веществ производных 6*H*-1,3,4-гиадиазина (соединение L-36), 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-диона (соединение Ф-168), а также лекарственной формы для приема внутрь производного N9-имидазобензимидазола соединения RU-891 на моделях экспериментальной патологии. Впервые определена зависимость фармакодинамических и фармакокинетических свойств соединений, а также их токсикологический профиль. Установлены механизмы антиагрегантного действия наиболее активных соединений: Ф-168 (блокатор Пв/Ша рецепторов тромбоцитов), RU-891 (блокатор P2Y<sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов, ингибитор синтеза тромбосана A<sub>2</sub>), L-36 (ингибитор синтеза тромбосана A<sub>2</sub>). Впервые проведено изучение антиагрегантного действия новых соединений в условиях гиперцитокинемии. Установлено, что антиагрегантное средство ацетилсалициловая кислота и противовирусные лекарственные средства (фавипиравир, умифеновир, триазавирин, ингавирин, римантадин, энисамия йодид) проявляют антиагрегантное действие в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации тромбоцитов.

**Научно-практическая значимость.** В результате проведенного экспериментального исследования производных 12 новых скаффолдов гетероциклических соединений была сформирована база данных соединений с антиагрегантной активностью. Используемые методы *in silico* позволили определить наиболее перспективные базовые скаффолды для поиска и создания на их основе эффективных антиагрегантных средств: 6*H*-1,3,4-гиадиазины, 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дионы, а также N9-имидазобензимидазолы.

В ряду производных 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-диона выявлено наиболее активное соединение Ф-168, проявляющее выраженные антиагрегантные и антитромбогенные свойства. Выявленный механизм действия и выраженная антиагрегантная активность соединения Ф-168 позволили провести в полном объеме весь цикл доклинических исследований с разработкой лекарственной формы и изучением токсикологического профиля. В настоящее время инъекционная ГЛФ Ф-168 (Ангипур) находится на III фазе клинических исследований.

В рамках государственного контракта было проведено исследование соединения RU-891 и лекарственной формы для приема внутрь с целью проведения полного цикла доклинических исследований.

Получены данные по изучению агрегации тромбоцитов в условиях иммунокоагуляционных нарушений, а также проведена оценка антиагрегантных свойств новых гетероциклических соединений. Выявлено соединение L-36, обладающее антиагрегантными и эндотелиопротективными свойствами в условиях эндотоксемии.

**Реализация результатов исследования.** Данные по антиагрегантной активности, оценка перспективности скаффолдов используются с целью направленного синтеза высокоэффективных соединений в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградском государственном медицинском университете» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного Федерального университета, федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирском государственном медицинском университете» Министерства здравоохранения Российской Федерации, федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина». В работе Научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ, кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, кафедры фармакологии и фармации ИНМФО ВолгГМУ, кафедры фармацевтической и токсикологической химии полученные данные используются в лекционном курсе и практических занятиях.

Исследования по изучению соединения Ф-168 и его лекарственной формы для внутривенного введения проводились по заказу ООО «Компания ЭЛТА». В настоящее время успешно завершена II фаза клинических исследований. Часть исследований в отношении соединения RU-891 были проведены в рамках государственного контракта № 14.N08.12.0160 от «02» июня 2017 г. В рамках гранта Минобрнауки

РФ (Соглашение №075-15-2020-777 от «01» октября 2020 г. проведено изучение свойств системы гемостаза в условиях гиперцитокинемии, а также выполнено исследование ряда противовирусных соединений по влиянию на систему гемостаза в условиях цитокиновой гиперагрегации.

**Методология и методы исследования.** В связи с поставленными задачами выбраны современные высокоинформативные методические подходы, имеющиеся в Волгоградском государственном медицинском университете. В качестве объектов исследования использованы кролики-самцы породы «Шиншилла», а также половозрелые самцы и самки мышей и крыс. Исследование антитромбогенных свойств соединений Ф-168, RU-891 и L-36 проведено согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению антиагрегантной и антитромботической активности лекарственных средств [Мионов А.Н., 2012] с использованием методов статистической обработки данных. Фармакокинетические исследования и изучение хронической токсичности было проведено согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», а также решениям и рекомендациям Евразийского экономического союза.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Среди изученных 12 скаффолдов наиболее активные антиагрегантные соединения были выявлены в рядах N-содержащих гетероциклических соединений: производных 3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-диона и N9-имидазобензимидазола, а также в ряду гетероциклов, содержащих атом серы – производные 6H-1,3,4-тиадиазина.

2. Соединение Ф-168, проявляет выраженную антиагрегантную активность *in vivo*, сопоставимую с референсным препаратом тирофибаном ( $ED_{50}$  0,89 и 0,9 мг/кг, соответственно). По уровню антитромботической активности АФС и ГЛФ Ф-168 сопоставимы с тирофибаном на моделях артериального тромбоза, индуцированных хлоридом железа (III) и электрическим током, на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза, а также при моделировании тромбоза нижней полый вены. Определены фармакокинетические параметры для соединения Ф-168:  $AUC=136,9$  нг\*ч/мл,  $T_{1/2}=1,072$  ч,  $Cl=9,73$  л/ч/кг,  $Vd=15,04$  л/кг,  $F=97,88\%$ . Статистически значимые различия в биоэквивалентности АФС и ГЛФ Ф-168 отсутствуют. Согласно данным по изучению токсичности установлено, что соединение Ф-168 относится к 3 классу умеренно токсичных веществ.

3. Производное N9-2,3-дигидроимидазобензимидазола RU-891 превосходит по антиагрегантной активности *in vivo* препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,5 раза. По антитромботической активности АФС и ГЛФ RU-891 превосходят ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2 и 4,8 раза, соответственно. Определены фармакокинетические параметры для соединения RU-891:  $AUC=5,06$  мкг\*ч/мл,  $T_{1/2}=2,59$  ч,  $Cl=4,55$  л/ч/кг,  $Vd=17,07$  л/кг,  $F=93,38\%$ . Статистически значимые различия в биоэквивалентности АФС и ГЛФ RU-891 отсутствуют. Согласно данным по изучению токсичности установлено, что соединение Ф-168 относится к 3 классу умеренно токсичных веществ.

4. Соединение L-36 превосходит по уровню антиагрегантной активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в опытах *in vivo* в 1,2 раза. На моделях артериального и венозного тромбоза соединение L-36 превосходит по антитромботической активности ацетилсалициловую кислоту в 3 раза. В условиях системной воспалительной реакции соединение L-36 снижает уровень эндотелина-1 и фактора Виллебранда, что указывает на эндотелиопротективное действие.

5. Соединение L-36 способствует снижению агрегации тромбоцитов в условиях гиперцитокинемии. При иммунокоагуляционных нарушениях, вызванных ЛПС, противовирусные лекарственные средства умифеновир, фавипиравир и триазавирин проявляют антиагрегантные свойства на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая степень достоверности результатов исследования подтверждается достаточным объемом и качеством выполненных исследований, использованием высокоточных методов исследования, а также проведенным статистическим анализом полученных результатов. Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XXII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2017, 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 2018, 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием, 2019, Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации», 2020, Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 11-й конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 2020, Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше!» и 60-й сессии, посвященных 75-летию ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 2020, 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием, 2021, Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2021» и 61-й сессии ФГБУ

«НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 11-й конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 2022, 80-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 2023, Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2023» и 63-й сессии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, 2023, VI Съезде фармакологов России, 2023, 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 2023, IX Всероссийской конференции с международным участием «Кардиоваскулярная фармакотерапия» совместно с VII Научно-практической конференцией с международным участием «Желудочковые нарушения ритма сердца: диагностика, лечение, профилактика», 2023. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, 14 в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Получено 3 положительных решения на патенты на изобретение.

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Проведено изучение специфической фармакологической активности исследуемых соединений, установление механизмов антиагрегантного действия. Автор принимал активное участие в обработке и обсуждении результатов по изучению фармакокинетики наиболее активных соединений и лекарственных форм, а также данных по изучению хронической токсичности.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 357 страницах машинописного текста, иллюстрирована 93 таблицами, 73 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VII), обсуждения результатов, выводов и приложения. Список литературы включает 100 отечественных и 284 иностранных источника.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В 1 главе представлен обзор современных данных по функциональной активности тромбоцитов, а также анализ существующих средств фармакологической коррекции нарушений системы гемостаза. Отдельное внимание уделено иммулотропным свойствам тромбоцитов. Приведены основные направления поиска и создания новых антиагрегантных средств, отражены новые мишени для воздействия лекарственными препаратами.

Глава 2 описывает материалы и методы, используемые в ходе исследования. Объектом исследования явились 148 новых гетероциклических соединений, принадлежащих 12 различным химическим классам: 1,3-имидазолы, 1,2,4,5-тетразины, 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дионы (ксантины), *N*9-имидазобензимидазолы, 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидины, 1*H*-бензимидазолы, *N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, 3*H*-тиазолы, 6*H*-1,3,4-тиадиазины, 4*H*-бензо[1,3]оксазины, 2,3-дигидробензофураны, 1*H*-бензохромены. Структуры исследуемых соединений приведены в приложении к диссертации. Исследование выполнено в соответствии с требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», и в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии №81 от 03.11.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Экспериментальное исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России протокол №2022-2020 от 18.02.2020 г. Реактивы и оборудование, использованные в ходе исследования:

- |  |                              |
|--|------------------------------|
| 1. Цитрат натрия   | ч.д.а., Реахим, Россия       |
| 2. Динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) | Sigma, США                   |
| 3. Хлорид железа (III)                                   | «Мосреактив» Россия          |
| 4. Эпинефрин   | Sigma, США                   |
| 5. Коллаген  | Sigma, США                   |
| 6. TRAP агонист  | Sigma, США                   |
| 7. PAR-1 агонист   | Sigma, США                   |
| 8. Арахидоновая кислота                                  | Sigma, США                   |
| 9. U46619 агонист  | Sigma, США                   |
| 10. Тромбин  | Sigma, США                   |
| 11. Фактор активации тромбоцитов                         | Sigma, США                   |
| 12. Ристоцитин   | Sigma, США                   |
| 13. Изопротеренол  | Sigma, США                   |
| 14. ELISA kit for Thromboxane B2 (TXB2)                  | CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США |
| 15. ELISA kit 6-Keto-Prostaglandin F1Alpha               | CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США |

16. ELISA kit for COX-1	CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США
17. ELISA kit for vWF	CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США
18. ELISA kit for endothelin-1	CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США
19. Непес	Sigma, США
20. Альбумин	Sigma, США
21. 64-х ядерный персональный суперкомпьютер гибридной архитектуры – 8x8 x Intel Xeon E7-8837 2.66 ГГц 8core / DDR3 256 Gb 1333 MHz/GPU PNY nVidia Tesla K40/HDD 4 x 4,0 Tb/OS Linux CentOS	Т-платформы, Россия
22. Агрегометр Biola220 LA	ООО НФП "Биола", Россия
23. Агрегометр Chronolog-700	Chronolog Inc., США
24. Центрифуга MultiCentrifuge Elmi CM 6MT	Elmi, Латвия
25. Ультразвуковой доплерограф «Минимакс-Допплер-К»	Санкт-Петербург
26. Дозаторы автоматические переменного объема	Gilson, Франция
27. Микропланшетный ридер Infinite 200 Pro	Tecan, Австрия
28. Анализатор ЛайтСкан	НПФ «Люмекс», Россия
29. Цифровая камера AxioCam 105 color	CarlZeiss, Германия, 5 мегапикселей
30. Микроскоп AxioCam plus	CarlZeiss, Германия
31. Тромбоэластограф TEG 5000	Haemoscope Corp., США
32. ВЭЖХ хроматограф	Shimadzu, Япония

Функциональную активность тромбоцитов *in vitro* исследовали на богатой тромбоцитами плазме 36 кроликов-самцов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. В качестве препарата сравнения использовалась ацетилсалициловая кислота (Шансона Ксинхуа Фармасьютикал Ко., Лтд, Китай). Влияние тестируемых соединений на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* изучали согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Biola LA-220. Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов, полученной по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971). В качестве индуктора процессов агрегации тромбоцитов использовали АДФ, в конечной концентрации 5 мкМ [Kwon H.W., 2016].

В ходе виртуальной оценки перспективности скаффолдов *in silico*<sup>1</sup> в качестве материалов выступали данные по 2D-структуре и уровню антиагрегантной активности 148 новых гетероциклических производных. Статистическая оценка значимости влияния различных структурных параметров на уровень антиагрегантной активности исследуемых скаффолов была проведена методом подструктурного анализа [Васильев П.М., 2014] с использованием биномиального критерия [Глотов Н.В., 1982] с помощью оригинального скрипта на Visual Basic.

Изучение влияния вещества на функциональную активность тромбоцитов *in vivo* проводили согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Biola LA-220. Тестируемыми образцами являлась богатая тромбоцитами плазма беспородных половозрелых крыс-самцов массой 250,0-300,0 г, которым вводили исследуемые соединения, проявившие наиболее высокую антиагрегантную активность *in vitro* в дозах, эквивалентных значениям IC<sub>50</sub>, полученным в опытах *in vitro*, а также препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту, клопидогрел и тирофибан. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Для всех тестируемых образцов методом регрессионного анализа рассчитывали величину ED<sub>50</sub> (эффективная доза, в которой вещество ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

Для изучения острой токсичности использовали половозрелых мышей, согласно действующему «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012].

Изучение влияния тестируемых образцов на функциональную активность тромбоцитов, стимулированных различными индукторами, проводилось *in vitro* согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов

<sup>1</sup> За помощь в проведении исследований *in silico* выражаем глубокую признательность профессору кафедры фармакологии и биоинформатики ВолГМУ, д.б.н. Васильеву Павлу Михайловичу.

BiolaLA 220. Эксперименты были проведены на богатой тромбоцитами плазме 12 кроликов-самцов, а также суспензии отмытых тромбоцитов в случае использования в качестве индукторов агрегации агониста тромбоксановых рецепторов U46619 и тромбина [Zhou Y., 2020; Octave M., 2021]. Влияние соединений на пуриновые P2Y<sub>1</sub>- (*in vitro*) и P2Y<sub>12</sub>-рецепторы (*in vivo*) тромбоцитов было изучено методом малоуглового светорассеяния на приборе Лайт-Скан (НПФ «Люмекс», Россия) [Сакаев М.Р., 2000]. Исследования выполнялись на богатой тромбоцитами плазме кроликов в кальциевой и безкальциевой среде [Beck F., 2017]. Методом ИФА, с применением высокочувствительных и специфичных в видовом отношении наборов ELISA kit for Thromboxane B2 (TXB2) (CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США) и ELISA kit 6-Keto-Prostaglandin F1Alpha (CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США), была произведена оценка влияния веществ на баланс тромбоксана и простаглицлина [Chen H., 2018; Rangarajan S., 2020].

Определение изменений уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах *in vitro* проводили с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM согласно методу, описанному Grynkiewicz G. (1985) и адаптированному для выполнения на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200 (Tecan, Австрия) в кальциевой и безкальциевой среде [Fernández D.I., 2022].

Уровень секреции из гранул хранения тромбоцитов под влиянием исследуемых соединений оценивали *in vitro* с помощью люми-агрегометра Chronolog-700 люминесцентным методом детекции по количественному значению секретируемого АТФ. Способность тромбоцитов к адгезии на микрофибриллах коллагена была изучена в цельной крови импедансным методом детекции с помощью люми-агрегометра Chronolog-700 [Сиротенко В.С., 2017; Scanlon V.M., 2019].

Исследования фармакокинетики<sup>2</sup> субстанции соединений Ф-168 и RU-891 проводили на крысах, биоэквивалентность лекарственных форм оценивали на кроликах.

В работе использовали жидкостной хроматограф (Shimadzu, Япония). Определение соединения Ф-168 осуществлялось при помощи флуоресцентного детектора ( $\lambda$  экстинции/эмиссии 290/340 нм) на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 150x4,6 мм) с использованием модификатора фазы. Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил (УФ210) (Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещенного фосфата калия 50 мМ. Оптимальными условиями количественного определения субстанций Ф-168 являются следующие: буферная система из 50 мМ однозамещенного фосфата калия pH=4,68; соотношение водной и органической фазы 75%:25% (v/v), с добавлением модификатора фазы натриевой соли гептансульфоновой кислоты (0,12 %); температурный режим 40°C. При данных условиях время удерживания составило 6,7 - 7,1 мин. Оптимальными условиями количественного определения субстанции RU-891 являются следующие: буферная система из 50 мМ однозамещенного фосфата калия pH=6,0; соотношение водной и органической фазы 74%:26% v/v, с добавлением модификатора фазы натриевой соли гептансульфоновой кислоты (0,12 %); температурный режим 30°C. При данных условиях время удерживания составило 5-5,5 мин. Количественное определение проводилось в диапазоне концентраций от 500 нг/мл до 10 мкг/мл. Для оценки фармакокинетических свойств изучаемых лекарственных веществ рассчитывали ряд параметров [Миронов А.Н., 2012]: площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” (AUC); общий (кажущийся) клиренс (cl); константа элиминации (Kel); общий (кажущийся) объём распределения (Vd); период полувыведения (T<sub>1/2</sub>); среднее время удерживания (MRT). Для оценки интенсивности проникновения вещества в ткани использовали вычисление тканевой доступности (Ft). Прогноз возможных метаболитов соединений Ф-168 и RU-891, а также изменение физико-химических свойств в процессе биотрансформации проводили с помощью программы «PALLAS» (CompuDrug Chemistry Ltd., Венгрия). Определение метаболитов осуществляли также при использовании кислотного, щелочного и ферментативного гидролиза проб мочи и кала через 48 часов после введения.

Антитромботическую активность субстанции и инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 оценивали в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012] в условиях *in vivo* при однократном внутривенном введении (при исследовании соединений RU-891 и L-36 вещество вводили однократно внутривенно) крысам-самцам на моделях артериальных тромбозов, индуцированных аппликацией хлоридом железа (III) [Kurz K.D., 1990; Spasov A.A., 2017; Ito Y., 2018] и воздействием электрического тока [Guglielmi G., 1991; Спасов А.А., 2016; Zhao X., 2016; Kuznetsova T.A., 2021] на сонную артерию крыс, а также при генерализованном адреналин-коллагеновом тромбозе на мышцах [Di Minno G., 1983;

<sup>2</sup> За помощь в проведении фармакокинетических исследований выражаем глубокую признательность заведующей лабораторией фармацевтических аналитических исследований НЦИЛС ВолгГМУ, д.б.н. Смирновой Людмиле Андреевне.

Manne В.К., 2018; Спасов А.А., 2020], на модели артериального тромбоза у крыс с экспериментальным некоронарогенным инфарктом миокарда [Wei H., 2017; Boarescu P.-M., 2019; Спасов А.А., 2021], модели венозного тромбоза крыс [Jin Q.-Q., 2017; Albadawi H., 2017; Спасов А.А., 2021] и на модели оценки времени кровотечения у мышей [Mohammed В.М., 2020; Wyseure T., 2018]. Материал для морфологического исследования<sup>3</sup> помещался в 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) на 24 часа. Окраску осуществляли гематоксилином и эозином по общепринятым гистологическим методикам [Саркисов Д.С., 1996]. Для анализа средней площади тромбов на срезах легких мышей использовали цифровую камеру AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия) на базе микроскопа AxioCamPlus (CarlZeiss, Германия) с использованием объектива x10; x40 и окуляра x10, а также программное обеспечение ZEN Pro 2012 (CarlZeiss, Германия) [Автандилов Г.Г., 2002].

Моделирование гиперцитокинемии осуществляли с помощью добавления в тест-систему раствора липополисахарида в концентрации 20 нг/мл. Для веществ с наиболее высокой антиагрегантной активностью методом регрессионного анализа рассчитывали величину IC<sub>50</sub> (концентрация, ингибирующая агрегацию тромбоцитов на 50%).

