

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Самородов Александр Владимирович

**Поиск новых азотсодержащих гетероциклических соединений, влияющих
на систему гемостаза**

03.01.04 - Биохимия

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Уфа – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Феликс Хусаинович Камиров

кандидат фармацевтических наук, доцент

Галия Амировна Тимирханова

Официальные оппоненты:

зав. кафедрой биохимии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Тюменская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор

Сергей Леонидович Галян

профессор кафедры фармакологии №1 с курсом клинической фармакологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, доктор медицинских наук

Наталья Альбертовна Муфазалова

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита диссертации состоится ____ 2012 года в ____ часов на заседании диссертационного совета ____ при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3).

Автореферат разослан ____ 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Мирсаева Г. Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Тромбоэмболические заболевания, несмотря на значительные успехи современной медицины, по-прежнему представляют сложную медико-социальную проблему [Бокарев И.Н., 2000; Балуда В.П. и соавт., 2003.; Бышевский А.Ш., 2007]. По данным ВОЗ, тромбозы и связанные с ними осложнения являются одной из наиболее частых причин инвалидности и летальности в общей структуре причин смертности среди взрослого населения. За октябрь 2008 года в развитых странах уровень смертности в результате тромбоза в различных его проявлениях составил в среднем 21,9 % и ежегодно около 25 млн. человек являются жертвами тромбоза [Prandoni P., 2007]. При этом, более половины тромботических эпизодов в венозном русле протекают бессимптомно и обнаруживаются впоследствии на аутопсии при развитии таких осложнений, как тромбоз легочной артерии и хроническая венозная недостаточность [Planes A. et al., 1988; Gathof B.S. et al., 2004]. Венозный тромбоз имеет место у 5 000 000 людей и регистрируется вновь у 150 человек на 100 000 населения. Так же у 30% госпитализированных в многопрофильные клиники больных имеет место повышенный риск тромбообразования [Alikhan R., 2010].

Важное место расстройств гемостаза в общей патологии человека определяется высокой частотой, разнообразием и потенциально очень высокой опасностью геморрагических и тромбогеморрагических заболеваний и синдромов. Они сопутствуют травмам, осложняют хирургические вмешательства, лекарственную и трансфузионную терапию, ограничивают использование инвазивных методов исследования и лечения, являются существенным звеном патогенеза большого числа других заболеваний, часто замыкают порочный круг, усугубляющий течение и исход основного заболевания [Зубаиров Д.М., 1998].

В этой связи весьма актуален поиск новых средств, способных в лечебных и профилактических целях корректировать систему гемостаза. С одной стороны, это обусловлено ростом заболеваемости. Но многие существующие антитромботические средства не удовлетворяют требованиям медицины, так как большинство из них обладают нежелательными побочными действиями. Это ограничивает их применение в качестве специфических, эффективно и избирательно действующих средств для коррекции системы гемостаза. Например, у трети пациентов прием аспирина, самого назначаемого и широко применяемого препарата, способствует желудочной диспепсии различной степени выраженности, а у 30-40% пациентов выявляется аспиринорезистентность [Баркаган З.С., 2004].

Одним из современных направлений в разработке новых лекарственных средств является синтез аналогов и производных применяемых препаратов. Наше внимание привлекли производные ксантина, многие из которых входят в состав лекарственных средств (например, кофеин, эуфиллин, пентоксифиллин). В настоящее время лидирующее положение в терапии гемореологических нарушений занимает пентоксифиллин [Зудин А.М. и др., 2004]. Этим определяется интерес к поиску корректоров системы гемостаза среди производных ксантина для создания на их основе избирательно действующих, высокоэффективных лекарственных препаратов, превосходящих пентоксифиллин.

Цель исследования. Поиск и изучение биохимического механизма действия наиболее активного из 15 впервые синтезированных производных ксантина на систему гемостаза в эксперименте.

Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих **задач**:

1. Провести скрининг 15 впервые синтезированных производных ксантина на наличие антиагрегационной и антикоагуляционной активности *in vitro*.
2. Установить зависимость биологической активности исследованных веществ от особенностей их структуры.
3. Оценить специфическое противосвертывающее действие наиболее перспективного из изучаемых веществ *in vitro* на донорской крови человека.
4. Оценить специфическое противосвертывающее действие наиболее перспективного из изучаемых веществ *in vivo* на интактных животных.
5. Установить некоторые биохимические механизмы действия наиболее перспективного из изучаемых веществ с использованием модельных состояний, сопровождающихся повышением агрегации и адгезии тромбоцитов.

Научная новизна исследования. Впервые изучена антиагрегационная, дезагрегационная и антикоагуляционная активность ряда новых производных ксантина и выделены соединения, являющиеся наиболее перспективными. Впервые представлена зависимость фармакологической активности синтетических производных ксантина от структуры. Наиболее активными среди исследованных веществ оказались производные ксантина, содержащие в положении С⁸ – пиперазин, в частности соединение 3-метил-8-пиперазино-7-(тиетанил-3)-1-этилксантина гидрохлорид (лабораторный шифр-Ф-168). На соединение Ф-168, превосходящее по действию на гемостаз пентоксифиллин, получен патент РФ № 2404181 от 20.11.2010. По результатам проведенной экспериментальной работы выдвинута рабочая гипотеза о вероятном биохимическом механизме действия на систему гемостаза соединения Ф-168, связанным с блокированием рецепторов GP IIb-IIIa и торможением трансформации фибриногена в фибрин.

Научно-практическая значимость работы. Установленные аспекты закономерности между структурой и антиагрегационной, антикоагуляционной активностью соединений являются основой для целенаправленного поиска и оптимизации синтеза новых производных ксантина с заданной структурой и уровнем биологической активности.

Внедрение результатов работы. Результаты исследования используются для подготовки студентов по специальности «Лечебное дело», «Педиатрия» в рамках дисциплин «Биохимия» и «Фармакология» на кафедрах биологической химии и фармакологии №1 с курсом клинической фармакологии и научно-исследовательской работе кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии в области синтеза и поиска потенциально биологически активных веществ на основе азотсодержащих гетероциклических соединений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Среди 15 изученных впервые синтезированных производных ксантина наиболее активны соединения, содержащие в положении С⁸ - пиперазин.
2. Соединение Ф-168 проявляет более выраженную антиагрегационную и антикоагуляционную активность, чем препарат сравнения - пентоксифиллин.

3. Антитромботический механизм действия соединения Ф-168 связан с ингибированием заключительного этапа свертывания крови – торможением сборки фибрин-мономеров и блокированием рецепторов GP IIb-IIIa тромбоцитов.

Апробация работы. Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на: X Молодежной конференции по органической химии (Уфа, 2007 год), Всероссийской конференции с международным участием «Химия и медицина» совместно с VI Всероссийским научным семинаром (Уфа, 2007 год), научно-практической конференции «Научный прорыв – 2008» (Уфа, 2008 год), Всероссийской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 2009 год), 74-й Республиканской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2009 год), VIII Всероссийской конференции с международным участием «Химия и медицина» (Уфа, 2010 год), совместном заседании кафедр биологической химии, фармакологии №1 с курсом клинической фармакологии, фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии и кафедры лабораторной диагностики ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России (Уфа, 2012 год).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 5 в журналах, рекомендованных ВАК, получено 2 патента на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками, 16 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 129 отечественных и 142 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследовано 15 новых производных ксантина, синтезированных в Башкирском государственном медицинском университете на кафедре фармацевтической химии*, ряд лекарственных препаратов-ксантинов, применяемых в практической медицине: пентоксифиллин (1-(5-оксогексил)-3,7-диметилксантин), кофеин-бензоат натрия (соль 1,3,7-триметилксантина с бензоатом натрия), эуфиллин (соль 1,3-диметилксантина с 1,2-этилендиамином), (производства ОАО «Дальхимфарм», Россия), а также ацетилсалициловая кислота (2-ацетилоксибензойная кислота, Фармацевтическая фабрика ШандонгКсинхуаФармасьютикал Ко., ЛТД, Китай) и этамзилат (диэтиламмония 2,5-диоксибензолсульфонат, ОАО «Биохимик», Россия).