Статистическую обработку данных проводили с использованием встроенных функций программного обеспечения Microsoft Excel 2020, а также программы GraphPad Prism8.0. В качестве критерия попарного сравнения использовали критерий Манна-Уитни при уровне значимости p<0,05, для сравнения множества групп прибегали к критерию one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05). Для статистической оценки выживаемости мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза использовали точный критерий Фишера.

В 3 главе представлены экспериментальные данные по поиску наиболее активных антиагрегантных соединений. В ходе изучения гетероциклических азотсодержащих моноциклических веществ было выявлено 4 наиболее активных соединения производных имидазола, по показателю IC<sub>50</sub> не значительно превосходящих по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту (таблица 1). Также было установлено, что ряду производных пиримидина при проведении скрининговых исследований высокоактивных соединений выявлено не было.

Таблица 1.

Антиагрегантная активность моноциклических соединений и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	LOSAZ-33	55,3±1,8*	29,0±2,7*	16,9±2,9	70,4
2.	RUI-19	55,9±1,3*	25,9±5,6	9,2±1,7	69,6
3.	RUI-20	54,3±3,2*	33,5±2,2*	26,3±1,7*	71,6
4.	RUI-27	57,3±4,1*	22,3±4,5	14,7±4,2	74,4
5.	Ацетилсалициловая кислота	56,5±2,1*	20,5±5,4*	11,0±3,7	81,0

\*- различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Изучение антиагрегантной активности азотсодержащих конденсированных гетероциклических структур позволило выявить соединения Ф-168 и RU-891, которые превосходят по показателю IC<sub>50</sub> активность ацетилсалициловой кислоты в 3 и 1,2 раза, соответственно (таблица 2).

Таблица 2.

Антиагрегантная активность азотсодержащих конденсированных соединений и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	Ф-168	66,2±2,3*	38,5±1,4*	8,9±1,6	27,0
2.	RU-891	54,0±4,1*	32,8±2,9*	15,2±3,0	66,8
3.	RU-1301	54,9±1,7*	27,5±2,4	8,2±2,7	70,5
4.	RU-1303	54,0±2,0*	25,9±2,8	13,0±3,5	84,8

<sup>3</sup> За помощь в проведении морфологических исследований выражаем глубокую признательность заведующему кафедрой патологической анатомии, д.м.н., профессору Смирнову Алексею Владимировичу.

5.	Ацетилсалициловая кислота	56,5±2,1*	20,5±5,4*	11,0±3,7	81,0
----	---------------------------	-----------	-----------	----------	------

\*-различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

В ходе исследования антиагрегантной активности серосодержащих гетероциклических соединений было выявлено новое производное 6H-1,3,4-тиадиазина соединение L-36, превосходящее по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 9,4 раза (таблица 3).

Таблица 3.

Антиагрегантная активность серосодержащих гетероциклических соединений и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	AZHT-7	65,8±4,7*	30,4±6,9*	22,5±6,0	30,4
2.	AZHT-9	68,7±4,2*	41,7±4,2*	13,7±4,4	20,7
3.	L-14	70,8±3,7*	43,0±7,6*	32,4±6,1*	11,6
4.	L-17	64,6±1,8*	50,1±3,3*	35,0±8,5*	10,2
5.	L-36	65,8±8,8*	57,2±8,1*	30,4±4,1*	8,6
6.	L-91	57,3±2,4*	48,8±11,6*	24,8±9,1	37,0
7.	Ацетилсалициловая кислота	56,5±2,1*	20,5±5,4*	11,0±3,7	81,0

\*- различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

При изучении антиагрегантных свойств новых производных 4H-бензо[1,3]оксазина, 2,3-дигидробензофурана и 1H-бензохромена не было выявлено соединений с достаточным уровнем активности, превосходящим таковой для ацетилсалициловой кислоты (рисунок 1).

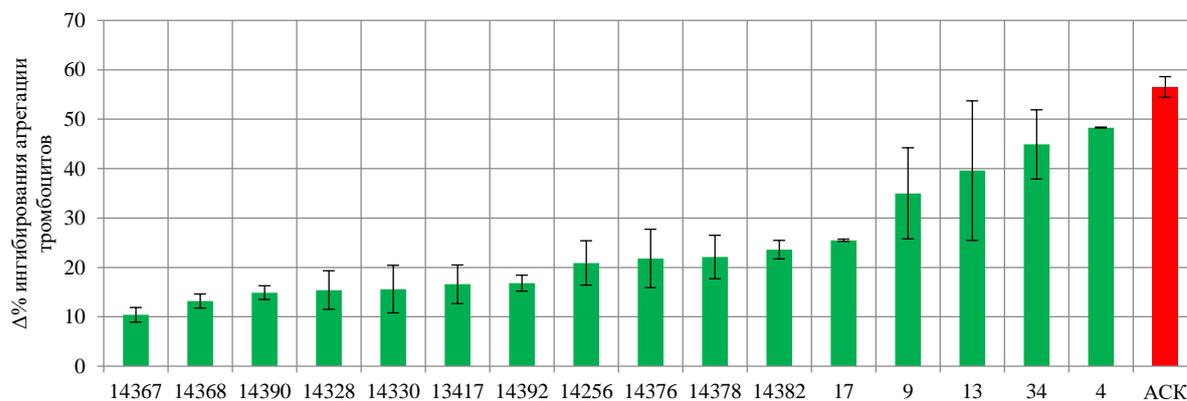


Рисунок 1. Антиагрегантная активность кислородсодержащих гетероциклических конденсированных соединений в концентрации 100 мкМ

Примечание: АСК - ацетилсалициловая кислота

Кластеризация исследуемых образцов позволила обнаружить, что в ряду производных 4H-бензо[1,3]оксазина 33,3% соединений с низким уровнем активности и 66,7% - с умеренным. Среди производных 2,3-дигидробензофурана и 1H-бензохромена не было выявлено веществ с высоким и умеренным уровнем активности. Таким образом, проведенный анализ позволяет сделать заключение об отсутствии перспективности кислородсодержащих гетероциклических конденсированных соединений, как потенциальных антиагрегантных средств.

В результате кластеризации общего массива данных для каждой из 12 групп химических производных было определено наличие высокоактивных соединений, веществ с умеренной и низкой активностью. С помощью биномиального критерия были определены индексы значимости, которые послужили основанием для отнесения того или иного исследованного химического ряда к перспективному или неперспективному для поиска и создания на его основе высоко эффективных антиагрегантных средств. Наиболее перспективными по показателю индекса значимости оказались следующие химические классы:

1. 3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дионы (индекс значимости 4);

2. N9-имидазобензимидазолы (индекс значимости 4);
3. 6H-1,3,4-тиадиазины (индекс значимости 5).

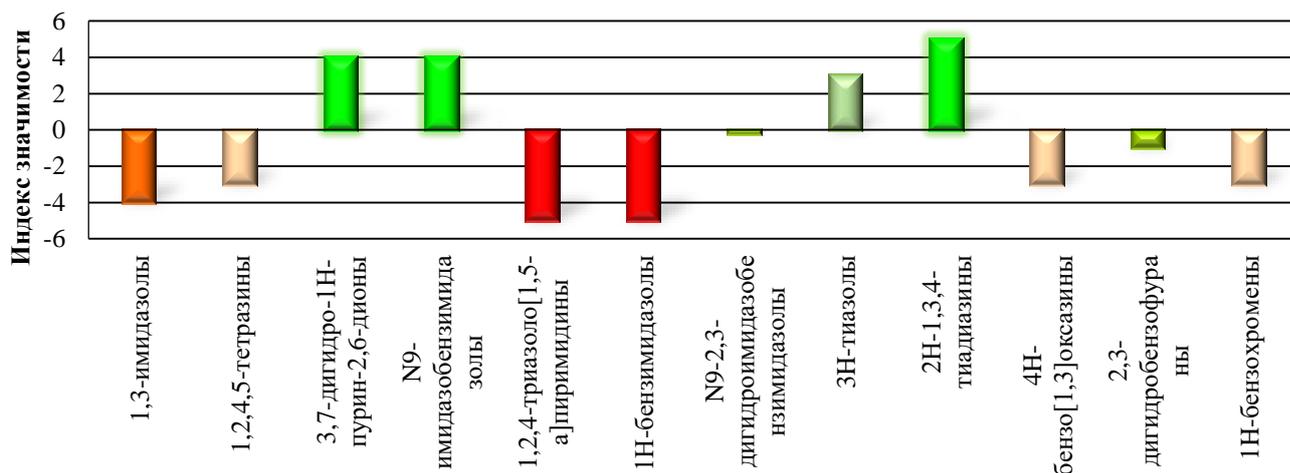


Рисунок 2. Индекс значимости исследованных химических рядов.

При проведении экспериментального скрининга 148 оригинальных соединений было выявлено 3 наиболее активных вещества – Ф-168, RU-891, L-36 (рисунок 3) – относящихся к приведенным выше наиболее перспективным классам по показателю индекса значимости.

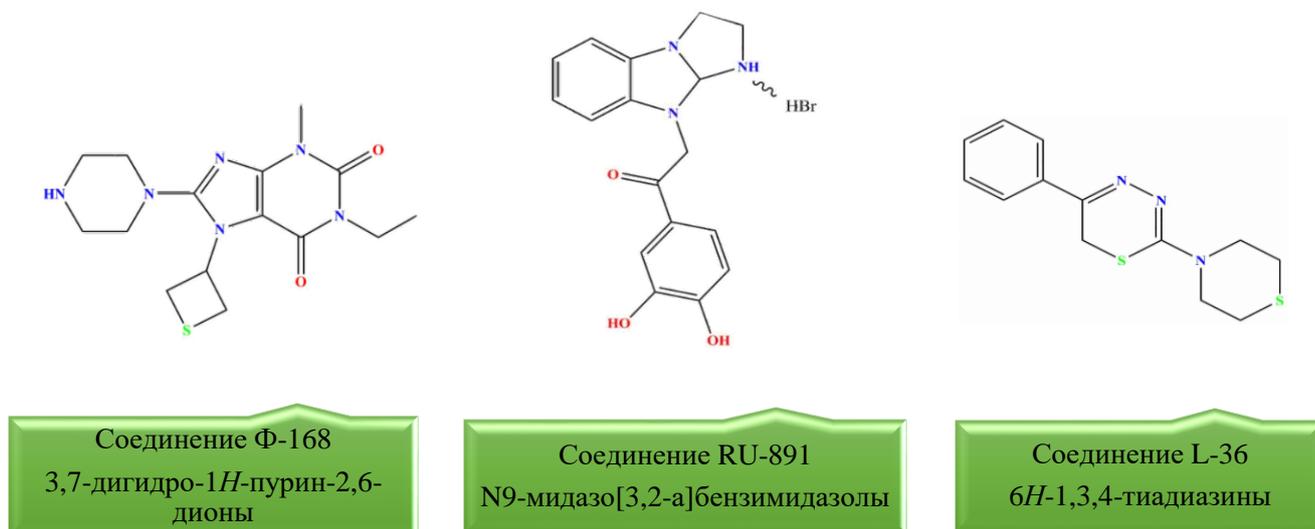


Рисунок 3. Структурные формулы соединений-лидеров.

Далее было проведено исследование антиагрегантной активности наиболее активных соединений *in vivo*, а также изучение их острой токсичности. Данные по изучению антиагрегантной активности и острой токсичности наиболее активных соединений представлены в таблице 4. Соединение Ф-168 при однократном внутривенном введении крысам проявило выраженную дозозависимую антиагрегантную активность и по значению ED<sub>50</sub> было сравнимо с эффектом тирофибана. По значению условного терапевтического индекса соединение Ф-168 превосходит препарат сравнения тирофибан в 6,3 раза. Соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении в опытах *in vivo* также оказалось активным в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов крыс и по показателю ED<sub>50</sub> превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,5 раза. Исходя из данных по изучению острой токсичности по значению терапевтического индекса, соединение RU-891 превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 9,4 раза. Образец под шифром L-36 превосходил по уровню антиагрегантной активности ацетилсалициловую кислоту в 1,2 раза, а по показателю условного терапевтического индекса в 2,6 раза.

Таблица 4.

Значения ED<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> и условного терапевтического индекса (УТИ) наиболее активных соединений и препаратов сравнения тирофибана и ацетилсалициловой кислоты.

№ п/п	Тестируемый образец	Путь введения	ED <sub>50</sub> , мг/кг	LD <sub>50</sub> , мг/кг	УТИ
1.	Ф-168	Внутривенно	0,89	31,6	35,5
2.	RU-891	Внутрижелудочно	23,0	1578,4	68,6
3.	L-36	Внутрижелудочно	27,8	525,0	19,0
4.	Тирофибан	Внутривенно	0,9	>>5	>>5,6
5.	Ацетилсалициловая кислота	Внутрижелудочно	34,4	250,0	7,3

**4 глава** диссертации посвящена изучению фармакологических свойств нового производного ксантина соединения Ф-168. На первом этапе исследования была проведена оценка влияния соединения Ф-168 на стадии функциональной активности тромбоцитов. Изучение влияния соединения Ф-168 на способность тромбоцитов к адгезии позволило выявить, что тестируемый образец дозозависимо ингибировал процессы адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена. В концентрации 100 мкМ соединение Ф-168 на 77,2% блокировало способность тромбоцитов к адгезии. Изучение образца Ф-168 в концентрациях 10 и 1 мкМ позволило заключить, что в указанных концентрациях исследуемое вещество ингибирует адгезию тромбоцитов на 57,0 и 14,0% соответственно. Учитывая наличие дозозависимого эффекта, была рассчитана величина IC<sub>50</sub> для соединения Ф-168, которая составила 10,5 мкМ. Препарат сравнения тирофибан также дозозависимо блокировал адгезию тромбоцитов. IC<sub>50</sub> для него составила 7,4 мкМ. Активация тромбоцитов происходит посредством стимуляции P2Y<sub>1</sub> рецепторов. Соединение Ф-168 оказывает низкую P2Y<sub>1</sub> – антагонистическую активность, уступая веществу сравнения MRS-2179 в 6,1 раза, что позволяет исключить влияние исследуемого соединения на данную стадию. Активация тромбоцитов и образование тромбов включают различные сигнальные пути, ведущие к изменению формы тромбоцитов, активации интегрина и дегрануляции [Chatterjee M., 2020]. Одним из компонентов, секретируемых из плотных гранул тромбоцитов, является аденозин-трифосфат. На поверхности тромбоцитов среди пуриновых рецепторов экспрессируется АТФ-связывающий ионный канал P2X<sub>1</sub>, который является мишенью для АТФ [Mitrugno A., 2018]. Препарат сравнения тирофибан способствовал снижению уровня секретируемой АТФ до 15,9 нМ, что было сопоставимо с тестируемым соединением Ф-168. При изучении влияния соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана при внутривенном введении на уровень тромбоксана B<sub>2</sub> в тромбоцитах крыс контрольные значения составили 8887,9 пкг/мл. Субстанция соединения Ф-168 снижала количество измеряемого показателя до 1672,1 пкг/мл, что в 5,3 раза ниже уровня контрольных значений (рисунок 4). Препарат сравнения тирофибан также уменьшал уровень тромбоксана B<sub>2</sub> в тромбоцитах крыс до 1222,4 пкг/мл, что в 7,3 раза ниже значений, полученных в контроле. Контрольные значения при изучении влияния на уровень 6-кетопростагландина F1α у крыс, составили 21273,4 пкг/мл. При внутривенном введении соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана данный показатель статистически значимо не изменялся и составлял 22768,5 пкг/мл и 21409,8 пкг/мл, соответственно (рисунок 4).

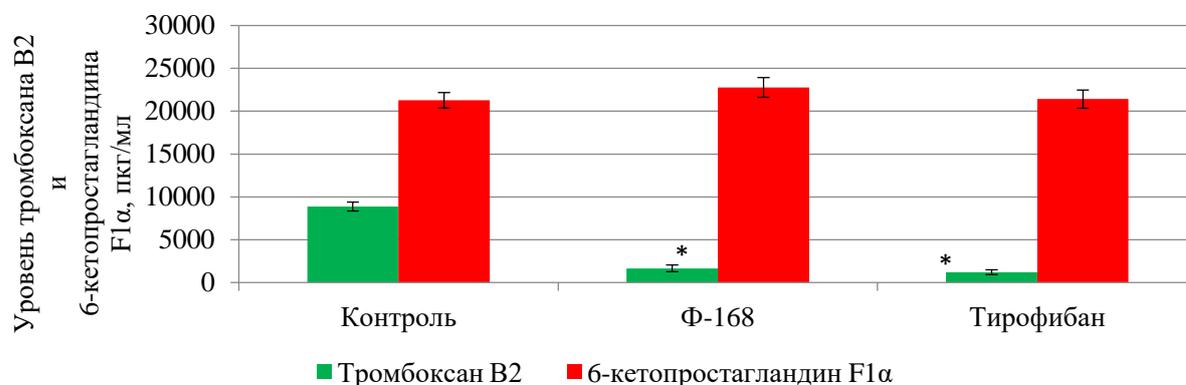


Рисунок 4. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на тромбоксан-простаглицлиновую систему  
Примечание:

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  активирует множество различных процессов, необходимых для образования тромбов, и, таким образом, внутриклеточный пул ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , может рассматриваться как потенциальная мишень для антитромботических препаратов [Walford T., 2016]. Соединение Ф-168 в

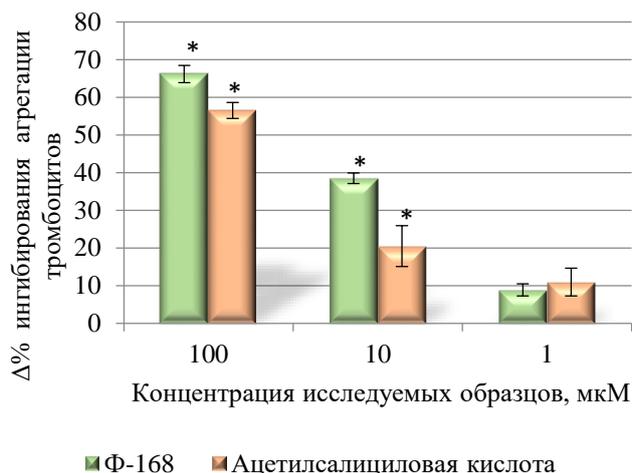


Рисунок 5. Влияние соединения Ф-168 и на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ *in vitro*.

Примечание: \* - различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,05$ )

эксперименты позволили установить наличие высокой активности у соединения Ф-168 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. В концентрации 100 мкМ соединение Ф-168 снижало амплитуду агрегации тромбоцитов до 6,2 отн. ед., на 66,5% достоверно ниже уровня контроля. При дальнейшем снижении концентрации исследуемого образца до 10 и 1 мкМ величина показателя агрегации тромбоцитов составила 11,4 и 16,2 отн. ед., что на 38,4 и 12,4% соответственно. Значение  $\text{IC}_{50}$  для образца Ф-168 при этом составило 27 мкМ (рисунок 5).

Проведенные исследования позволили установить дозозависимое блокирующее влияние соединения Ф-168 на функциональную активность тромбоцитов, индуцированную адреналином. Вещество Ф-168 в концентрации 1000 мкМ снижало агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором на 94,1% относительно контрольных значений. Далее в более низких концентрациях 500, 200 и 100 мкМ тестируемая субстанция оказывала защитное действие в отношении функциональной активности тромбоцитов на 81,0, 52,4 и 27,1%, соответственно.  $\text{IC}_{50}$  для Ф-168 при этом составила 190 мкМ.

Влияние соединения Ф-168 на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, изучали в сравнении с ингибитором циклооксигеназы ацетилсалициловой кислотой. В концентрациях 1000, 500 и 200 мкМ образец под шифром Ф-168 ингибировал агрегацию тромбоцитов на 98,2, 44,8 и 32% соответственно.  $\text{IC}_{50}$  Ф-168 при этом составила 460 мкМ. Ацетилсалициловая кислота дозозависимо ингибировала агрегацию, индуцированную арахидоновой кислотой, блокируя данный процесс в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ на 94,6, 25,1 и 13,4%, соответственно. При этом  $\text{IC}_{50}$  препарата сравнения составила 17 мкМ. Следовательно, по  $\text{IC}_{50}$  антиагрегантной активности ацетилсалициловая кислота превосходит Ф-168. Такое влияние референсного препарата объясняется его механизмом действия, связанным с ингибированием превращения арахидоновой кислоты на уровне циклооксигеназы-1 тромбоцитов.

По влиянию на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов соединение Ф-168 было изучено в сравнении с тирофибаном. В концентрациях 500, 200 и 100 мкМ соединение Ф-168 блокировало агрегацию тромбоцитов на 87,0, 49,4 и 18,8%, соответственно.  $\text{IC}_{50}$  тестируемой субстанции при этом составила 190 мкМ (таблица 5). Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию, индуцированную коллагеном, но в более низких концентрациях. При этом  $\text{IC}_{50}$  тирофибана составила 7,9 мкМ (таблица 5). Таким образом, по показателю  $\text{IC}_{50}$  препарат сравнения тирофибан превосходит соединение Ф-168 в 24 раза.

концентрации 100 мкМ практически полностью блокировало прирост внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с контролем. Его количество в пробе составило 19,4 нМ. Процент ингибирования уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  при этом соответствовал 91,4%. При уменьшении концентрации Ф-168 до 10 и 1 мкМ данный показатель составил 68,5 и 36,3%, соответственно.  $\text{IC}_{50}$  для соединения Ф-168 была равна 2,7 мкМ, что указывает на выраженное влияние соединения Ф-168 на данный процесс.

На втором этапе было изучено действие соединения Ф-168 на рецепторный ландшафт тромбоцитов. При действии АДФ происходит активация  $\text{P2Y}_1$  и  $\text{P2Y}_{12}$  рецепторов тромбоцитов. В клинической практике наиболее широкое распространение получили антагонисты  $\text{P2Y}_{12}$  рецепторов тромбоцитов [Kuszynski D.S., 2021]. Проведенные

Таблица 5.

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на агрегацию тромбоцитов, вызванную коллагеном *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов					
		Исследуемая концентрация, мкМ					
		500	200	100	18	1,8	0,18
1.	Ф-168	87,0±3,1*	49,4±2,1*	18,8±4,8*			
2.	Тирофибан				88,9±3,4*	27,5±1,7*	19,3±4,3*

Примечание: \*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

n-число тестируемых животных

Исследование влияния тестируемых образцов на PAR1-рецепторы тромбоцитов проводилось с использованием крови доноров. В контрольных образцах плазмы крови доноров амплитуда агрегации тромбоцитов составила 26,3 отн. ед. (рисунок 6). В концентрациях 100, 10 и 1 мкМ соединение Ф-168 блокировало агрегацию тромбоцитов на 92,2, 69,9 и 48,2%, соответственно. IC<sub>50</sub> при этом для Ф-168 составила 0,12 мкМ. Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию, индуцированную агонистом PAR1 рецепторов тромбоцитов в концентрациях 18, 1,8 и 0,18 мкМ на 90,8, 71,3 и 38,5%, соответственно. При этом IC<sub>50</sub> тирофибана составила 0,4 мкМ.

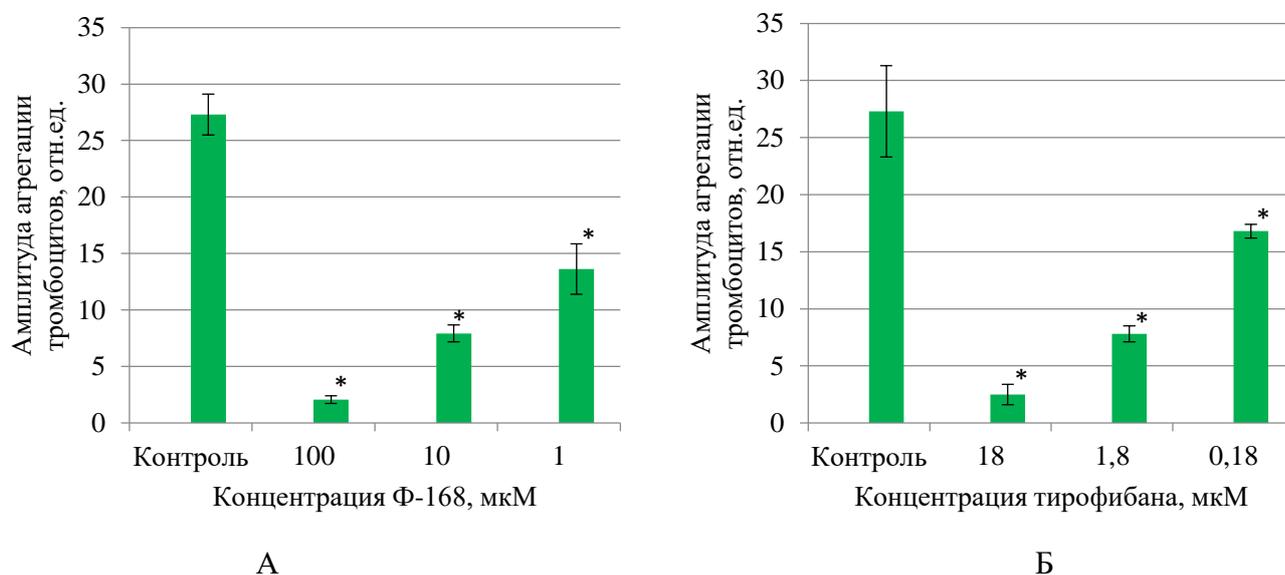


Рисунок 6. Влияние соединения Ф-168 (А) и тирофибана (Б) на агрегацию тромбоцитов плазмы доноров, индуцированную селективным агонистом PAR1 рецепторов тромбоцитов.

Примечание: \*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

TRAP (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe) является синтетическим гексапептидом, который, в отличие от тромбина активирует тромбиновые рецепторы независимо от их расщепления. В концентрациях 100, 10 и 1 мкМ соединение Ф-168 блокировало агрегацию тромбоцитов на 92,6, 79,0 и 13,7%, соответственно. IC<sub>50</sub> для образца Ф-168 при этом составила 5 мкМ. Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную TRAP в концентрациях – 18,0, 1,8, 0,18 и 0,018 мкМ на 97,7; 93,2; 91,1 и 36,7%, соответственно. При этом IC<sub>50</sub> тирофибана составила 0,032 мкМ.

Соединение Ф-168 и препарат сравнения тирофибан при внутривенном введении крысам проявили различную ингибирующую активность в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ в концентрации 200 нМ, приводящей к активации P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тромбоцитов. При этом соединение Ф-168 блокировало функциональную активность тромбоцитов на 57,4%, а препарат сравнения тирофибан ингибировал этот процесс на 33,1% (таблица 6).

Таблица 6.

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на степень активации P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тромбоцитов при внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Амплитуда агрегации тромбоцитов,	Δ% ингибирования активации P2Y <sub>12</sub> -рецепторов

			отн. ед.	тромбоцитов
1.	Контроль		10,51±0,46	
2.	Ф-168	0,89	4,89±0,56*	57,4±4,9*
3.	Тирофибан	0,9	7,69±0,44*	33,1±3,9*

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

Примечание: n-число животных в группе

В результате проведенных экспериментальных исследований по изучению механизма антиагрегантного действия соединения Ф-168 было установлено, что антитромбоцитарный эффект исследуемое вещество реализует через блокирование Пв/Ша рецепторов тромбоцитов, о чем свидетельствует подавление агрегации тромбоцитов, индуцированной лигандом TRAP. Вместе с тем, было зафиксировано, что исследуемое соединение оказывает выраженное влияние на пуриновые P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов, превосходя по уровню активности препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза.

Далее было изучено антитромбогенное действие соединения Ф-168 на различных моделях тромбоза. Поверхностная аппликация 50%-ного раствора хлорида железа (III) на сонную артерию приводит к развитию локальной реакции окислительного стресса (последовательные реакции Хабер-Вейса и Фентона), что это приводит к необратимому повреждению липидов клеточной мембраны, дисфункции эндотелия сосудов и, как следствие, тромбообразованию [Бокерия Л.А., 2021; Скугорева С.Г., 2016; Слепухина А.А., 2019; Man A.W.C., 2020]. Данные по изучению антитромботической активности представлены в таблице 7. Дозозависимое изучение антитромботической активности АФС (активной фармацевтической субстанции) Ф-168 при однократном внутривенном введении позволило рассчитать показатель ED<sub>50</sub> (эффективная доза, в которой наблюдается 50% антитромботического эффекта), который составил 1,33 мг/кг. По данному значению препарат сравнения тирофибан превосходил по активности соединение Ф-168 в 1,4 раза.

Таблица 7.

Антитромботическая активность АФС Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа (III) при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин.	Δ% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Контроль		19,4±0,4		
2.	АФС Ф-168	0,55	20,1±0,2	3,5±1,3	1,33
		1	25,8±0,4*	33,2±2,1*	
		1,5	30,8±0,5*	58,5±2,6*	
3.	Тирофибан	0,53	22,3±0,3*	15,1±1,6*	0,93
		0,75	25,3±0,3*	30,6±1,7*	
		1,06	31,6±0,8*	62,8±3,9*	

\* различия статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

На следующем этапе была изучена антитромботическая активность инъекционной лекарственной формы Ф-168 в дозе ED<sub>50</sub>, полученной на данной модели артериального тромбоза. При однократном внутривенном введении ГЛФ Ф-168 в дозе 1,33 мг/кг наблюдалось 47,4% эффекта, что согласуется с определением значения ED<sub>50</sub> и указывает на аналогичную эффективность ГЛФ Ф-168 в сравнении с чистой субстанцией (таблица 8).

Таблица 8.

Антитромботическая активность инъекционной ГЛФ Ф-168 на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа (III) при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время полной окклюзии	Δ % увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		19,6±0,3	
2.	ГЛФ Ф-168	1,33	28,9±0,5*	47,4±2,5*

3.	Тирофибан	0,93	28,7±0,9*	46,3±4,9*
----	-----------	------	-----------	-----------

\* различия статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что субстанция соединения Ф-168 обладает выраженной антитромботической активностью, сопоставимой с референсным препаратом тирофибаном. Готовая инъекционная лекарственная форма исследуемого соединения при однократном внутривенном введении в дозе ED<sub>50</sub> оказывает эквивалентный для АФС антитромботический эффект.

Применение электрического тока к адвентициальной поверхности сонной артерии приводит к образованию стабильного окклюзионного тромба [Спасов А.А., 2021; Berry С.Н., 1998]. Данные, отражающие антитромботическую активность соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана представлены в таблице 9. Однократное внутривенное введение раствора соединения Ф-168 приводило к дозозависимому пролонгированию изучаемого показателя, что позволило рассчитать значение ED<sub>50</sub> для исследуемого образца, которое составило 0,26 мг/кг.

Таблица 9.

Антитромботическая активность АФС Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время полной окклюзии	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Контроль		15,2±0,2		
2.	АФС Ф-168	0,25	22,7±0,3	49,7±2,0*	0,26
		0,5	24,4±0,6	60,6±4,2*	
		1,0	27,8±0,5	83,1±3,5*	
3.	Тирофибан	0,25	22,7±0,4	49,1±2,9*	0,30
		0,53	24,1±0,8	58,4±5,0*	
		1,0	28,2±0,4	85,9±2,9*	

\* различия статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

На втором этапе исследования была изучена инъекционная лекарственная форма. Внутривенное введение лекарственной формы в дозе 0,26 мг/кг приводило к достоверному увеличению времени окклюзии на 50,3%, что позволяет судить о высокой эффективности ГЛФ Ф-168, сопоставимой с таковой для чистой субстанции (таблица 10).

Таблица 10.

Антитромботическая активность инъекционной ГЛФ Ф-168 на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время полной окклюзии	Δ% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		15,3±0,3	
2.	ГЛФ Ф-168	0,26	23,0±0,9*	50,3±5,6*
3.	Тирофибан	0,3	22,7±0,5*	48,1±3,2*

\* различия статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

Таким образом, на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, соединение Ф-168 и его готовая инъекционная лекарственная форма продемонстрировали эквивалентное антитромбогенное действие, сопоставимое с референсным препаратом тирофибаном.

Данные по изучению влияния исследуемых веществ на выживаемость мышей в условиях адреналин-коллагенового тромбоза представлены на рисунке 7. Однократное внутривенное введение раствора соединения Ф-168 на данной модели предотвращало гибель 80% животных по сравнению с гибелью в контрольной группе.

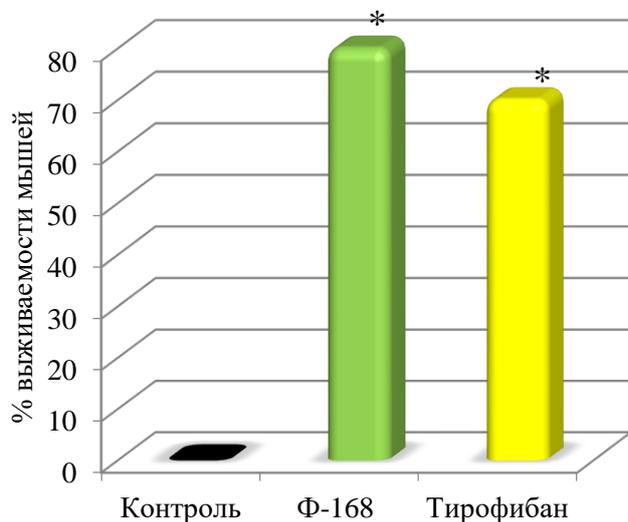


Рисунок 7. Влияние соединения Ф-168 и тирофибана на выживаемость белых беспородных мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза

Примечание: \* - ( $p \leq 0,01$ ) различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных, точный критерий Фишера

В препаратах легких контрольных животных преобладали альвеолы средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, адгезированные к сосудистой стенке и находящиеся в просвете сосуда (рисунок 8-А). Определялось значительное расширение затромбированных капилляров и межальвеолярных перегородок, а также очаговые повреждения сосудистой стенки капилляров и респираторного эпителия. В венах и венулах обнаруживались красные тромбы, а в отдельных артериолах - смешанные. У животных, получавших внутривенно однократно соединение Ф-168, было выявлено полнокровие капилляров и утолщение межальвеолярных перегородок. Также наблюдался диапедез эритроцитов в межальвеолярные перегородки. В венах и венулах определялись красные тромбы (рисунок 8-Б). В легких животных, получавших внутривенно тирофибан, преобладали

нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Обнаружены небольшие единичные тромбы в сосудах венозного типа. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия, выявлены участки умеренно выраженных кровоизлияний, явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки и просветы альвеол (рисунок 8-В). В таблице 10 представлены морфометрические характеристики тромбов на срезах легких мышей контрольной группы, а также получавших соединение Ф-168 и тирофибан.

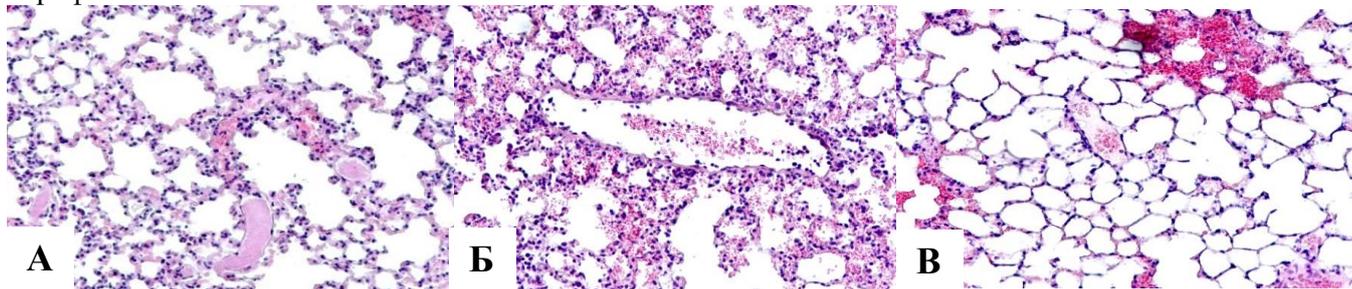


Рисунок 8. Тромбообразование, вызванное введением смеси коллагена и адреналина в срезах гистологических образцов легких мышей контрольной группы (А), при однократном внутривенном введении соединения Ф-168 (Б) и тирофибана (В). Окраска гематоксилином и эозином об.х10

Таблица 11.

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана при однократном внутривенном введении на морфометрические параметры тромбов в сосудах легких мышей ( $M \pm SEM$ ) ( $n=10$ )

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Средняя площадь тромбов на срезе, $\mu\text{m}^2$
1.	Контроль		$9438,56 \pm 1367,32$
2.	Ф-168	0,89	$3492,52 \pm 924,17^*$
3.	Тирофибан	0,9	$3569,79 \pm 1061,64^*$

\* различия статистически значимы по отношению к значениям, полученным в контроле (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

Изучение антитромботической активности соединения Ф-168 на модели венозного тромбоза при однократном внутривенном введении позволило заключить, что исследуемая субстанция способна предотвращать не только артериальные, но и венозные тромбозы. В группе контроля после лигирования нижней полой вены через сутки наблюдалось образование массивных тромбов, средняя масса которых составила 110,3 мг. В опытной группе животных, которым внутривенно вводилось соединение Ф-168, средняя масса тромбов была статистически значимо ниже относительно значений, полученных в

контроле, на 83,0% (таблица 12). Средняя масса тромбов, изъятых из вен животных, получавших препарат сравнения тирофибан, составила 31,4 мг (таблица 12).

Таблица 12.

Антитромбогенное действие соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибан на модели тромбоза нижней полой вены крыс при однократном внутривенном введении ( $M \pm SEM$ ) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Исследуемая доза, мг/кг	Масса тромба, мг
1	Интактные крысы (контроль)	-	110,3±9,4
2	Ф-168	0,89 <sup>1</sup>	18,7±5,3*
3	Тирофибан	0,9 <sup>1</sup>	31,4±3,3*

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Примечание: n- количество животных в группе, <sup>1</sup>-дозы ED<sub>50</sub>, полученные при изучении антиагрегантной активности *in vivo*.

В таблице 13 представлены данные по антитромботической активности Ф-168, полученные в ходе эксперимента на крысах с экспериментальным некоронарогенным инфарктом миокарда. Субстанция соединения Ф-168 при однократном внутривенном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда достоверно пролонгировала время наступления полной окклюзии сонной артерии на 90,5% больше, чем в группе контрольных животных с данной патологией.

Таблица 13.

Антитромботическая активность АФС Ф-168 при однократном внутривенном введении на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-ного раствора FeCl<sub>3</sub> (III) при экспериментальном инфаркте миокарда и у интактных животных ( $M \pm SEM$ ) (n=6)

№п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		14,7±0,5	
2.	АФС Ф-168	1,33	28,0±1,5*	90,5±4,4*
3.	ГЛФ Ф-168		26,7±2,0*	81,4±13,8*
4.	Тирофибан	0,93	25,9±0,5*	76,3±3,3*

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05);

Примечание: n- число животных в каждой группе.

В условиях экспериментальной патологии, сопровождающейся значительным увеличением тромбогенного потенциала крови, установлена высокая эффективность чистой субстанции и инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168. При этом, раствор АФС Ф-168 превосходил по активности препарат сравнения тирофибан в 1,2 раза, а ГЛФ Ф-168 - в 1,1 раза.

Изучение фармакокинетики – кинетики всасывания, распределения и элиминации в организме является составной частью доклинических испытаний фармакологических средств. В таблицах 14 и 15 представлены данные по изучению фармакокинетики чистой субстанции и готовой лекарственной формы соединения Ф-168.