Все экспериментальные работы выполнены в соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). Дизайн исследования представлен в таблице 1.

Эксперименты на этапе *in vitro* выполнены на крови доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет. К исследованию допускалась кровь доноров в состоянии относительного здоровья (отсутствие тяжелой соматической патологии, острых и

*Выражаем признательность заведующему кафедрой фармацевтической химии ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России, профессору Ф.А. Халиуллину, предоставившему для исследования вновь синтезированные производные ксантина.

хронических инфекционных заболеваний), а также не курящих, не употреблявших накануне исследования алкоголь и лекарственные препараты. Забор крови проводили из локтевой вены иглой с широким просветом с использованием систем вакуумного забора крови. В качестве стабилизатора использовали цитрат натрия в соотношении 1:9.

Экспериментальные исследования на этапе *in vivo* выполнены на белых беспородных половозрелых крысах-самцах с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях [Касаткина Т.В., Капланский А.С., 2000]. Животные содержались в одинаковых условиях вивария с естественным световым режимом, в стандартных пластмассовых клетках при комнатной температуре и питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам [Западнюк В.И., 1986]. За 24 часа до забоя животным прекращалась подача пищи, не ограничивая доступ к воде. Экспериментальные исследования проводились согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96, ГОСТР 50258-92) и приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003г «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).

Исследование влияние соединения Ф-168 и пентоксифиллина на гемостаз проводили при внутрибрюшинном введении данных веществ в эквимоллярной концентрации. Между инъекцией исследуемого вещества и забором крови проходил 1 час. Животных наркотизировали диэтиловым эфиром и фиксировали на препаровальном столике, далее проводили забор крови из яремной вены, обнажая ее овальным разрезом, в пробирки с 3,8% раствором натрия цитрата в соотношении 1:9.

Все тесты проводились на богатой тромбоцитами (для исследования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза) и обедненной тромбоцитами (коагуляционные тесты) плазмах, полученных при центрифугировании изучаемых образцов цитратной крови.

Исследование влияния изучаемых веществ на адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов проводили *in vitro* на донорской крови человека на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 230 LA) научно-производственной фирмы "Биола" (Россия) и агрегометре «Thromlite 1006A» (Россия). В качестве индуктора агрегации в работе использовали АДФ, коллаген, адреналин и ристомидин ("Технология-Стандарт", г. Барнаул).

Тромбоэластографию, как метод комплексного исследования гемостаза, включающего все основные компоненты системы регуляции агрегатного состояния крови, проводили на аппарате TEG 5000 (Haemoscope Corporation, США).

Исследование влияния препарата сравнения - пентоксифиллина и Ф-168 на плазменный компонент гемостаза осуществляли с использованием классических методик. Определяли тромбиновое (ТВ), протромбиновое время (ПВ), активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), каолиновое время, количество фибриногена (по А.Clauss), рептилазное время, количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) и D-димеров, активность фактора Виллебранда и антитромбина III на турбидиметрическом

гемокоагулометре Solar CGL 2110 (Беларусь) и автоматизированном селективном анализаторе гемостаза STA-Compact (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Франция). В работе использовали оригинальные наборы реагентов производства Roche Diagnostics (Франция) и “Технология-Стандарт” (Россия).

Время свертывания цельной крови определяли по методу Сухарева, забор крови осуществляли надрезом кончика хвоста в чистый и сухой капилляр от аппарата Панченкова. В капилляр набирали столбик крови высотой 25—30 мм и переводили ее в середину капиллярной трубки. Включали секундомер и через каждые 30 с наклоняли капилляр вправо и влево под углом 30—45°. По секундомеру отмечали моменты начала и конца свертывания. Дальнейшему анализу подвергали время окончательного свертывания крови [Кишкун А.А., 2007].

Определение острой токсичности проводили по методу [Deichman и LeBlanc, 1986]. Крысам внутрибрюшинно вводили исследуемые соединения в нарастающих дозировках с шагом в 100 мг/кг. Наблюдение за лабораторными животными проводили в течение 2 недель после инъекции. За ЛД₅₀ принимали наименьшую дозу, вызвавшую летальный исход.