Таблица 14.

Фармакокинетические параметры соединения Ф-168 в плазме крови крыс при однократном внутривенном введении

Параметр	Значение в плазме
AUC (нг*час/мл)	
T <sub>1/2</sub> (час)	
Cl (л/(час/кг))	
Vd (л/кг)	

Таблица 15.

Фармакокинетические параметры субстанции и готовой инъекционной лекарственной формы Ф-168 в плазме крови кроликов при однократном внутривенном введении

Параметр	АФС Ф-168	ГЛФ Ф-168
AUC (нг*час/мл)	136,9±6,37	133,65±4,09
T <sub>1/2</sub> (час)	1,072±0,093	1,124±0,094
Cl (л/(час/кг))	9,73±0,46	9,96±0,31
Vd (л/кг)	15,04±1,25	16,13±1,01
F отн. %	97,88±7,32	

Статистически значимых различий в фармакокинетических параметрах активной фармацевтической субстанции и готовой инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 обнаружено не было. Относительная биодоступность при этом составила 97,88%.

Проведенное углубленное исследование нового производного ксантина соединения Ф-168 и его готовой инъекционной лекарственной формы позволяет заключить, что данное вещество обладает выраженной антитромботической активностью, обусловленной Пб/Ша-антагонистической активностью. Полученные данные по эффективности и токсикологическому профилю явились основанием для проведения I фазы клинических исследований.

В 5 главе представлено доклиническое исследование нового производного N9-имидазо[3,2-a]бензимидазола соединения RU-891 и его готовой лекарственной формы для приема внутрь. На начальном этапе было проведено изучение влияния соединения RU-891 на различные стадии функциональной активности тромбоцитов. В результате выполненных исследований показано, что соединение RU-891 статистически значимо блокирует адгезию тромбоцитов на микрофибриллах коллагена только в концентрации 100 мкМ (29,9%, по отношению к контролю). В более низких концентрациях тестируемая субстанция практически не оказывает действия на данный процесс. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в исследованных концентрациях не оказывает выраженного влияния на адгезию тромбоцитов. Следовательно, можно сделать вывод об отсутствии влияния соединения RU-891 на адгезивные гликопротеиновые VI рецепторы кровяных пластинок. Вещество сравнения MRS-2179, проявляющее свойства селективного антагониста по отношению к P2Y<sub>1</sub>-рецепторам тромбоцитов в концентрации 1 мкМ ингибировало активацию тромбоцитов на 80,3%. Соединение RU-891 не оказывает блокирующего действия на активацию начальных этапов процесса агрегации тромбоцитов, вызванную экспрессией P2Y<sub>1</sub> рецепторов на поверхности кровяных пластинок, в отличие от селективного антагониста данного подтипа рецепторов вещества MRS-2179. Следовательно, можно заключить, что антиагрегантный эффект RU-891 не связан с влиянием на P2Y<sub>1</sub> рецепторы тромбоцитов.

В активированных тромбоцитах протекает сложный комплекс внутриклеточных реакций, пусковым механизмом для которых служит сигнал, полученный через активацию P2Y рецепторов тромбоцитов, ряда интегринов, тромбоксановых рецепторов, серотонина и др. Из плотных гранул хранения тромбоцитов активно секретируется АТФ, способная активировать и вовлекать в процесс тромбообразования циркулирующие тромбоциты [Медведев И.Н., 2016; Suades R., 2022]. После инкубации тест-системы с раствором соединения RU-891 в концентрации 100 мкМ уровень секретируемой АТФ составил 3,8 нг/мл, что на 93,2% достоверно ниже контрольных значений. Дозозависимое исследование влияния соединения RU-891 на данный процесс позволило определить величину IC<sub>50</sub>, которая составила для соединения RU-891 3,0 мкМ. По данному параметру исследуемое соединение превосходит по активности ацетилсалициловую кислоту в 7,1 раза (таблица 16).

Таблица 16.

Влияние соединения RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на секрецию АТФ из плотных гранул тромбоцитов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	Уровень АТФ, нг/мл	Δ% ингибирования секреции АТФ	IC <sub>50</sub> , мкМ
1.	Контроль		55,8±3,6		
2.	RU-891	100	3,8±0,6*	93,2±1,1*	3,0
3.		10	15,5±2,4*	72,2±4,4*	
4.		1	37,9±3,9*	32,1±7,0*	
5.	Ацетилсалициловая кислота	100	16,8±2,4*	70,0±4,4*	21,3
6.		10	33,1±4,9*	40,7±8,7*	
7.		1	50,3±1,9	9,9±3,3	

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Таким образом, подавление секреции АТФ тромбоцитами под воздействием соединения RU-891 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты говорит о снижении способности кровяных пластинок к дегрануляции и образованию стабильных агрегатов. Однако, соединение RU-891 в значительно большей степени способствует снижению уровня секретируемой АТФ, по сравнению с ацетилсалициловой кислотой.

P-селектин – белок клеточной адгезии находится в α-гранулах тромбоцитов и после их активации сильными индукторами экспрессируется на поверхности и поэтому служит маркером активации тромбоцитов, как *in vitro*, так и *in vivo*. Активированные тромбоциты взаимодействуют с лейкоцитами

крови, способствуя их мобилизации в зону повреждения, в результате чего возникает провоспалительная активация эндотелиальных клеток. При активации тромбоцитов коллагеном уровень Р-селектина достоверно повышался на 21,2% относительно интактных тромбоцитов (таблица 17). При однократном внутрижелудочном введении соединения RU-891 уровень Р-селектина снижался на 27,0% по отношению к контрольным образцам с активированными тромбоцитами. Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел также снижали уровень данного показателя в плазме при активации тромбоцитов коллагеном, уменьшая его на 24,0 и 36,9%, соответственно (таблица 17).

Таблица 17.

Влияние соединения RU-891, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на уровень Р-селектина в активированных коллагеном тромбоцитах крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень Р-селектина, нг/мл
1.	Контроль (интактные тромбоциты)		34,9±2,2
2.	Контроль (активированные тромбоциты)		44,5±2,4 <sup>#</sup>
3.	RU-891	23,0	32,5±1,2 <sup>*</sup>
4.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	33,8±1,5 <sup>*</sup>
5.	Клопидогрел	9,0	28,1±1,8 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>- различия статистически значимы относительно контроля (интактные тромбоциты), критерий Манна-Уитни (p<0,05)

<sup>\*</sup>- различия статистически значимы относительно контроля (активированные тромбоциты), критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Достоверное снижение уровня Р-селектина под влиянием RU-891 свидетельствует о способности предупреждать тромбообразование на достаточно ранней стадии.

Циклооксигеназа 1-го типа (ЦОГ-1) тромбоцитов катализирует превращение арахидоновой кислоты в простагландины, которые затем трансформируются в тромбоксан А<sub>2</sub> под действием тромбоксансинтазы. Тромбоциты экспрессируют специфические рецепторы к тромбоксану, стимуляция которых приводит к усилению первичной активации клеток, вызванной тромбином или коллагеном [Zhang L., 2022]. При активации тромбоцитов арахидоновой кислотой уровень ЦОГ-1 достоверно повысился в 1,8 раза относительно интактных тромбоцитов и составил 5,7 нг/мл (таблица 18). При однократном внутрижелудочном введении ацетилсалициловой кислоты уровень ЦОГ-1 снижался в 3,8 раза по сравнению с контрольными значениями до 1,5 нг/мл. В отличие от препарата сравнения RU-891 не оказывал влияния на уровень ЦОГ-1.

Таблица 18.

Влияние соединения RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на уровень ЦОГ-1 в активированных арахидоновой кислотой (50 мкМ) тромбоцитах крыс при однократном внутрижелудочном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ЦОГ-1, нг/мл	Δ% ингибирования синтеза ЦОГ-1
1.	Контроль (интактные тромбоциты)		3,1±0,4	
2.	Контроль (активированные тромбоциты)		5,7±0,3 <sup>*</sup>	
3.	RU-891	23,0	5,0±0,5	15,3±7,4
4.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	1,5±0,2 <sup>*</sup>	73,1±4,3 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

В результате проведенных исследований действия соединения RU-891 на уровень ЦОГ-1 в интактных и активированных арахидоновой кислотой тромбоцитах крыс было показано отсутствие влияния на данный показатель. ЦОГ-1 присутствует практически во всех тканях организма человека, в тромбоцитах данный фермент обеспечивает превращение арахидоновой кислоты в тромбоксан А<sub>2</sub> [Belton O., 2003]. Следовательно, отсутствие влияния RU-891 на уровень ЦОГ-1 показывает, что механизм антиагрегантного действия данного соединения не связан с прямым ингибированием данного фермента.

На втором этапе доклинического исследования соединения RU-891 было проведено изучение фармакокинетических параметров активной фармацевтической субстанции (АФС) и готовой лекарственной формы (ГЛФ) для приема внутрь. Основные фармакокинетические параметры рассчитаны по зависимости концентрации соединения в плазме крыс от времени. Данные, полученные в ходе эксперимента представлены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19.

Фармакокинетические параметры соединения RU-891 в плазме крови крыс при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг

Параметры	Значение в плазме
AUC (мкг*час/мл)	4,89
T <sub>1/2</sub> (час)	0,97
Cl (л/час/кг)	4,71
Vd (л/кг)	6,57
Абс. биодоступность, %	84,0

Таблица 20.

Фармакокинетические параметры при внутривенном введении АФС RU-891 и ГЛФ RU-891 кроликам в дозе 23 мг/кг (M±SEM)

Параметры	АФС RU-891	ГЛФ RU-891
AUC (мкг*час/мл)	5,06±0,16	4,72±0,15
T <sub>1/2</sub> (час)	2,59±0,27	2,6±0,31
Cl (л/час/кг)	4,55±0,15	4,87±0,15
Vd (л/кг)	17,07±2,21	18,28±2,21
Отн. биодоступность, %	93,38	

ГЛФ RU-891 биоэквивалентна субстанции соединения RU-891, относительная биодоступность составляет 93,38%. Сопоставимость фармакокинетических параметров позволяет сделать выводы, о том, что вспомогательные вещества, входящие в состав ГЛФ RU-891 не влияют на фармакокинетические свойства и достоверно не изменяют фармакокинетических параметров.

Следующим этапом изучения соединения RU-891 явилось исследование его антитромботических свойств на различных моделях тромбоза. На первом этапе была изучена антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутривенном введении крысам в дозах ED<sub>50</sub>, полученных при изучении антиагрегантной активности в опытах *in vivo*, которые составили 23,0; 34,4 и 9,0 мг/кг соответственно. На втором этапе дозы соединения RU-891 и препаратов сравнения были уменьшены или увеличены в зависимости от проявленного эффекта (рисунок 9). Изученное соединение и препараты сравнения по выраженности антитромботической активности с учетом ED<sub>50</sub> можно расположить в следующем порядке: RU-891>ацетилсалициловая кислота>клопидогрел. При этом по показателю данного вида активности соединение RU-891 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 4 раза, а клопидогрел – в 4,8 раза.

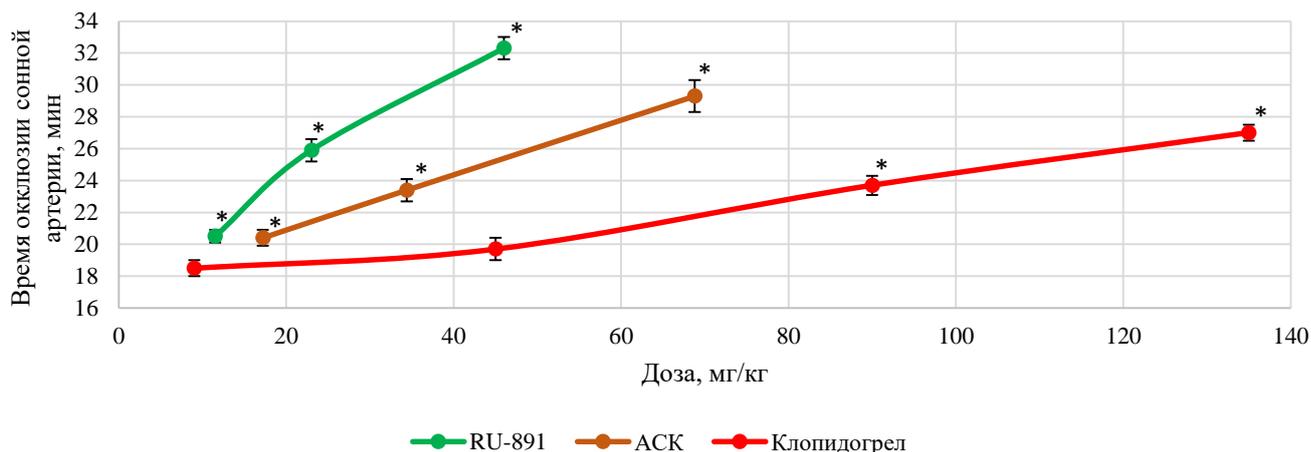


Рисунок 9. Антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) при однократном внутривенном введении  
Примечание: АСК-ацетилсалициловая кислота, \*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

На втором этапе была изучена антитромботическая активность готовой лекарственной формы соединения RU-891. В отличие от чистой субстанции ГЛФ RU-891 на данной модели артериального тромбоза оказывала более выраженное антиромботическое действие, пролонгируя время образования тромба на 58,6% (таблица 21).

Таблица 21.

Антитромботическая активность ГЛФ RU-891 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа (III) при однократном внутрижелудочном введении ( $M \pm SEM$ ) ( $n=6$ )

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин.	$\Delta\%$ увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		18,7±0,3	
2.	ГЛФ RU-891	26,8	29,7±0,6*	58,6±3,0*
3.	Ацетилсалициловая кислота	51,0	27,9±0,5*	49,3±2,8*
4.	Клопидогрел	127,5	29,2±0,6*	56,0±3,2*

\* - различия статистически значимы по отношению к контролю (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

Другая модель тромбоза сонной артерии-электрическим током-связана с ключевой ролью активации тромбоцитарного звена гемостаза в начальных механизмах его развития [Спасов А.А., 2016]. Введение RU-891 и препаратов сравнения в дозах  $ED_{50}$  антиагрегантной активности однократно внутрижелудочно за два часа до воздействия тромботического агента в различной степени предупреждало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс (рисунок 10). В результате дозозависимого изучения соединения RU-891 и препаратов сравнения было установлено, что значение  $ED_{50}$  для исследуемого вещества составило 11,0 мг/кг, а для ацетилсалициловой кислоты и клопидогреля 39,4 и 12,4 мг/кг соответственно.

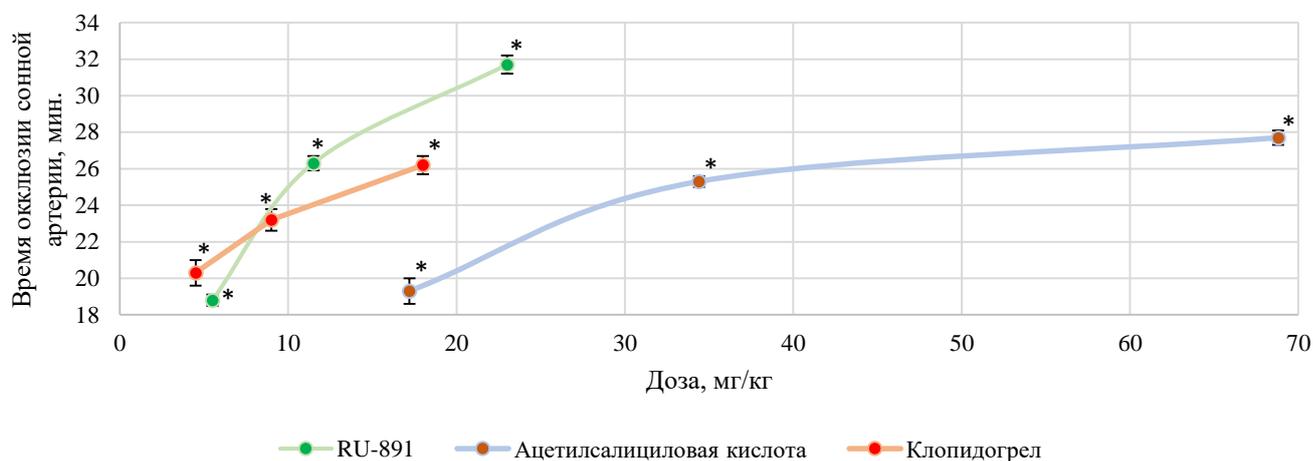


Рисунок 10. Антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутрижелудочном введении  
Примечание: \* - различия статистически значимы по отношению к контролю (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

По антитромботической активности на модели данного артериального тромбоза, при однократном внутрижелудочном введении соединение RU-891 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 7,2 раза и было сравнимо с клопидогрелем. Введение ГЛФ RU-891 в терапевтической дозе 23,0 мг/кг однократно внутрижелудочно за два часа до воздействия тромботического агента предупреждало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс. При этом тестируемая готовая лекарственная форма RU-891 статистически значимо пролонгировала время образования тромба до 27,0 мин, что на 85,0% больше значений полученных в группе контрольных животных.

На модели адреналин-коллагенового тромбоза соединение RU-891 в дозе 23 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении предотвращала гибель 80% животных по сравнению со 100% гибелью в контрольной группе. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 34,4 мг/кг увеличивала количество выживших животных до 40%, а клопидогрел – до 50% (рисунок 11).

Гистологическое исследование тканей легких животных контрольной группы позволило выявить кровоизлияния очагового и сливного характера. Преобладали альвеолы средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, адгезированные к сосудистой стенке и расположенные в просвете сосуда. Определялось выраженное расширение тромбированных капилляров межальвеолярных перегородок. Отмечались очаговые повреждения сосудистой стенки капилляров и респираторного эпителия. В венах и венулах обнаруживались красные тромбы (рисунок 12-А). У мышей, получавших однократно внутрижелудочно препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, наряду с альвеолами средних размеров, встречались эмфизематозно расширенные альвеолы. Преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Выявлялись небольшие единичные тромбы, преимущественно, в сосудах венозного типа. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия (рисунок 12-Б). При исследовании легких мышей, получавших клопидогрел, встречались полнокровные сосуды с периваскулярным отеком, визуализировались единичные тромбы в венах, как правило, адгезированные к сосудистой стенке. Выявлялись небольшие единичные тромбы, с частичной обтурацией просвета сосуда. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека (рисунок 12-В). У животных, получавших соединение RU-891, встречались полнокровные сосуды с периваскулярным отеком. В легких мышей преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Обнаруживалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия и отека, явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в просвет некоторых альвеол, очаговые мелкие кровоизлияния. Выявлялась единичные тромбы в венах и венулах (рисунок 12-Г).

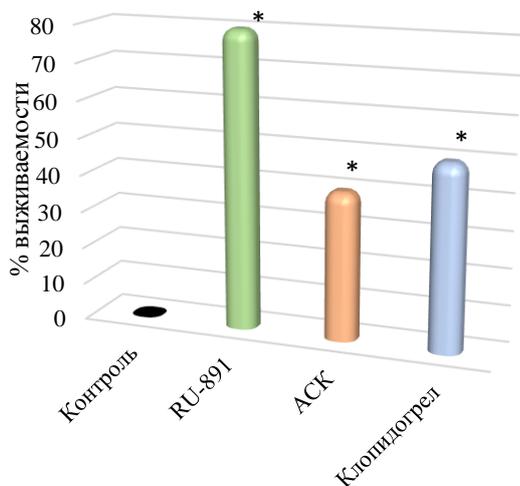


Рисунок 11. Влияние соединения RU-891, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутрижелудочном введении на выживаемость белых беспородных мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза у мышей. \*( $p < 0,05$ ) различия статистически значимы по

встречались полнокровные сосуды с периваскулярным отеком. В легких мышей преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Обнаруживалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия и отека, явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в просвет некоторых альвеол, очаговые мелкие кровоизлияния. Выявлялась единичные тромбы в венах и венулах (рисунок 12-Г).

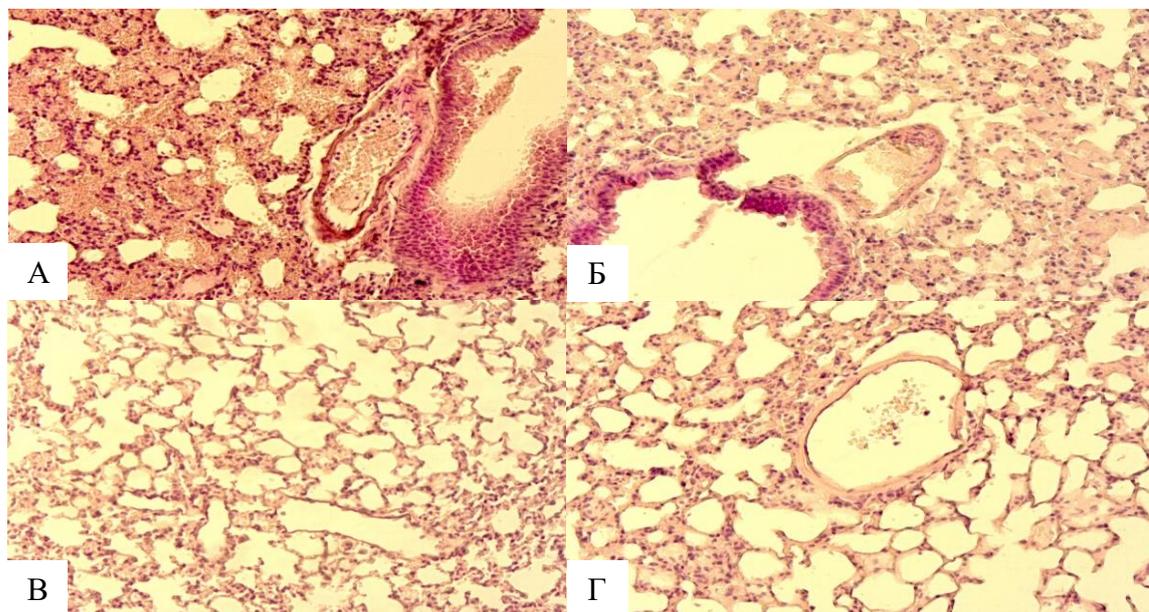


Рисунок 12. Тромбообразование в срезах гистологических образцов легких мышей контрольной группы (А), животных, получавших ацетилсалициловую кислоту (Б), клопидогрел (В) и соединение RU-891 (Г), вызванное введением смеси коллагена и адреналина. Окраска гематоксилином и эозином об.х10

Соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении снижает среднюю площадь тромбов (таблица 22) на срезе легкого в 5,4 раза по отношению к контролю и превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения - ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел.

Таблица 22.

Влияние соединения RU-891 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на морфометрические параметры тромбов в сосудах легких мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза ( $M \pm SEM$ ) ( $n=10$ )

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Средняя площадь тромба на срезе, $\mu\text{м}^2$
1.	Контроль		$626888,75 \pm 187298,76$
2.	RU-891	23,0	$115375,82 \pm 51135,28^*$
3.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	$235103,01 \pm 96910,05^*$
4.	Клопидогрел	9,0	$179710,19 \pm 66165,18^*$

\*- ( $p \leq 0,001$ ); различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони

В результате изучения антитромбогенных свойств соединения RU-891, также была установлена высокая антитромботическая активность исследуемого вещества в терапевтической дозе на модели венозного тромбоза. В группе контрольных животных после перевязки нижней полой вены через сутки наблюдалось образование тромбов, средняя масса которых составила 99,9 мг. В опытной группе животных, которым вводилась АФС RU-891 средняя масса тромбов, была статистически значимо ниже относительно значений, полученных в контроле в 3,6 раза. Средняя масса тромбов, изъятых из вен животных, получавших ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел, также была статистически значимо меньше контрольных значений в 1,5 и 1,7 раза, соответственно (таблица 23). Следовательно, АФС RU-891 при однократном внутрижелудочном введении животным в терапевтической дозе проявила высокую антитромботическую активность и достоверно превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,4 и 2,1 раза, соответственно.

Таблица 23.

Антитромботическая активность АФС RU-891 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении крысам на модели тромбоза нижней полой вены крыс в дозах  $ED_{50}$  антиагрегантной активности *in vivo* ( $M \pm SEM$ ) ( $n=6$ )

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Масса тромба, мг
1	Контрольная группа	-	$99,9 \pm 7,8$
2	АФС RU-891	23,0	$27,2 \pm 9,5^{* \#}$
3	Ацетилсалициловая кислота	34,4	$65,4 \pm 3,9^*$
4	Клопидогрел	9,0	$58,7 \pm 1,4^*$

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,0001$ )

#- различия статистически значимы относительно препаратов сравнения, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,0001$ )

Важным этапом исследования явилось изучение эффективности соединения RU-891 в условиях экспериментального инфаркта миокарда. В группе интактных животных время наступления полной окклюзии сосуда составило 18,2 минуты, что соответствует данным, полученным другими исследователями [Randal J., 2007] (таблица 24). В группе животных с экспериментальным инфарктом миокарда, время образования тромба достоверно сокращалось до 14,3 мин., что свидетельствует о значительном увеличении тромбогенного потенциала крови при формировании данной патологии. АФС RU-891 при однократном внутрижелудочном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда статистически значимо пролонгировала время наступления полной окклюзии сонной артерии до 21,2 мин., что на 48,0 % больше, чем в группе контрольных животных с данной патологией (таблица 24).

Таблица 24.

Антитромботическая активность АФС RU-891 препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа (III) в условиях экспериментального инфаркта миокарда (M±SEM) (n=5)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% пролонгирования времени образования тромба
1.	Контроль		18,2±0,6	
2.	Контроль (инфаркт)		14,3±0,7 <sup>#</sup>	
3.	АФС RU-891	23,0	21,2±0,8 <sup>*&amp;</sup>	48,0±5,5 <sup>*&amp;</sup>
4.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	17,5±0,6 <sup>*</sup>	22,4±3,9 <sup>*</sup>
5.	Клопидогрел	9,0	20,7±0,9 <sup>*</sup>	44,5±6,2 <sup>*</sup>

\*- различия статистически значимы относительно контроля (инфаркт), критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

#- различия статистически значимы относительно интактного контроля критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

&- различия статистически значимы относительно препарата сравнения ацетилсалициловая кислота критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел при однократном внутрижелудочном введении животным с экспериментальной патологией достоверно увеличивали время наступления окклюзии сонной артерии до 17,5 и 20,7 мин. соответственно, уступая при этом по активности АФС RU-891.

В результате выполненных исследований было показано, что у животных с экспериментальным инфарктом миокарда на модели артериального тромбоза, индуцированного раствором хлорида железа (III), время образования тромба статистически значимо уменьшается по сравнению с группой интактных крыс, что свидетельствует о повышенном тромбогенном потенциале крови у крыс с экспериментальной патологией. При этом соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении крысам в условиях инфаркта достоверно пролонгировало время наступления полной окклюзии сосуда на 48,0% по сравнению с контрольной группой животных с экспериментальной патологией. ГЛФ RU-891 в условиях патологии также продемонстрировала высокую антитромботическую активность при однократном внутрижелудочном введении статистически не значимо превосходя активность чистой субстанции RU-891 в 1,3 раза в аналогичных условиях эксперимента.

Таблица 25.

Антитромботическая активность ГЛФ RU-891 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50 %-ным раствором хлорида железа (III) в условиях экспериментального инфаркта миокарда.

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% пролонгирования времени образования тромба
1.	Контроль 1		18,2±0,6	-
2.	Контроль 2 (экспериментальный инфаркт миокарда)		13,5±0,6 <sup>#</sup>	-
3.	ГЛФ RU-891	23,0	21,7±0,9 <sup>*&amp;</sup>	60,5±6,5 <sup>*&amp;</sup>
4.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	17,5±0,6 <sup>*</sup>	22,4±3,9 <sup>*</sup>
5.	Клопидогрел	9,0	20,7±0,9 <sup>*</sup>	44,5±6,2 <sup>*</sup>

\*- различия статистически значимы относительно контроля (инфаркт), критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

#- различия статистически значимы относительно интактного контроля критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

&- различия статистически значимы относительно препарата сравнения ацетилсалициловая кислота критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

При изучении хронической токсичности было показано, что в токсикологическом плане соединение RU-891 при 6-ти месячном внутрижелудочном введении крысам в дозах 23 мг/кг и 230 мг/кг

является безопасным. В дозе 460 мг/кг оно проявляет незначительное токсическое действие, которое полностью нивелируется после отмены тестируемой субстанции. В плане доклинической оценки общетоксических свойств ГЛФ RU-891 в дозах 11 мг/кг и 110 мг/кг при 6-месячном внутрижелудочном введении кроликам является не токсичной и безопасной, поскольку не вызывает необратимых изменений в общем состоянии, поведении, гематологических параметрах, биохимических показателях крови и мочи, функциональной активности сердца.

Таким образом, комплекс проведенных исследований по изучению механизма антиагрегантного действия соединения RU-891 и его антитромбогенных свойств позволяет заключить, что данное вещество является высокоэффективным корректором повышенного тромбогенного потенциала крови, с достаточно широким диапазоном условного терапевтического индекса (УТИ 68,6), что подтверждает безопасность применения данного вещества. Двойной механизм антиагрегантного действия (блокатор P2Y<sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов и ингибитор синтеза тромбосана А<sub>2</sub>) делает более предпочтительным применение соединения RU-891 в качестве средства профилактики острых тромботических событий.

При инициации I фазы клинических исследований необходимо провести расчеты максимально рекомендованной начальной дозы. В результате оценки токсикологического профиля соединения RU-891 было установлено, что МРНД для человека массой 70 кг составит 270 мг.

**6 глава** описывает исследование антиагрегантных и антитромбогенных свойств нового производного тиадиазина соединения L-36 (5-фенил-2-морфолино-6*H*-1,3,4-тиадиазин). На первом этапе исследований было проведено изучение влияния соединения L-36 на процессы адгезии, активации и секреции тромбоцитов. Исследование влияния соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на процессы адгезии тромбоцитов проводилось с помощью люми-агрегометра Chronolog-700 импедансным методом детекции. При изучении адгезивных свойств тромбоцитов было установлено, что интактные тромбоциты (контроль) адгезируются на микрофибриллах коллагена со значением импеданса 18,7 Ом. Добавление в тест-систему соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты в концентрации 100 мкМ способствовало снижению импеданса до 14,0 (p<0,05) и 14,2 Ом (p<0,05), соответственно. При изучении тестируемых образцов в концентрациях 10 и 1 мкМ не было зафиксировано достоверно отличающихся от контроля значений импеданса.

Активация тромбоцитов может осуществляться различными молекулами [Khodadi E., 2020]. Данный процесс осуществляется через стимуляцию P2Y<sub>1</sub> рецептора молекулами АДФ и АТФ, секретиремыми из уже активированных тромбоцитов, а также из поврежденных клеток тканей организма [Tomaiuolo M., 2017]. Методом малоуглового светорассеяния было исследовано влияние селективного антагониста P2Y<sub>1</sub> рецептора тромбоцитов вещества MRS-2179 и соединения L-36 на активацию тромбоцитов *in vitro* (таблица 26). Было установлено, что тестируемый образец под шифром L-36 не оказывает выраженного ингибирующего действия в отношении активации тромбоцитов, что позволяет предположить отсутствие у данного соединения P2Y<sub>1</sub>-блокирующих свойств.

Таблица 26.

Влияние соединений L-36 и MRS-2179 на активацию тромбоцитов, вызванную стимуляцией P2Y<sub>1</sub> рецепторов тромбоцитов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Уровень активации тромбоцитов, отн.ед.	Δ% ингибирования активации тромбоцитов
1	Контроль	1,39±0,08	
2	L-36	1,25±0,02	10,3±1,4
3	MRS-2179	0,13±0,03	91,0±1,9*

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)  
n-количество проб в каждой группе

Секреция гранул играет решающую роль в усилении активации тромбоцитов, в рекрутировании циркулирующих тромбоцитов в агрегаты и важна для стабилизации тромба. Таким образом, его можно рассматривать как механизм ауторегулирования тромбообразования. Секреция гранул также играет важную роль в воспалении, атеросклерозе, заживлении ран, ангиогенезе и злокачественных новообразованиях [Li Z., 2010]. Уровень секреции АТФ в контроле составил 65,4 нМ (таблица 27). После инкубации цельной крови с 100 мкМ соединения L-36 наблюдалось падение уровня АТФ на 92,0% (p<0,05). Снижение конечной концентрации соединения L-36 до 10 мкМ способствовало ингибированию пула АТФ из плотных гранул до 18,2 нМ, что на 72,2% (p<0,05) ниже уровня контрольных значений. В концентрации 1 мкМ исследуемое вещество на 24,6% (p<0,05) способствовало снижению секреции гранул хранения. Такое дозозависимое проявление активности позволило

рассчитать значение  $IC_{50}$ , которое для соединения L-36 составило 4,1 мкМ (таблица 27). Синтезируемый в активированном тромбоците тромбоксан  $A_2$  способствует активации других кровяных пластинок через G-белок-сопряженные тромбоксановые рецепторы, а также способствует секреции внутриклеточных депо хранения тромбоцитов, по механизму ауторегуляции [Yun S.H., 2016]. Таким образом, ацетилсалициловая кислота также в некоторой степени способствует торможению секреции гранул хранения через подавление синтеза тромбоксана  $A_2$ . В концентрации 100 мкМ препарат сравнения ингибировал пул АТФ на 58,2% ( $p < 0,05$ ). Дальнейшее уменьшение исследуемых концентраций ацетилсалициловой кислоты до 10 и 1 мкМ сопровождалось угнетением секреции АТФ на 26,0 ( $p < 0,05$ ) и 4,9%, соответственно. Показатель  $IC_{50}$  при этом составил 57,8 мкМ.

Таблица 27.

Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на секрецию АТФ из плотных гранул тромбоцитов ( $M \pm SEM$ ) ( $n=6$ )

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	Уровень АТФ, нМ	$\Delta\%$ ингибирования секреции АТФ	$IC_{50}$ , мкМ
1	Контроль		65,4±1,8		
2	L-36	100	5,2±1,4*#	92,0±2,2*#	4,1
3		10	18,2±1,9*#	72,2±2,9*#	
4		1	49,3±3,2*#	24,6±4,9*#	
5	Ацетилсалициловая кислота	100	27,3±2,5*	58,2±3,9*	57,8
6		10	48,4±1,7*	26,0±2,6*	
7		1	62,2±1,0	4,9±1,6	

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,05$ )

#- различия статистически значимы относительно ацетилсалициловой кислоты в той же концентрации, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,05$ )

n-количество проб в каждой группе

По уровню активности (величина  $IC_{50}$ ) соединение L-36 превосходит препарат сравнения в 14,1 раза.

В ходе изучения влияния соединения L-36 на  $P2Y_{12}$  рецепторы тромбоцитов было показано, что в дозе  $ED_{50}$  антиагрегантной активности *in vivo*, данное вещество блокировало  $P2Y_{12}$ -опосредованную агрегацию тромбоцитов на 17,0% (таблица 28). Блокатор указанного подтипа пуриновых рецепторов клопидогрел в эквимолярной дозе способствовал ингибированию  $P2Y_{12}$ -опосредованной агрегации тромбоцитов на 67,8% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 28.

Влияние соединения L-36 и клопидогрела на  $P2Y_{12}$  рецепторы тромбоцитов *in vivo* ( $M \pm SEM$ ) ( $n=6$ )

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов
1	L-36	27,8	17,0±4,0
2	Клопидогрел	25,1*	67,8±9,7#

\*-доза, эквимолярная дозе соединения L-36

#- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,05$ )

n-количество животных в каждой группе

Стимуляция  $P2Y_{12}$  рецепторов тромбоцитов происходит в значительно более низких концентрациях АДФ (200 нМ), в сравнении со стандартным методом изучения агрегации тромбоцитов. Это позволяет дифференцировать метод малоуглового светорассеяния с применением низких концентраций АДФ как более селективный [Деркачев Э.Ф., 1998]. Препарат сравнения проявил статистически высокий уровень активности на данной модели эксперимента, что подтверждает механизм его действия. Исследуемое соединение выраженной активности не продемонстрировало, что позволяет сделать вывод об отсутствии у соединения L-36  $P2Y_{12}$ -блокирующих свойств.

Образовавшийся из арахидоновой кислоты тромбоксан  $A_2$  является сильным агонистом, стимулирующим процессы агрегации через активацию тромбоксановых рецепторов тромбоцитов [Баринов Э.Ф., 2016]. U46619 является аналогом тромбоксана  $A_2$ , соответственно селективно оказывает стимулирующее действие на тромбоксановые рецепторы тромбоцитов [Zhang Y., 2017]. Инкубация тест-системы с 100 мкМ соединения L-36 способствовала достоверному снижению амплитуды агрегации кровяных пластинок на 12,8% ( $p < 0,05$ ). Согласно литературным данным, блокатор

тромбоксановых рецепторов тромбоцитов ридогрел выраженно ингибирует агрегацию кровяных пластинок, стимулированную агонистом U46619, с показателем IC<sub>50</sub> 1,2 мкМ [Hoet B., 1990]. Таким образом, селективный антагонист тромбоксановых рецепторов значительно превосходит по активности соединение L-36, что указывает на незначительное влияние исследуемого вещества на данные рецепторы.

Измерение тромбоксана B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) в сыворотке является показательным тестом, который позволяет оценить влияние потенциальных антиагрегантных средств на активность ЦОГ-1 в тромбоцитах. Измерение TxB<sub>2</sub> может служить потенциальным биомаркером риска развития тромботических состояний [Szczyko M., 2021]. На рисунке 13 представлены данные по изучению влияния соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень TxB<sub>2</sub>. Исследуемое соединение и препарат сравнения оказывали дозозависимое ингибирующее влияние на синтез тромбоксана. Показатели ED<sub>50</sub> при этом составили 24,4 и 48,8 мкМ. Тестируемое соединение L-36 обладает выраженной активностью в отношении синтеза тромбоксана A<sub>2</sub>, что может обуславливать антиагрегантную активность данной молекулы. По влиянию на данный процесс соединение L-36 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 2 раза.

Дисфункция эндотелия является часто встречающимся осложнением основных заболеваний (сахарный диабет, ишемические повреждения, септические состояния и др.). Показательным биомаркером эндотелиальной дисфункции является эндотелин-1 [Петриков А.С., 2013; Калинин Р.Е., 2019]. Липополисахарид в дозе 2 мг/кг при внутривенном введении способствует развитию дисфункции эндотелия [Piechota-Polańczyk A., 2012; Abdul Y., 2020]. При однократном внутривенном введении раствора липополисахарида наблюдалось достоверное увеличение концентрации эндотелина-1 в плазме крыс в 15,8 раза относительно интактных животных (рисунок 14). В группе животных, получавших однократно соединение L-36 в дозе 27,8 мг/кг, на фоне сепсиса наблюдалось снижение концентрации эндотелина-1 на 34,8% (p<0,05). Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота не проявил выраженного ингибирующего влияния на продукцию эндотелина-1 [Hurlen M., 2001; Saeed A., 2011].