Для исследования влияния Ф-168 на скорость полимеризации фибрин-мономера использовали наборы «Тех-Полимер-тест», производства “Технология-Стандарт”, г. Барнаул. При этом отмечали время полимеризации фибрин-мономера в секундах в плазме крыс и рассчитывали показатель Ratio (R) по

$$R = \frac{t_1}{t_2}$$

формуле: , где t_1 – время полимеризации фибрин-мономера в плазме экспериментальной группы крыс, с; t_2 – время полимеризации фибрин-мономера в плазме контрольной группы крыс, с.

Моделирование генерализованного тромбоза [DiMinno G.S., 1983] проводили введением смеси растворов коллагена и адреналина (0,5 мг/кг и 0,06 мг/кг соответственно) в хвостовую вену мышей. В качестве критерия эффективности исследуемых соединений фиксировали количество выживших животных по сравнению с контрольной группой. За 1 час до моделирования тромбоза внутрибрюшинно вводили исследуемые соединения в эквимольных концентрациях и идентичных объемах – для пентоксифиллина 40 мг/кг и 56 мг/кг для Ф-168. Контрольной группе мышей вводили физиологический раствор в аналогичных объемах.

Математическую обработку результатов исследования проводили в статистических программах «Statistika 6.0» и программного обеспечения Microsoft Excel 2000, используя метод вариационной статистики для малых рядов наблюдений и вычисляя среднюю арифметическую (M), среднюю ошибку средней арифметической, и среднеквадратическое отклонение (m). Для оценки достоверности отличий вычисляли коэффициент Стьюдента и степень вероятностей. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы P принимали ≤ 0.05 .

Таблица 1- Дизайн проведенных исследований

ПЧЭС I	СКРИНИНГ ВПЕРВЫЕ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КСАНТИНА, ВЛИЯЮЩИХ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА IN VITRO.	Определение эффективной дозы препарата сравнения - пентоксифиллина в условиях <i>in vitro</i> при АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.
		Исследование влияния 15 производных ксантина в скрининговой дозе на АДФ- и коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов по методу Born на агрегометре «Thromlite-1006A» на донорской крови человека.
		Исследование антикоагуляционной активности 15 производных ксантина в скрининговой дозе стандартными клоттинговыми тестами на донорской крови человека на гемокоагулометре Solar CGL 2110.
		Характеристика зависимости изучаемой биологической активности вновь синтезированных производных ксантина от химической структуры.
ПЧЭС II	ВЛИЯНИЕ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА И СОЕДИНЕНИЯ Ф-168 НА ТРОМБОЦИТАРНЫЙ И КОАГУЛЯЦИОННЫЙ КОМПОНЕНТ ГЕМОСТАЗА IN VITRO.	Изучение влияния соединения Ф-168 и пентоксифиллина на систему гемостаза методом тромбоэластографии на донорской крови человека на аппарате TEG 5000.
		Изучение влияния соединения Ф-168 и пентоксифиллина на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, коллагеном, адреналином и ристомисином на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «Биола 230 LA».
ПЧЭС III	ВЛИЯНИЕ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА И СОЕДИНЕНИЯ Ф-168 НА СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ И КОАГУЛЯЦИОННЫЙ КОМПОНЕНТ ГЕМОСТАЗА IN VIVO.	Определение острой токсичности пентоксифиллина и соединения Ф-168 при внутрибрюшинном введении крысам.
		Определение дозы пентоксифиллина и Ф-168 для экспериментов на этапе <i>in vivo</i> .
		Исследование влияния соединения Ф-168 и пентоксифиллина на агрегацию тромбоцитов на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «Биола 230 LA» при внутрибрюшинном введении крысам.
		Исследование влияния соединения Ф-168 и пентоксифиллина на коагуляционный компонент гемостаза на автоматизированном селективном анализаторе гемостаза STA-Compact при внутрибрюшинном введении крысам.
		Влияние соединения Ф-168 и пентоксифиллина на фибринообразование и фибринолиз на автоматизированном селективном анализаторе гемостаза STA-Compact при внутрибрюшинном введении крысам.
		Влияние соединения Ф-168 и пентоксифиллина на генерализованный коллаген-адреналиновый тромбоз.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенного скрининга установлено, что лекарственные препараты - производные ксантина в концентрации 2×10^{-3} М/л оказывают различное влияние на функциональную активность тромбоцитов. Среди препаратов сравнения наибольшую активность проявил пентоксифиллин. При концентрации пентоксифиллина 2×10^{-3} М/л АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов снижалась в сравнении с контролем на