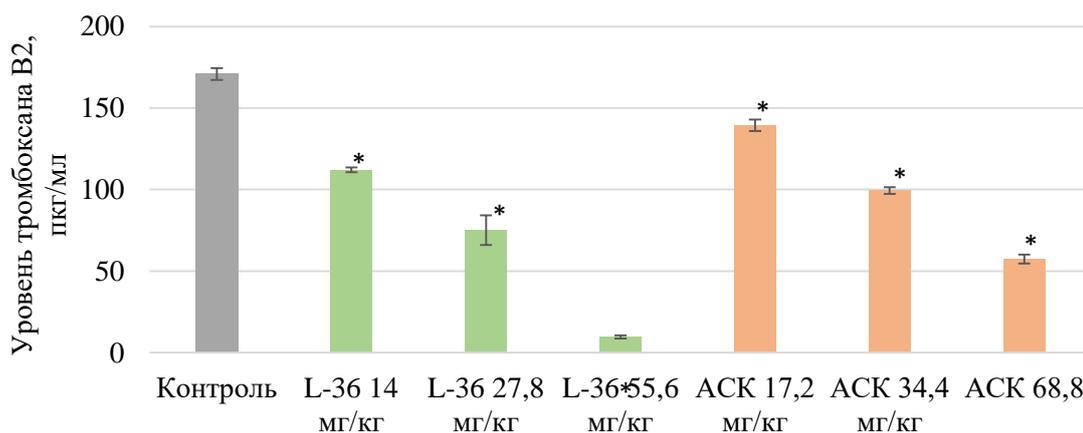


Рисунок 13. Влияние соединения L-36 на уровень TxB<sub>2</sub> в тромбоцитах, стимулированных арахидоновой кислотой *in vivo*  
Примечание: \* - различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05), АСК-ацетилсалициловая кислота.

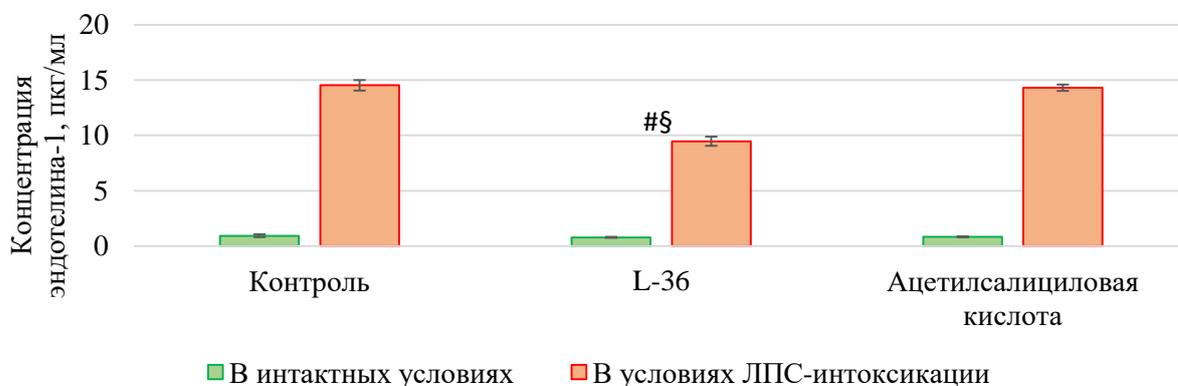


Рисунок 14. Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень эндотелина-1 у интактных животных и в условиях ЛПС-индуцированной дисфункции эндотелия.

Примечание: # - различия статистически значимы относительно позитивного контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05), § - различия статистически значимы относительно препарата сравнения в условиях ЛПС-интоксикации, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод о способности соединения L-36 снижать продукцию эндотелина-1 – маркера эндотелиальной дисфункции – на 34,8% ( $p < 0,05$ ), что может служить основанием предполагать у исследуемого вещества эндотелиопротективные свойства.

Фактор Виллебранда (vWF), ключевой компонент системы гемостаза, синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах [Авдонин П.П., 2021]. В настоящее время vWF также является одним из общепризнанных маркеров нарушений функции эндотелия, связанных с увеличением выработки эндотелием веществ с протромботической активностью. Связь повышения концентрации vWF в крови со степенью повреждения сосудистого эндотелия была доказана в модельных экспериментах на крысах при эндотоксинемии и механическом повреждении эндотелия еще в 1989 г. Reldy и соавт. При состояниях, сопровождающихся острым или хроническим повреждением эндотелия, уровень vWF в крови значительно повышается [Шуваева В.Н., 2020]. На модели ЛПС-индуцированной интоксикации у крыс было установлено, что количественное содержание vWF в плазме животных с гиперцитокинемией достоверно увеличивается на 56,2% ( $p < 0,05$ ) относительно интактной группы животных (рисунок 15). На фоне смоделированной ЛПС-интоксикации однократное введение соединения L-36 приводило к статистически значимому снижению уровня vWF на 56,5% ( $p < 0,05$ ) в сравнении со значениями, полученными в группе позитивного контроля (рисунок 15). Препарат сравнения в условиях интоксикации способствовал снижению концентрации исследуемого маркера на 13,7% (рисунок 15).

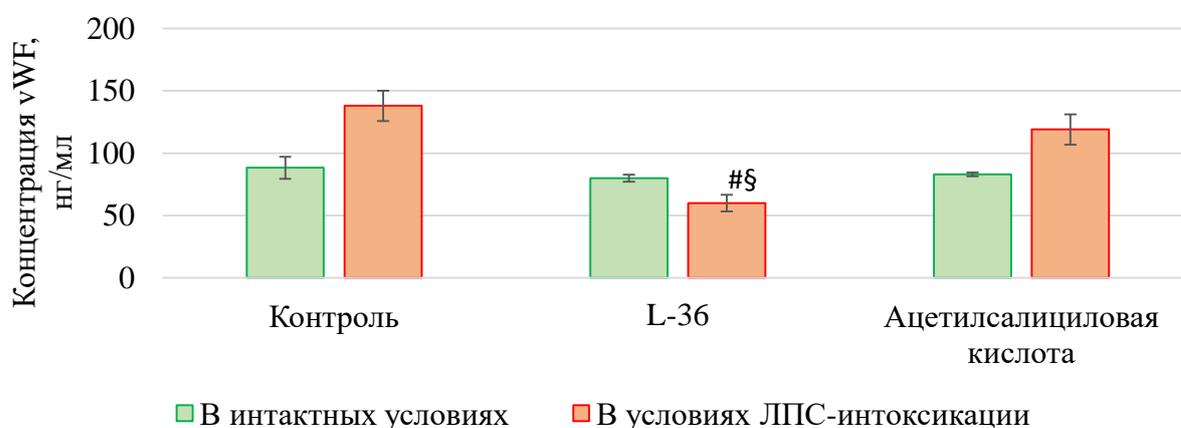


Рисунок 15. Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень vWF у интактных животных и в условиях ЛПС-интоксикации.

Примечание: # - различия статистически значимы относительно позитивного контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,05$ ), § - различия статистически значимы относительно препарата сравнения с ЛПС, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ( $p < 0,05$ )

Проведенное исследование подтверждает, что введение раствора липополисахарида сопровождается выраженным системным ответом, заключающемся в увеличении как тромбогенного потенциала крови, так и в формировании дисфункции эндотелия. Исследуемое соединение, в условиях ЛПС-индуцированной интоксикации, способствует значительному снижению уровня vWF, при этом не оказывая влияния на данный биомаркер в интактных условиях. Такое действие изучаемого соединения L-36 позволяет подтвердить вывод о его возможном эндотелиопротективном эффекте, а также о наличии антитромботических свойств.

При активации тромбоцитов происходит резкое увеличение уровня внутриклеточного кальция, как за счет поступления ионов кальция outside-in посредством P2X<sub>1</sub> рецепторов, так и благодаря дегрануляции внутриклеточных депо хранения тромбоцитов [Dupuis A., 2020]. В ответ на стимуляцию тромбином увеличение концентрации ионов кальция в интактных тромбоцитах происходило до 103,3 нМ (таблица 29). Инкубация тест-системы с 100 мкМ соединения L-36 способствовала снижению уровня внутриклеточного кальция до 7,7 нМ, что на 92,6% ( $p < 0,05$ ) ниже значений, полученных в контроле. При добавлении в суспензию отмытых тромбоцитов раствора соединения L-36 в конечной концентрации 10 мкМ наблюдалось увеличение концентрации кальция до 47,1 нМ в ответ на стимуляцию тромбином, что на 54,4% ( $p < 0,05$ ) ниже показателей группы контроля. В концентрации 1 мкМ тестируемый образец L-36 способствовал ингибированию секреции внутриклеточного кальция тромбоцитов на 7,2%. Дозозависимое влияние на пул ионов кальция из внутриклеточных депо хранения позволило рассчитать показатель IC<sub>50</sub>, который составил 9,3 мкМ (таблица 29).

Таблица 29.

Влияние соединения L-36 на уровень внутриклеточного кальция тромбоцитов в безкальциевой среде *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	Уровень кальция, нг/мл	Δ% снижения уровня кальция	IC <sub>50</sub> , мкМ
1.	Контроль		103,3±2,2		
2.	L-36	100	7,7±2,8*	92,6±2,7*	9,3
3.		10	47,1±4,1*	54,4±4,0*	
4.		1	95,9±2,0	7,2±2,0	
5.	Верапамил	100	99,5±0,9	3,7±0,9	

\*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Изменение концентрации внутриклеточного кальция в безкальциевой среде свидетельствует о непосредственном влиянии соединения L-36 на функциональную активность тромбоцитов. Влияние на секрецию кальция свидетельствует о способности соединений подавлять функциональную активность тромбоцитов на ранних этапах – активации [Irfan M., 2021].

Методами *in silico* была изучена сравнительная аффинность соединения-лидера L-36 с высокой антиагрегантной активностью и референсных препаратов ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена в отношении циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы, с целью выработки обоснованных предположений относительно возможного таргетного механизма антиагрегантного действия соединения L-36.

Для структур соединения L-36, ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена методами молекулярной механики с помощью программы MarvinSketch 17.1.23 были построены по 10 конформеров с наименьшей энергией. Среди оптимизированных конформеров были отобраны для каждого соединения по одному конформеру с наименьшей общей энергией. Пример оптимизированной 3D-структуры соединения L-36 приведен на рисунке 16.

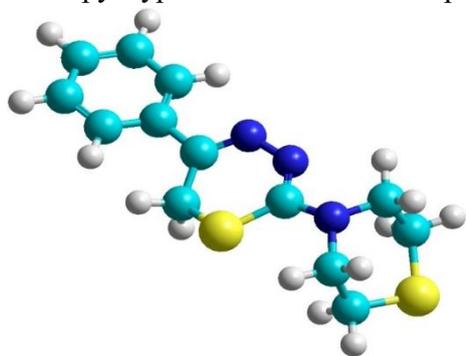


Рисунок 16. Оптимизированная 3D-модель соединения L-36.

Ансамблевый докинг оптимизированных 3D-моделей в специфические сайты трех валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы осуществлялся с помощью программ PyRx 0.8 и AutoDock Vina 1.1.2., с учетом полученных данных о ключевых аминокислотах сайтов связывания и покрывающих сайты 3D-моделей пространств для докинга. По полученным 50 значениям для докинуемого соединения определяли минимальную энергию его докинга ΔE для данного вида биомишени. Вычисленные минимальные значения энергии докинга ΔE приведены в таблице 30. Для соединения L-36 и двух препаратов сравнения по значениям энергий докинга ΔE были вычислены константы связывания K со всеми белками-мишенями. Результаты

расчетов приведены в таблице 31.

Таблица 30.

Энергии докинга соединения L-36 и препаратов сравнения в сайты релевантных биомишеней

Биомишень	ΔE, Ккал/моль		
	L-36	Ацетилсалициловая кислота	Дазоксибен
Циклооксигеназа-1	-6.0	-6.2	—
Циклооксигеназа-2	-6.9	-6.9	—
Тромбоксан-А-синтаза	-6.5	—	-6.8

Таблица 31.

Константы связывания соединения L-36 и препаратов сравнения с сайтами релевантных биомишеней

Биомишень	K, nM		
	L-36	Ацетилсалициловая кислота	Дазоксибен
Циклооксигеназа-1	42290	30231	—

Циклооксигеназа-2	9336	9336	—
Тромбоксансинтаза	18271	—	11043

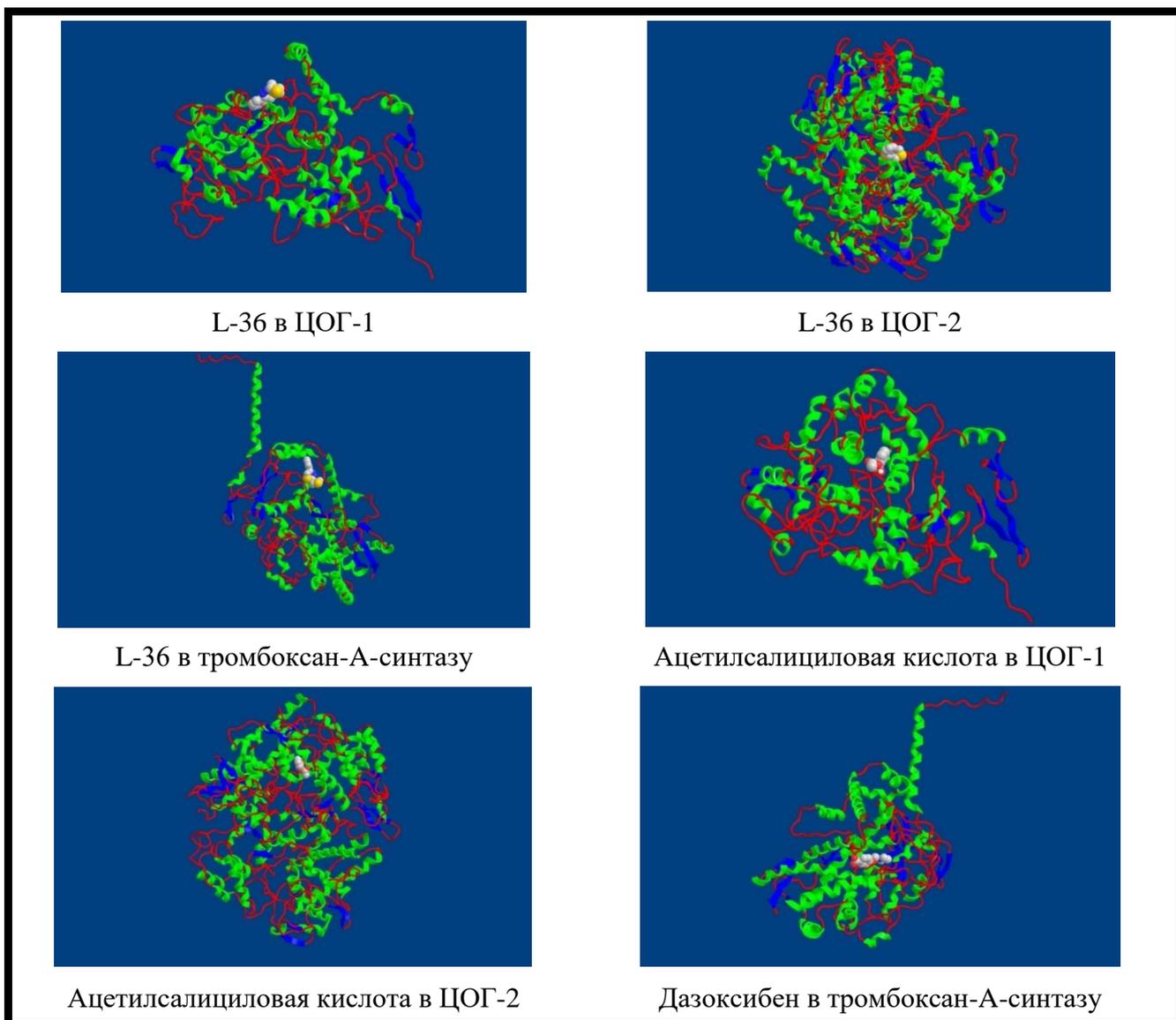


Рисунок 17. 3D-модели белков-мишеней с докированными в них соединениями

В таблице 32. приведены расчетные значения относительной аффинности соединения L-36 сравнительно с референсными препаратами.

Таблица 32.

Показатели относительной аффинности соединения L-36 в сравнении с референсными препаратами

Биомишень	$K_{L-36}/K_{Ref}$
Циклооксигеназа-1	1.40
Циклооксигеназа-2	1.00
Тромбоксан-А-синтаза	1.65
$K_{COX1 L-36}/K_{COX2 L-36}$	4.53

Сравнение констант связывания показывает, что L-36 в 4,53 раза менее аффинен к циклооксигеназе-1, чем к циклооксигеназе-2. В среднем по трем оценкам аффинности L-36 менее активен по сравнению с референсными препаратами. Антиагрегантное действие соединения L-36 предположительно определяется обратимым ингибированием циклооксигеназы-2, совместно с обратимым ингибированием тромбоксансинтазы. В отношении циклооксигеназы-2 соединение L-36 примерно в 4 раза более активно, чем в отношении циклооксигеназы-1.

На следующем этапе исследования были изучены антитромбогенные свойства нового производного тиадиазина соединения L-36 на различных моделях тромбоза. Среднее время окклюзии

сонной артерии, обработанной раствором хлорида железа, в контрольной группе животных, которым вводилась вода очищенная, составило 19,2 мин. При этом субстанция соединения L-36 в дозе 14,0 мг/кг способствовала удлинению времени образования тромба на 16,0%, в дозе 27,8 мг/кг – на 46,3%. Дальнейшее увеличение дозы вещества L-36 до 55,6 мг/кг приводило к пролонгированию времени окклюзии каротидной артерии на 72,0% (рисунок 18-А). Дозозависимое изучение антитромботической активности субстанции L-36 позволило рассчитать показатель ED<sub>50</sub>, который составил 36,5 мг/кг. Препарат сравнения в дозе 34,4 мг/кг повышала данный показатель до 20,8 мин., что на 16,8% больше показателя контрольной группы. Увеличение дозы ацетилсалициловой кислоты до 68,8 и 137,6 мг/кг приводило к статистически значимому пролонгированию времени наступления полной окклюзии сонной артерии на 35,7 и 63,6% соответственно (рисунок 18-А). При этом ED<sub>50</sub> ацетилсалициловой кислоты составила 110,3 мг/кг. Далее было проведено моделирование тромбоза сонной артерии крыс электрическим током. После воздействия постоянного электрического тока на сонную артерию крыс было зафиксировано среднее время окклюзии сосуда в группе контрольных животных, которое составило 14,7 мин. Однократное внутривенное введение соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* способствовало пролонгированию времени полной окклюзии сонной артерии на 62,1 (p<0,05) и 33,2% (p<0,05) соответственно. Изучение соединения L-36 в дозах 14,0 и 55,6 мг/кг позволило выявить дозозависимое удлинение времени остановки кровотока в сонной артерии на 29,3 (p<0,05) и 91,6% (p<0,05), соответственно. Значение ED<sub>50</sub> для соединения L-36 на данной модели тромбоза составило 24,8 мг/кг (рисунок 18-Б). Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также проявил дозозависимое антитромботическое действие. Показатель ED<sub>50</sub> для референса составил 62,5 мг/кг.

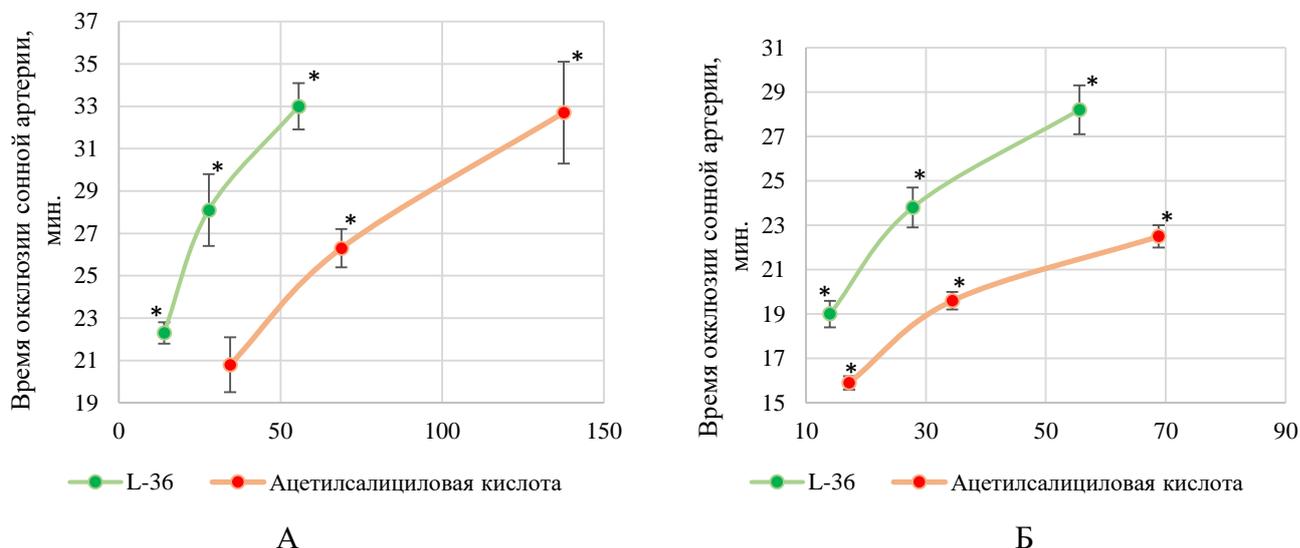


Рисунок 18. Антитромботическая активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на моделях тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (А) и электрическим током (Б) при однократном внутривенном введении

Таким образом, на двух моделях артериального тромбоза была показана высокая антитромбогенная активность соединения L-36, превосходящая таковую для ацетилсалициловой кислоты. Такая высокая эффективность в отношении предупреждения процессов тромбообразования позволяет судить о веществе L-36 как о молекуле-кандидате для создания на ее основе эффективного корректора повышенного тромбогенного потенциала крови.

На модели адреналин-коллагенового тромбоза субстанция соединения L-36 предотвращала гибель 70% животных. Ацетилсалициловая кислота уступала по активности соединению L-36, выживаемость животных при ее введении составила 40%. Микроскопическое исследование легочной ткани контрольных животных после индуцирования адреналин-коллагенового тромбоза показало, что в органе преобладали нарушения кровообращения, реализованные кровоизлияниями очагового характера, венозным полнокровием, геморрагическим экссудатом в стенках и просветах альвеол. В значительной части сосудов микроциркуляторного русла выявляли эритроцитарные сладжи. При изучении срезов легочной ткани, окрашенных по Carstair, были обнаружены многочисленные фибрин-содержащие тромбы, которые обтурировали просветы крупных сосудов и просветы сосудов микроциркуляторного русла легочной ткани (рисунок 19-А). У мышей, получавших ацетилсалициловую кислоту на фоне адреналин-коллагенового тромбоза, в легочной ткани отмечали выраженные признаки дистелектаза: эмфизематозно расширенные альвеолы чередовались со спавшими альвеолами. В

просвете части альвеол присутствовал преимущественно геморрагический экссудат, а часть сосудов была перекрыта сладжированными эритроцитам. Отмечали выраженное утолщение межальвеолярных перегородок, обусловленное экссудативными явлениями серозного и серозно-геморрагического характера. При изучении срезов легочной ткани, окрашенных по Carstairs, в просвете сосудов были обнаружены коллагеновые депозиты. В большинстве случаев агрегированные нити фибрина откладывались в просвете сосудов микроциркуляторного русла легочной ткани (рисунок 19-Б). Исследование легочной ткани у мышей, получавших вещество L-36, показало, что признаки нарушения кровообращения выражались преимущественно кровоизлияниями очагового характера, венозным полнокровием, а также диапедезом эритроцитов в межальвеолярные перегородки. При этом гистоархитектоника легочной ткани подопытных животных соответствовала нормальным гистологическим критериям. Окрашивание парафиновых срезов легочной ткани подопытных мышей трихромной окраской по Carstairs показало, что у большинства животных тромбы, в состав которых входили нити фибрина, встречались в единичном экземпляре (рисунок 19-В).

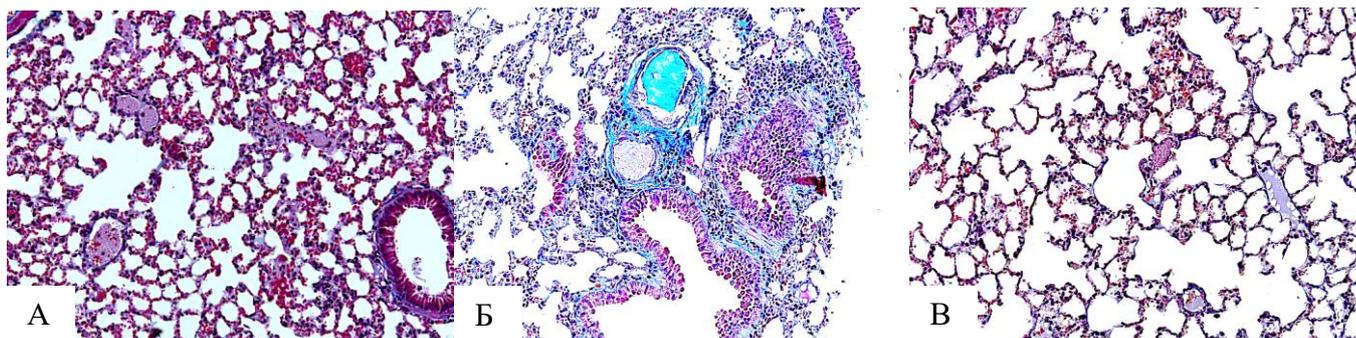


Рисунок 19. Легочная ткань животного, получавшего воду очищенную (А), ацетилсалициловую кислоту (Б) и соединение L-36 (В), через 24 часа после моделирования адреналин-коллагенового тромбоза. Трихромная окраска по Carstairs. Общее увеличение  $\times 200$ .

Согласно результатам патоморфологического исследования, введение вещества L-36 нивелировало основные признаки нарушения кровообращения в легочной ткани, обусловленные введением тромбующей смеси адреналина и коллагена. При этом, терапевтическая эффективность вещества L-36 относительно ацетилсалициловой кислоты была выше. Это подтверждает и тот факт, что процент выживаемости на данной модели тромбоза в группе животных, получавших соединение L-36, был в 1,8 раза выше, чем в группе животных, получавших ацетилсалициловую кислоту.

Венозная тромбоэмболия становится все более признанной причиной заболеваемости и смертности среди госпитализированных пациентов, в том числе молодых лиц [Abood K.K., 2019]. Применение антитромбогенных средств также является ключевым аспектом терапии венозных тромбозов [Streiff M.B., 2016]. При моделировании тромбоза нижней полой вены крыс было установлено, что средняя масса тромбов, экстрагированных из сосуда, составила 109,5 мг (таблица 33). В группе животных, получавших соединение L-36, масса тромбов составила в среднем 29,3 мг, причем у 2 крыс из 6 при проведении тромбэктомии не было обнаружено сгустков, обтурирующих просвет сосуда. В значительно меньшей степени проявила активность ацетилсалициловая кислота. Средняя масса тромбов на фоне препарата сравнения составила 72,3 мг.

Таблица 33.

Антитромботическая активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза нижней полой вены крыс при однократном внутрижелудочном введении ( $M \pm SEM$ ) ( $n=6$ )

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Масса тромба, извлеченного из нижней полой вены
1	Ложнооперированные животные		0
2	Контроль		109,5 $\pm$ 4,6
3	L-36	27,8	29,3 $\pm$ 1,9 <sup>#</sup>
4	Ацетилсалициловая кислота	34,4	72,3 $\pm$ 3,1 <sup>*</sup>

\* - различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA ( $p < 0,05$ )

# - различия статистически значимы относительно ацетилсалициловой кислоты, критерий one-way ANOVA ( $p < 0,05$ )

Проведенное исследование демонстрирует высокую эффективность соединения L-36 в отношении профилактики тромбообразования в системе нижней полой вены, что может быть позитивным моментом в предотвращении венозных тромбоэмболий.

Методами искусственного интеллекта *in silico* были определены токсикологические и фармакокинетические характеристики (ADMET) соединения L-36. Оценка токсикологического профиля была проведена по 12 параметрам (рисунок 20). Консенсусный индекс безопасности составил 1,000. Это означает, что во всех базах данных, используемых для прогнозирования, соединение L-36 являлось иммунотоксичным с индексом безопасности 1,000. При исследовании уровня безопасности соединения L-36 по параметрам острая токсичность, мутагенность, генотоксичность, гепатотоксичность, цитотоксичность, нефротоксичность, нейротоксичность и гематотоксичность было показано, что консенсусный индекс безопасности в каждом случае равен 0,000. Расчетный показатель при изучении способности проникать через ГЭБ составил 0,5, что может указывать на наличие способности у соединения L-36 оказывать свое действие в ЦНС.



Рисунок 20. Консенсусная интегральная оценка общей безопасности (Ind<sub>tox</sub>) соединения L-36

Расчет фармакокинетических характеристик для соединения L-36 производился по 12 параметрам (таблица 34). Согласно данным прогноза для соединения L-36 характерно отсутствие либо низкая способность связываться с белками плазмы крови. С использованием модели клеточной линии Мадин-Дарби почек собаки MDCK было установлено, что для исследуемого соединения характерна низкая мембранная проницаемость, что подтверждают данные по расчету почечного клиренса для соединения L-36, который составил 0,022 мл/мин/кг. Всасываемость из ЖКТ тестируемого соединения по данным прогноза составляет 100%. Биологическая трансформация соединения L-36 происходит, вероятнее всего, с участием ферментов семейства цитохрома P450. Установлено также, что предпочтительный путь выведения соединения L-36 с желчью. Объем распределения и период полувыведения составили 0,771 л/кг и 5,168 ч соответственно.

Таблица 34.

Консенсусная интегральная оценка фармакокинетической предпочтительности соединения L-36

№ п/п	Параметр	Значение
1	Связывание с белками плазмы крови	Ind <sub>PK</sub> = 0,000
2	Пассивная межклеточная проницаемость на клетках Мадин-Дарби почек собаки MDCK	Ind <sub>PK</sub> = 0,000
3	Всасываемость через желудочно-кишечных тракт	100%
4	Способность метаболизироваться печеночными CYP450	Ind <sub>PK</sub> = 0,324
5	Общий клиренс	0,402 мл/мин/кг
6	Почечный клиренс	0,022 мл/мин/кг
7	Печеночный клиренс	2,575 мл/мин/кг
8	Пассивная мембранная проницаемость на клетках аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2	Ind <sub>PK</sub> = 0,000
9	Активный транспорт из клетки посредством Р-гликопротеина	Ind <sub>PK</sub> = 0,000

10	Способность выводиться почками посредством транспортера органических катионов OCT2	Ind <sub>PK</sub> = 0,000
11	Объем распределения	0,771 л/кг
12	Период полувыведения	5,168 ч

Примечание:

Ind<sub>PK</sub> – консенсусный интегральный индекс фармакокинетической предпочтительности

На основании проведенного консенсусного прогноза с применением методов искусственного интеллекта было установлено, что в токсикологическом плане для соединения L-36 характерна умеренная кардиотоксичность и иммунотоксичность. Эти данные указывают на необходимость уделить особое внимание изучению профиля безопасности соединения L-36 в расширенных доклинических исследованиях с применением титрования доз. Консенсусный интегральный индекс общей безопасности IntTox для соединения L-36 составил 0,184. С помощью нейросетевого моделирования были спрогнозированы некоторые фармакокинетические параметры соединения L-36. Было показано, что для исследуемого соединения характерна 100% всасываемость в ЖКТ, низкая степень связывания с белками плазмы, а также умеренная способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Кроме того, было определено, что наиболее предпочтительным путем выведения соединения L-36 из организма является желчь.

Активация тромбообразования предположительно является адаптивной на ранней стадии некоторых инфекций, но продолжающееся воспаление может быстро привести к пагубной гипервоспалительной реакции, опосредованной «цитокиновым штормом» (гиперцитокинемией) и синдромом активации макрофагов [Hanff T.C., 2020; Tataru A.M., 2022]. Состояние гиперцитокинемии характеризуется увеличением провоспалительных цитокинов в крови пациента включая фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и др. Циркулирующие цитокины активируют макрофаги, моноциты и нейтрофилы путем паракринных или аутокринных эффектов и могут провоцировать увеличение тромбогенного потенциала крови [Hanff T.C., 2020; Obi A.T., 2021]. Механизмы, которые потенциально могут вызвать тромботические явления на фоне сепсиса, включают повышение вязкости плазмы, активацию прокоагулянтных факторов, вазоспазм, аутоиммунный васкулит и изменение количества тромбоцитов [Guo Y., 2018]. Известно, что тромбоциты взаимодействуют с вирусами и могут служить их временными переносчиками [Gorski A., 2020]. Противовирусные средства вошли во многие клинические рекомендации по ведению пациентов с COVID-19, основным осложнением которого было развитие тромботических событий, приводящих к полиорганной недостаточности и высокой летальности [Alhazzani W., 2020].

В 7 главе представлено исследование по изучению антиагрегантных свойств наиболее активных соединений Ф-168, RU-891 и L-36 в условиях цитокиновой гиперагрегации. В цельной крови, обработанной раствором липополисахарида, соединение Ф-168 в концентрации 100 мкМ способствовало снижению амплитуда агрегации тромбоцитов на 23,8. Препарат сравнения в концентрации 100 мкМ способствовал снижению цитокиновой гиперагрегации на 83,2% ( $p < 0,05$ ). При инкубации цельной крови, обработанной липополисахаридом, с 10 мкМ ацетилсалициловой кислоты наблюдалось снижение амплитуды агрегации тромбоцитов на 52,4% ( $p < 0,05$ ). В концентрации 1 мкМ исследуемый препарат способствовал недостоверному ингибированию агрегации тромбоцитов на 3,2%. Значение IC<sub>50</sub> при этом составило 12,4 мкМ. При добавлении соединения RU-891 к цельной крови, обработанной раствором ЛПС, было установлено, что ингибирование процессов агрегации тромбоцитов происходит на 17,1%, что позволяет сделать вывод об отсутствии эффективности данной субстанции в условиях цитокиновой гиперагрегации. Производное тиадиазина L-36 при инкубации в тест-системе в концентрации 100 мкМ ингибировало агрегацию тромбоцитов на 53,3% ( $p < 0,05$ ). В концентрации 10 мкМ соединение L-36 оказывало защитное действие в отношении агрегации тромбоцитов на 34,3% ( $p < 0,05$ ). Добавление к цельной крови соединения L-36 в концентрации 1 мкМ не приводило к значимым изменениям амплитуды агрегации кровяных пластинок. Показатель IC<sub>50</sub> при этом для соединения L-36 составил 61,1 мкМ.

Производные тиадиазина обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе противовирусной и антибактериальной [Qureshi S., 2021; Aggarwal R., 2022; Rahman K., 2022].

Дозозависимое ингибирование цитокиновой гиперагрегации позволяет высказать предположение о том, что соединение L-36 в условиях сепсиса подавляет функциональную активность тромбоцитов именно за счет своей противовоспалительной активности.

В **обсуждении** приводится обобщение результатов, полученных в ходе исследования, их интерпретация с учетом литературных данных. Анализ изученных конденсированных гетероциклических соединений позволил заключить, что азотсодержащие молекулы в значительной степени обладают антиагрегантными свойствами, а также введение в качестве гетероатома атома серы приводит к увеличению активности. Кластеризация химических рядов исследованных групп соединений позволила выявить высоко активные соединения, значительно превосходящие по активности ацетилсалициловую кислоту. Исследования *in silico* позволили, на основе полученных данных, структурировать исследованные химические ряды и определить наиболее перспективные скаффолды для поиска и создания на их основе высоко эффективных антиагрегантных средств. При анализе скрининговых данных с использованием статистически точного биномиального критерия были рассчитаны показатели значимости для каждого из 12 исследованных скаффолдов. По результатам вычислений было показано, что наиболее высокий индекс значимости был у производных 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-диона, N9-имидазобензимидазола и 6*H*-1,3,4-тиадиазина, что согласуется с экспериментальными данными.

В результате исследования было выявлено три наиболее активных соединения Ф-168, RU-891 и L-36. Было установлено, что данные вещества обладают выраженной антитромботической активностью, подтвержденной на различных моделях артериального и венозного тромбозов. Установлены механизмы действия указанных соединений, фармакокинетические и токсикологические свойства.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая большое разнообразие потенциальных мишеней для антитромбоцитарной терапии и наличие данных об антиагрегационных свойствах множества различных химических классов на этапе скрининга было исследовано 148 соединений, относящихся к различным группам. Анализ изученных конденсированных гетероциклических соединений позволил заключить, что азотсодержащие молекулы в значительной степени обладают антиагрегантными свойствами, а также введение в качестве гетероатома атома серы приводит к увеличению активности. Используемые в работе методы *in silico* позволили заключить, что наиболее перспективными для поиска и создания эффективных антиагрегантных средств являются скаффолды 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-диона, N9-имидазобензимидазола и 6*H*-1,3,4-тиадиазина, что согласуется с экспериментальными данными.

Проведенный цикл доклинических исследований нового производного ксантина соединения Ф-168 и его готовой инъекционной лекарственной формы позволяет заключить, что данное вещество обладает выраженной антитромботической активностью, обусловленной Пв/Ша антагонистической активностью, что позволяет позиционировать данное соединение для применения в острых состояниях. В рамках доклинических исследований были определены фармакокинетические параметры для соединения и ГЛФ Ф-168, а также изучена лекарственная безопасность. В настоящий момент ГЛФ Ф-168 (Ангипур) находится на III фазе клинических исследований.

В ряду производных N9-имидазобензимидазола было выявлено наиболее активное соединение RU-891 (1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(1,2,3,9а-тетрагидро-9*H*-бензо[d]имидазо[1,2-а]имидазол-9-ил)этан-1-он), продемонстрировавшее высокую эффективность для предотвращения процессов тромбообразования при внутривенном введении. Проведенные исследования в совокупности с ранее полученными данными позволяют сделать вывод о блокирующем влиянии соединения RU-891 на P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов и синтез тромбоксана A<sub>2</sub>. При этом исключая влияние на ЦОГ-1, можно предположить действие соединения на тромбоксансинтазу, что является более селективным механизмом антитромбоцитарного действия, исключаящим негативное влияние на ЖКТ и эндотелиоциты. Для соединения RU-891 и его готовой лекарственной формы для приема внутрь, также был проведен полный цикл доклинических исследований, результаты которых являются основанием для проведения I фазы клинических исследований.

Гетероциклические соединения, в составе которых присутствует атом серы демонстрируют достаточно широкий спектр фармакологической активности, в том числе антиагрегантную. Соединение L-36 (5-фенил-2-тиоморфолино-6*H*-1,3,4-тиадиазин) проявляло наиболее выраженную антиагрегантную и антитромботическую активность. В ходе углубленного изучения механизма антиагрегантного действия было установлено, что соединение L-36 дозозависимо способствует снижению уровня тромбоксана A<sub>2</sub>, превосходя по активности при этом препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2 раза. Это позволяет сделать вывод о том, что механизм действия соединения L-36 вероятнее всего обусловлен в ингибировании каскада метаболизма арахидоновой кислоты. По значению энергии докинга в исследованиях *in silico* было установлено, что для соединения L-36 характерно влияние на ЦОГ-1 и ЦОГ-2, при этом в отношении ЦОГ-2 афинность соединения несколько больше. Вместе с тем,

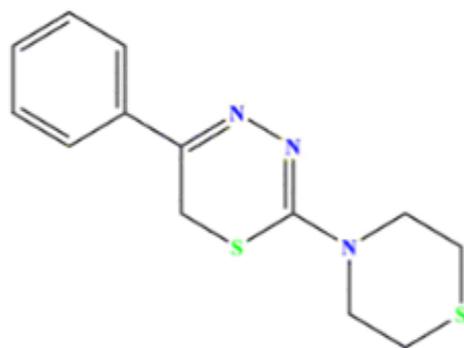
также было проведено докирование молекулы L-36 в сайт связывания фермента тромбоксансинтетазы и по значению энергии докинга соединение было сопоставимо с референсным препаратом, селективным ингибитором тромбоксансинтетазы дазоксибеном. Это дает основание предполагать у соединения L-36 механизм антиагрегантного действия связанный с блокированием фермента тромбоксансинтетазы в тромбоцитах, а также противовоспалительное действие путем ингибирования ЦОГ-2. Также, для соединения L-36 были установлены антиагрегантные и эндотелиопротективные свойства в условиях экспериментального сепсиса. Увеличение знаний о роли тромбоцитов в сосудистой сети привело ко многим достижениям в понимании не только того, как тромбоциты взаимодействуют со стенкой сосуда, но и того, как они выступают в роли посредников между патогенами и иммунной системой. В дополнение к их хорошо описанной гемостатической функции тромбоциты являются активными участниками иммунного ответа на микроорганизмы и чужеродные вещества.