50%, на коллаген-индуцированную агрегацию влияние препарата не регистрировалось. Наименьшую антиагрегационную активность среди лекарственных препаратов – производных ксантина проявил эуфиллин, подавляя агрегацию тромбоцитов в среднем на 3,1% при АДФ- и 2,5% при коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов относительно контроля.

Ацетилсалициловая кислота, подобно пентоксифиллину, проявляла выраженную антиагрегационную активность лишь при АДФ- индуцированной агрегации, регистрировалась антиагрегационная активность равная 13,5%, при коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов активность не проявлялась.

Дезагрегационная активность у препаратов сравнения регистрировалась только у пентоксифиллина на АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

При предварительной инкубации проагрегантного препарата сравнения «Этамзилата» в обогащенной тромбоцитами плазме в концентрации 2×10^{-3} М/л спонтанная агрегация тромбоцитов составляла в среднем 22,1%. Препарат оказывал незначительное влияние на индуктор-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Влияние впервые синтезированных производных ксантина в скрининговой концентрации на тромбоцитарный компонент гемостаза представлены в таблице 2.

Выявлены соединения, проявляющие проагрегантную (С-41, С-53), антиагрегационную активность (Р-14, Р-15, Ф-170, Ф-168). Выраженным проагрегантным эффектом обладали производные ксантина, содержащие моноэтаноламмониевый и трисаммониевый ионы. Наибольшую антиагрегационную активность проявили производные ксантина, содержащие в положении С⁸- пиперазиновый радикал и ионы металлов. Ряд активности С⁸-замещенных производных ксантина выглядит следующим образом:

Амины (Ф-170, Ф-168) > металлосодержащие соли (Р-14, Р-15) > пиперидиниевые соли (Р-16, С-52) > морфолиниевая соль (Р-19) > диэтиламмониевая соль (Р-18) > гексаметилениминиевая соль (М-13).

Различное влияние соединений было установлено и на плазменный компонент гемостаза, проявляющееся изменением показателя внутреннего пути свертывания крови - АПТВ. На ПВ и концентрацию фибриногена значимого влияния исследуемых соединений не регистрировалось.

Влияние изучаемых соединений на адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов и коагуляционный компонент гемостаза зависело от их химической структуры. Среди исследованных новых производных ксантина выявлено наиболее активное соединение 3-метил-8-пиперазино-7-(тиетанил-3)-1-этилксантина гидрохлорид (лабораторный шифр - Ф-168).

В концентрации 2×10^{-3} М/л соединение Ф-168 полностью подавляло АДФ- и коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов. В данной дозе регистрировался так же и дезагрегационной эффект. При введении Ф-168 на пике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в течение последующих 5 минут наблюдался 100 % распад тромбоцитарных агрегатов. Для соединения Ф-168 и пентоксифиллина была изучена зависимость антиагрегационного эффекта от концентрации (таблица 3).

Таблица 2 - Структуры производных ксантина и показатели антиагрегационной и антикоагуляционной активности

№	Шифр	R ¹	R ²	Индуктор-индуцированная агрегация тромбоцитов % к контролю		АПТВ, % к контролю
				АДФ	Коллаген	
1.	C-41	H	SCH ₂ COO ⁻ ·NH ₃ ⁺ CH ₂ CH ₂ OH	105,7±2,7	106,5±2,3	102,7±1,0
2.	C-53	H	SCH ₂ COO ⁻ ·NH ₃ ⁺ C(CH ₂ OH) ₃	103,4±1,1	102,3±1,7	101,4±1,2
3.	C-52	H	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺	86,2±2,1	91,3±1,8	102,2±1,0
4.	P-18	C ₃ H ₇	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂	96,7±1,8	97,4±2,3	103,1±1,3
5.	P-14	C ₃ H ₇	SCH ₂ COOK	87,6±2,4	73,9±2,2	110,3±1,5
6.	P-15	C ₃ H ₇	SCH ₂ COONa	84,6±3,1	81,4±2,4	107,1±1,5
7.	P-16	C ₃ H ₇	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺	97,1±1,3	98,9±1,2	102,8±0,9
8.	P-34	C ₃ H ₇	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺	97,1±1,9	94,9±2,7	101,7±1,8
9.	P-19	C ₃ H ₇	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺	99,1±0,9	98,8±1,1	109,7±2,1
10.	Φ-170	C ₃ H ₇		72,9±2,1	76,9±2,6	111,7±2,1
11.	M-7	C ₂ H ₅	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂	97,2±2,1	98,2±1,6	101,9±1,2
12.	M-13	C ₂ H ₅	SCH ₂ COO ⁻ ·H ₂ N ⁺	98,1±1,9	97,8±2,1	102,1±1,1
13.	M-8	C ₂ H ₅	SCH ₂ COO ⁻ ·N ⁺ H ₃ -CH ₂ -	99,1±0,9	98,9±1,1	105,7±1,4
14.	M-16	C ₂ H ₅	SCH ₂ COO ⁻ ·NH ₄ ⁺	98,3±1,1	98,3±1,1	106,2±1,8
15.	Φ-168	C ₂ H ₅		0,0±0,0	0,0±0,0	123,3±3,1

Таблица 3 - Зависимость биологической активности соединения Ф-168 и пентоксифиллина от концентрации, n=7

Конц., М/л	Ф-168		Пентоксифиллин	
	Антиагрегац. активность, %	Дезагрегац. активность, %	Антиагрегац. активность, %	Дезагрегац. активность, %
$2 \cdot 10^{-3}$	100,0±0*	100,0±0*	51,9±1,3*	12,5±2,5*
10^{-3}	100,0±0*	52,9±3,2*	13,95±2,6 *	0,0±0
$5 \cdot 10^{-4}$	50,2±2,1*	37,4±2,1*	0,0±0	0,0±0
$2,5 \cdot 10^{-4}$	24,3±1,8*	0,0±0	0,0±0	0,0±0

Примечание: *-отличие от контроля статистически значимо ($P < 0,05$);

В конечных концентрациях 2×10^{-3} и 10^{-3} М/л соединение Ф-168 полностью подавляло агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, адреналином, коллагеном, но дезагрегационной активности на адреналин- и коллаген-индуцированных типах кривых в данной концентрации не регистрировалось. На ристомидин-индуцированную агрегацию тромбоцитов влияния соединения Ф-168 не отмечалось. Введение Ф-168 в кювету агрегометра в концентрации 5×10^{-4} М/л за 3 минуты до АДФ приводило к снижению агрегации тромбоцитов в среднем на 50,2%. При добавлении Ф-168 на пике АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в течение последующих 5 минут наблюдался распад более 37,0% тромбоцитарных агрегатов. Пентоксифиллин в данной концентрации активности не проявлял.

Дальнейшие исследования влияния соединения Ф-168 и пентоксифиллина на систему гемостаза *in vitro* проводили методом тромбоэластографии, как способа ее оценки по основным ключевым компонентам изолированно и в комплексе. Регистрацию тромбоэластограмм проводили со всеми типами образцов - цитратная кровь (таблица 4), обогащенная (таблица 5) и обедненная (таблица 6) тромбоцитами плазма.

При внесении в систему исследуемых веществ, статистически значимо снижался МА, характеризующий функциональную активность тромбоцитов. В присутствии пентоксифиллина наблюдалось его падение относительно контроля на обогащенной тромбоцитами плазме и цитратной крови соответственно на 25,6% и 23,8%. За счет этого общий коагуляционный потенциал смещается в сторону гипокоагуляции. Индекс тромбодинамического потенциала (ТPI) был снижен на 32,1% и 25,6% относительно контроля соответственно на образцах цитратной крови и обогащенной тромбоцитами плазме. Статистически значимо удлинялось время формирования максимальной прочности сгустка (ТМА) для цитратной крови на 17,7%, для обогащенной тромбоцитами плазме на 12,9%.

При анализе фибринолитического процесса (LY30 и CLT) статистически значимого влияния пентоксифиллина не регистрировалось. Но по механико-физическим характеристикам (А, G) сгусток в присутствии пентоксифиллина уступал контрольным измерениям. На образцах цитратной крови и обогащенной

тромбоцитами плазме показатель фактической меры прочности сгустка (G) был на 14,9% и 27,4% меньше в сравнении с контрольными измерениями.

Таблица 4 - Показатели тромбоэластографии исследуемых веществ на цитратной крови, n=7

Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	Ф-168	P ₂
SP(min)	8,7±2,1	8,4±1,3	11,4±2,2	0,2
R(min)	12,8±1,7	16,1±1,8	21,9±2,3 P ₁ =0,005	0,001
K(min)	3,7±0,7	4,1±1,1	7,8±0,9 P ₁ =0,003	0,00005
Angle(deg)	44,7±3,9	43,9±3,1	26,1±2,8 P ₁ =0,005	0,0001
MA(mm)	57,3±3,7	42,7±2,7 P ₁ =0,003	31,4±3,9 P ₁ =0,01	0,01
TMA(min)	27,1±2,4	31,9±1,3 P ₁ =0,01	57,2±3,8 P ₁ =0,006	0,004
G(d/sc)	6,7±1,7	4,8±1,1 P ₁ <0,01	2,1±1,1 P ₁ =0,007	0,00001
E(d/sc)	148,9±17,2	127,1±12,2 P ₁ <0,0001	61,3±11,7 P ₁ =0,00005	0,0002
TPI(/sec)	11,7±2,9	7,9±2,1	3,9±1,3 P ₁ =0,00001	0,0001
EPL(%)	9,7±3,2	8,8±2,7	10,1±2,9	0,4
A30(mm)	60,4±2,9	59,7±1,9	59,2±2,1	0,5
CL30(%)	96,6±3,1	96,8±2,9	98,1±2,2	0,8
LY30(%)	3,7±1,1	3,1±0,9	2,6±1,2	0,3
CLT(min)	38,7±7,5	36,2±9,1	37,2±8,3	0,8
A(mm)	53,4±6,2	41,2±3,5 P ₁ =0,02	34,7±3,1 P ₁ =0,001	0,0002
CI	1,7±1,1	-0,8±0,4	-2,9±1,1 P ₁ =0,0004	0,01
LTE(min)	>3 hrs	>3 hrs	>3 hrs	-

Примечание: в этой и последующих таблицах P₁- уровень статистической значимости различий с контролем; P₂ – групп, получавших пентоксифиллин и Ф-168.

Показатели тромбоэластограмм, регистрируемых на бестромбоцитарной плазме, значимого изменения в присутствии пентоксифиллина в сравнении с контролем не претерпевали. Полученные нами данные полностью соотносятся с механизмом действия и биологической активностью пентоксифиллина [Государственный реестр лекарственных средств, 2004].

При анализе тромбоэластограмм, полученных в присутствии Ф-168, регистрировались изменения на всех трех типах образцов крови. На образцах цитратной крови и тромбоцитарной плазмы статистически значимо МА снижался в среднем на 45,3% в сравнении с контролем. Соединение Ф-168 оказывало влияние и на плазменный компонент гемостаза. Показатель Angle, характеризующий функциональное состояние фибриногена, уменьшался на цитратной крови и обогащенной тромбоцитами плазме в среднем на 50%. Показатель R, отражающий энзиматическую часть коагуляции, удлинялся на образцах обогащенной тромбоцитами плазме на 56,4%, на цитратной крови -

практически в 2 раза. Это приводило к более выраженному (в сравнении с пентоксифиллином) смещению общего коагуляционного потенциала в сторону гипокоагуляции. При этом ТМА был удлинён на 111% и 56% соответственно на цитратной крови и обогащенной тромбоцитами плазме.

Таблица 5 - Показатели тромбоэластографии исследуемых веществ на обогащенной тромбоцитами плазме, n=7

Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	Ф-168	P ₂
SP(min)	6,4±1,9	7,8±1,5	9,5±1,9	0,3
R(min)	9,4±1,6	11,2±1,3	14,7±1,1 P ₁ =0,02	0,01
K(min)	3,2±0,6	3,8±1,1	9,7±1,3 P ₁ =0,006	0,0008
Angle(deg)	56,8±4,4	54,7±3,9	27,9±3,6 P ₁ <0,0001	0,002
MA(mm)	72,4±4,2	60,7±3,4 P ₁ =0,03	39,6±3,4 P ₁ <0,0001	<0,00001
TMA(min)	25,6±3,1	28,9±1,1 P ₁ =0,01	39,7±2,6 P ₁ =0,0004	0,0004
G(d/sc)	8,8±1,4	6,7±1,3 P ₁ =0,3	3,7±1,1 P ₁ <0,00001	0,0004
E(d/sc)	169,2±12,7	131,6±11,6 P ₁ =0,004	109,5±10,9 P ₁ =0,004	0,001
TPI(/sec)	15,6±1,8	11,5±2,2	7,1±1,4 P ₁ =0,001	0,0001
EPL(%)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
A30(mm)	57,8±3,1	59,6±2,2	57,6±1,9	0,9
CL30(%)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	-
LY30(%)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
CLT(min)	36,4±4,2	35,7±3,9	37,4±3,7	0,8
A(mm)	73,8±4,8	60,9±3,7 P ₁ =0,02	35,6±2,9 P ₁ <0,0001	0,00007
CI	4,3±1,2	3,1±0,6	-1,9±0,7 P ₁ <0,0001	0,002
LTE(min)	>3 hrs	>3 hrs	>3 hrs	-

На образцах плазмы, обедненной тромбоцитами, (таблица 6) соединение Ф-168 оказывало выраженное действие на плазменный компонент гемостаза. Статистически значимо на 49,5% удлинялся показатель R, практически в 2 раза снижался показатель Angle. Это приводило к смещению коагуляционного потенциала в сторону гипокоагуляции. Показатели TPI был снижен на 21,8%, а ТМА - удлинён на 14,9% в сравнении с контролем. Образовавшийся сгусток по механико-физическим характеристикам становился неполноценным, рыхлым (А, G). Но чрезмерной активности фибринолитической системы не отмечается (LY30, CL30, A30, CLT). Изменение показателей функциональной активности тромбоцитов (МА) и состояния фибриногена (Angle), на фоне нормального содержания тромбоцитов и фибриногена, позволяет предположить, что действие соединения Ф-168 направлено на этап связывания фибриногена с тромбоцитарными рецепторами GP IIb-IIIa.

Таблица 6 - Показатели тромбоэластографии исследуемых веществ на обедненной тромбоцитами плазме, n=7

Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	Ф-168	P ₂
SP(min)	10,8±2,3	12,1±2,1	13,4±1,7	0,7
R(min)	11,9±1,7	9,7±2,1	17,8±2,3 P ₁ =0,04	0,003
K(min)	3,4±1,9	3,1±1,7	4,9±2,1	0,2
Angle(deg)	70,3±4,9	69,4±3,1	41,7±4,2 P ₁ =0,06	0,0003
MA(mm)	40,1±1,7	39,4±1,9	32,4±2,9 P ₁ =0,01	0,04
TMA(min)	32,9±1,2	33,7±2,1	37,8±1,8	0,2
G(d/sc)	3,3±1,1	4,1±1,2	2,1±0,9	0,007
E(d/sc)	66,8±13,6	67,9±10,7	58,8±11,9	0,4
TPI(/sec)	10,1±1,6	9,2±1,4	7,8±1,7	0,8
EPL(%)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
A30(mm)	40,1±4,1	39,8±2,9	39,6±3,1	0,6
CL30(%)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	-
LY30(%)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
CLT(min)	34,2±11,6	40,2±9,1	32,1±10,2	0,3
A(mm)	41,8±4,7	40,7