Таким образом, проведенные исследования фармакологических свойств наиболее активных соединений Ф-168, RU-891 и L-36 определяет их перспективность дальнейшего применения (рисунок 21). ГЛФ Ф-168 нацелено на решение социально-значимой проблемы высокой смертности населения от инфаркта миокарда. На данный момент соединение Ф-168 находится на 3 фазе клинических исследований. По результатам полного цикла доклинических исследований подготовлен пакет документов для проведения 1 фазы клинических исследований соединения RU-891. Исследование соединения L-36 открывает новый взгляд на процессы тромбообразования, а также методологию поиска и создания антитромбогенных средств.

Клинические  
исследования

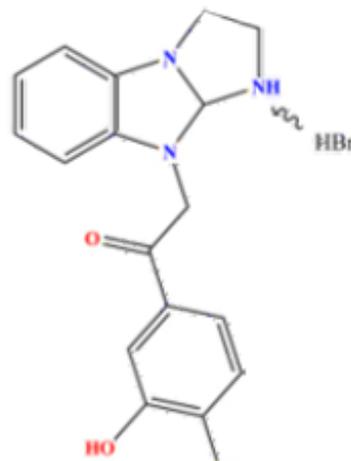
Доклинические  
исследования

Фармакологические  
исследования



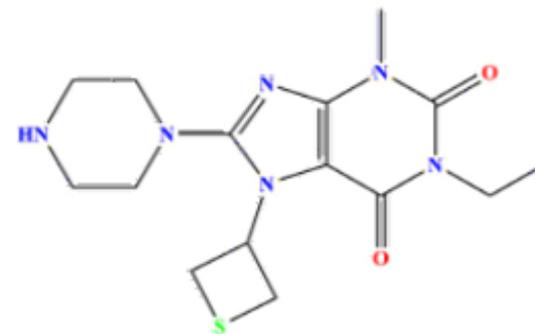
L-36

Установлен потенциальный механизм действия.  
Выявлена выраженная антиагрегантная активность в условиях системной воспалительной реакции.  
Показаны эндотелиопротективные свойства в условиях экспериментального сепсиса.



RU-891

Проведен полный цикл доклинических исследований субстанции и готовой лекарственной формы для приема внутрь.  
Готов пакет документов для инициации I фазы клинических исследований.



Ф-168

Проведен полный цикл доклинических исследований субстанции и инъекционной лекарственной формы.  
Успешно завершена I и II фаза клинических исследований.  
Результаты II фазы позволили сделать заключение о том, что данное средство обладает сходной безопасностью и эффективностью с препаратом интегрилин у больных с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST ЭКГ при ЧТКАП высокого риска со стентированием.

Рисунок 21. Перспективность применения наиболее активных соединений.

## ВЫВОДЫ

1. На основании данных по изучению влияния 148 новых производных, принадлежащих 12 новым скаффолдов на предмет антиагрегантной активности группы соединений по уровню активности можно представить в следующей последовательности: 6*H*-1,3,4-тиадиазины > 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дионы > N9-имидазобензимидазолы > 3*H*-тиазолы > N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы > 2,3-дигидробензофураны > 1,2,4,5-тетразины > 4*H*-бензо[1,3]оксазины > 1*H*-бензохромены > 1,3-имидазолы > 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидины > 1*H*-бензимидазолы. Наиболее перспективные молекулы были выявлены в рядах азотсодержащих производных 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-диона (Ф-168) и N9-имидазобензимидазолы (RU-891), а также среди серосодержащих производных 6*H*-1,3,4-тиадиазина (L-36).

2. Соединение Ф-168 по уровню антиагрегантной активности в тестах *in vivo* было сопоставимо с препаратом сравнения тирофибаном (ED<sub>50</sub> 0,89 и 0,9 мг/кг, соответственно). На моделях артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (III) и электрическим током, а также в условиях экспериментального инфаркта миокарда АФС и ГЛФ Ф-168 не уступают по антитромботическому действию препарату сравнения тирофибану. На модели адреналин-коллагенового тромбоза соединение Ф-168 предотвращало гибель 80% мышей, в то время как препарат сравнения тирофибан оказывал 70% защитного действия. По способности предотвращать тромбообразование в венозной системе соединение Ф-168 превосходит по активности препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза.

3. В результате фармакокинетических исследований для соединения Ф-168 были определены следующие фармакокинетические параметры: AUC 176,87 мкг\*час/мл; T<sub>1/2</sub> 2,07 часа; Cl<sub>общ.</sub> 7,52 л/час\*кг; Vd 22,43 л/кг. Показана высокая степень связывания данного соединения Ф-168 с белками плазмы крови (65,9%). Относительная биодоступность для ГЛФ Ф-168 составила 97,88%.

4. Соединение Ф-168 относится к 3 классу умеренно токсичных соединений. В результате проведенных исследований по изучению хронической токсичности АФС Ф-168 при внутривенном введении крысам в дозах 0,89 и 3,2 мг/кг не выявлено значимых токсических эффектов. В дозе 5,4 мг/кг наблюдалось снижение количества тромбоцитов на 16,0 %, увеличение общего белка периферической крови на 30,0 %. На фоне отмены соединения Ф-168 эти изменения нивелировались. Исследование хронической токсичности ГЛФ Ф-168 при внутривенном введении кроликам в дозах 0,43; 1,1 и 2,3 мг/кг позволило заключить, что в максимальной дозе зафиксировано снижение количества тромбоцитов до 121,0 x 10<sup>9</sup>/л с одновременным удлинением времени свертывания крови до 49,7 сек, которые восстанавливались до контрольных значений при отмене препарата. С учетом фармакологически активной дозы (0,9 мг/кг) и низкой токсичности максимальная рекомендованная начальная доза для человека с целью проведения I фазы клинических исследований составила 3,22 мг.

5. Соединение RU-891 в 1,5 раза превосходит по уровню антиагрегантной активности *in vivo* препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. На основании данных по изучению антитромботических свойств на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (III) соединение RU-891 и препараты сравнения можно расположить по уровню активности в следующем порядке: соединение RU-891 > ацетилсалициловая кислота > клопидогрел. На модели тромбоза сонной артерии, индуцированного электрическим током соединение RU-891 было сопоставимо по активности с препаратом сравнения клопидогрелем и в 3,6 раза превосходило ацетилсалициловую кислоту. При моделировании адреналин-коллагенового тромбоза было установлено, что соединение RU-891 предотвращает гибель 80% мышей, в то время как ацетилсалициловая кислота и клопидогрел – 40% и 50%, соответственно. В условиях экспериментального инфаркта миокарда соединение RU-891 по уровню антитромботической активности сравнимо с препаратом сравнения клопидогрелем и превосходит ацетилсалициловую кислоту в 2,1 раза, а ГЛФ RU-891 активнее данных препаратов сравнения в 1,4 и 2,7 раза, соответственно.

6. В результате фармакокинетических исследований для соединения RU-891 были определены следующие фармакокинетические параметры: AUC 4,89 мкг\*час/мл; T<sub>1/2</sub> 0,97 часа; Cl<sub>общ.</sub> 4,71 л/час\*кг; Vd 6,57 л/кг. Показана высокая степень связывания соединения RU-891 с белками плазмы крови (50,5 %). Относительно форменных элементов крови выявлено, что концентрация соединения RU-891 в тромбоцитарной массе 85,0 %, а в эритроцитарной 9,8 %. Относительная биодоступность для ГЛФ RU-891 составила 93,3 %.

7. В результате проведенных исследований по изучению хронической токсичности АФС RU-891 при 6-месячном внутрижелудочном введении крысам в дозах 23,0; 230,0 и 460,0 мг/кг не зафиксировано значимых токсических эффектов. Однако, при исследовании АФС RU-891 в дозе 460,0 мг/кг наблюдались увеличение времени свертывания крови на 35,7%. Спустя месяц после отмены соединения RU-891 данные эффекты не наблюдались. При изучении ГЛФ RU-891 только в максимальной в дозе

220,0 мг/кг при внутрижелудочном введении кроликам способствует удлинению времени свертывания крови на 29,6%, изменению макроскопических показателей печени, которые были нивелированы до контрольных значений спустя месяц после отмены препарата. С учетом фармакологически активной дозы (23,0 мг/кг) и низкой токсичности максимальная рекомендованная начальная доза для человека с целью проведения I фазы клинических исследований составила 270,0 мг.

8. Соединение L-36 в опытах *in vivo* превосходит по антиагрегантной активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,2 раза. На модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (III) соединение L-36 превосходит по антитромботической активности ацетилсалициловую кислоту в 3 раза, а на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного электрическим током в 2,5 раза. При моделировании адреналин-коллагенового тромбоза установлено, что соединение L-36 предотвращает гибель 70% мышей, в то время как ацетилсалициловая кислота – 40% особей. Эксперименты по изучению механизма антиагрегантного действия позволили заключить, что для соединения L-36 характерно влияние на уровень тромбоксана A<sub>2</sub>. В условиях ЛПС-индуцированной интоксикации соединение L-36 способствовало снижению уровня эндотелина-1 и фактора фон Виллебранда, что указывает на способность соединения L-36 препятствовать процессам тромбовоспаления. В исследованиях *in silico* показано, что вещество L-36 обладает афинностью к ЦОГ-2 и тромбоксансинтетазе.

9. Соединение L-36 оказывало дозозависимое ингибирующее влияние на агрегацию тромбоцитов в условиях иммунокоагуляционных нарушений. Показатель IC<sub>50</sub> для соединения L-36 при этом составил 61,1 мкМ. Соединения Ф-168 и RU-891 не подавляют агрегацию тромбоцитов в условиях цитокиновой гиперагрегации.

10. Противовирусные препараты (фавипиравир, умифеновир, триазавирин, ингавирин, римантадин и энисамия йодид) не оказывают влияния на процессы агрегации тромбоцитов в нормальных условиях. Однако, при обработке цельной крови раствором ЛПС (модель гиперцитокинемии) препараты умифеновир, фавипиравир и триазавирин дозозависимо снижали цитокиновую гиперагрегацию тромбоцитов и превосходят по активности действие ацетилсалициловой кислоты в 4,6; 3,4 и 2,4 раза, соответственно.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведенное исследование позволяет рекомендовать химические классы 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дионы, N9-имидазо[3,2-а]бензимидазолы и 6*H*-1,3,4-тиадиазины как перспективные для поиска и создания на их основе высокоэффективных антиагрегантных средств.

2. Проведенные доклинические исследования соединения Ф-168 и его инъекционной лекарственной формы позволили рекомендовать его для проведения I фазы клинических исследований. В настоящий момент ГЛФ Ф-168 (Ангипур) находится на III фазе клинических исследований.

3. Выполненные в полном объеме доклинические исследования субстанции и готовой лекарственной формы соединения RU-891 являются основанием для проведения клинических исследований с целью дальнейшей коммерциализации.

4. Изучение фармакологических свойств соединения L-36 позволяет расширить представление о процессе тромбообразования, включая иммунотромбогенез. Необходимо завершение полного цикла доклинических исследований, при этом особое внимание следует уделить изучению лекарственной безопасности с применением титрования доз.

5. Перспективным направлением является исследование потенциальных антиагрегантных средств в условиях сепсиса.

6. Результаты исследования могут быть включены в образовательную программу по дисциплинам общая и клиническая фармакология.

## СПИСОК РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Работы, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ

1. **Сиротенко В.С.**, Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А. Антитромбогенные свойства производного 6Н-1,3,4-тиадиазина (соединения L-36) на различных моделях артериального тромбоза. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2023. Т. 86. № 9. С. 22-26.
2. Смирнова Л.А., Спасов А.А., Гайдукова К.А., **Сиротенко В.С.**, Кучерявенко А.Ф., Великопольская М.В. Фармакокинетические свойства соединения РУ-891 при многократном введении. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2023. Т. 20. № 1. С. 137-139.
3. **Сиротенко В.С.**, Цейтлер Т.А., Сидорова Л.П., Чупахин О.Н. Влияние нового производного 1,3,4-тиадиазина на агрегацию тромбоцитов и дисфункцию эндотелия в условиях системной воспалительной реакции. Кардиологический вестник. 2023. Т. 18. № 2-2. С. 23-24.
4. Лукьянов С.В., Спасов А.А., Глухов Ю.Ф., Кучерявенко А.Ф., Леandroва В.П., **Сиротенко В.С.**, Гайдукова К.А., Халиуллин Ф.А. Ангипур - новый ингибитор гликопротеиновых ПВ/IIIА рецепторов тромбоцитов. Кардиологический вестник. 2023. Т. 18. № 2-2. С. 61.
5. Спасов А.А., Глухов Ю.Ф., Лукьянов С.В., Халиуллин Ф.А., Кучерявенко А.Ф., **Сиротенко В.С.**, Гайдукова К.А. Ангипур - новый блокатор ПВ/IIIА рецепторов тромбоцитов для внутривенного введения. Терапия. 2023. № S4. С. 84.
6. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gurova N.A., **Sirotenko V.S.**, Gaidukova K.A., Khaliullin F.A., Samorodov A.V., Pavlov V.N. Antithrombotic activity of the antiplatelet agent angipur on the model of arterial thrombosis in rats with isoproterenol-induced myocardial infarction. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2022. Т. 172. № 3. С. 314-317.
7. Смирнова Л.А., Спасов А.А., Великопольская М.В., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., **Сиротенко В.С.** Биодоступность РУ-891 - соединения с антиагрегантными свойствами. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2022. Т. 85. № 11. С. 30-31.
8. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., **Сиротенко В.С.**, Гайдукова К.А., Усков Г.М. Антиагрегантная активность риамиловира в условиях интоксикации липополисахаридом. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. № 1. С. 51-56.
9. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., **Сиротенко В.С.**, Смирнова Л.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Великопольская М.В. Биодоступность таблетированной лекарственной формы производного бензимидазола с антиагрегантной активностью. Химико-фармацевтический журнал. 2022. Т. 56. № 8. С. 8-10.
10. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Халиуллин Ф.А., Смирнов А.В., Панышин Н.Г., Гайдукова К.А., **Сиротенко В.С.** Антитромботическая активность нового антиагрегантного соединения ангипур. Тромбоз, гемостаз и реология. 2022. № 2. С. 41-46.
11. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., **Сиротенко В.С.**, Гайдукова К.А., Халиуллин Ф.А. Антиагрегантная активность ангипура на моделях артериального и венозного тромбоза. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021. Т. 84. № 9. С. 20-23.
12. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Халиуллин Ф.А., Гурова Н.А., **Сиротенко В.С.**, Самородов А.В., Гайдукова К.А., Павлов В.Н. Антитромботическая активность антиагрегантного средства ангипур на модели артериального тромбоза у крыс с изопротеренол-индуцированным инфарктом миокарда. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 172. № 9. С. 303-306.
13. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., **Сиротенко В.С.**, Султанова К.Т., Гайдукова К.А., Скрипка М.О. Оценка острой токсичности нового производного бензимидазола с антитромбогенными свойствами. Токсикологический вестник. 2021. № 1 (166). С. 52-57.
14. Чарушин В.Н., Коротина А.В., Толщина С.Г., Русинов Г.Л., Литвинов Р.А., Бабкова В.А., **Сиротенко В.С.**, Бабков Д.А., Спасов А.А. Бис[1,2,4]триазоло[4,3-*b*:3',4'-*f*][1,2,4,5]тетразины, обладающие антигликирующей, антигликоксидационной и антиагрегантной активностью. Патент на изобретение RU 2755897 С1, 22.09.2021. Заявка № 2020141941 от 18.12.2020.
15. Ишметова Р.И., Бабков Д.А., Кучерявенко А.Ф., Бабкова В.А., **Сиротенко В.С.**, Игнатенко Н.К., Толщина С.Г., Васильев П.М., Русинов Г.Л., Спасов А.А. Консенсусный прогноз, направленный синтез и определение антигликирующей и антиагрегантной активностей 3,6-дизамещенных 1,2,4,5-тетразинов. Известия Академии наук. Серия химическая. 2020. № 4. С. 768-773.
16. **Сиротенко В.С.** Поиск инновационных антиагрегантных средств. Кардиологический вестник. 2020. Т. 15. № S. С. 15.

17. Халлиулин Ф.А., Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Самородов А.В., **Сиротенко В.С.**, Гайдукова К.А. Ангипур - отечественное антитромботическое средство. Кардиологический вестник. 2020. Т. 15. № S. С. 17-18.
18. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., **Сиротенко В.С.**, Султанова К.Т., Гайдукова К.А., Скрипка М.О. Нейротоксикологические свойства соединения РУ-891 с антитромбогенной активностью. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2019. № 3 (71). С. 116-119.
19. Распутин Н.А., Демина Н.С., Чарушин В.Н., Русинов Г.Л., Спасов А.А., Петров В.И., Кучерявенко А.Ф., Яковлев Д.С., Смирнов А.В., Бабков Д.А., Шаталова О.В., **Сиротенко В.С.**, Гайдукова К.А., Борисов А.В., Усков Г.М., Вербицкий Е.В. Лекарственное средство, обладающее антикоагулянтной (ингибитор ПА фактора), антитромботической, противовоспалительной активностями и содержащее 5,7-ди(тиофен-2-ил)-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин. Патент на изобретение RU 2798587 C1, 23.06.2023. Заявка № 2022118532 от 07.07.2022.
20. Степанова Э.Ф., Ремезова И.П., Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Смирнова Л.А., Гайдукова К.А., **Сиротенко В.С.**, Петров В.И., Морозов А.В., Шевченко А.М. Фармацевтическая композиция антитромботического действия в твердой лекарственной форме в виде таблеток. Патент на изобретение RU 2696869 C1, 07.08.2019. Заявка № 2019106346 от 05.03.2019.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозин-5`-дифосфат  
АСК – ацетилсалициловая кислота  
АТФ – аденозинтрифосфат  
АФС – активная фармацевтическая субстанция  
ГЛФ – готовая лекарственная форма  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ЛПС – липополисахарид  
МРНД – максимальная рекомендованная начальная доза для проведения клинических исследований  
УТИ – условный терапевтический индекс  
ЦОГ – циклооксигеназа  
ЭГТА – этиленгликольтетраацетат  
ED<sub>50</sub> – доза, в которой наблюдается 50% эффекта  
IC<sub>50</sub> – концентрация, в которой наблюдается ингибирование на 50%  
LD<sub>50</sub> (ЛД<sub>50</sub>) – доза, в которой наблюдается гибель 50% животных  
NETs – нейтрофильные внеклеточные ловушки  
PAR1 – рецепторы, активируемые протеазами 1 подтипа  
PI3K – фосфотидилинозитол-3-киназа  
TRAP – селективный агонист рецепторов тромбина  
TXA<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>) – тромбоксан A<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>)  
vWF – фактор фон Виллебранда

Сиротенко Виктор Сергеевич

**АНТИАГРЕГАНТНЫЙ И АНТИТРОМБОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ  
НОВЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук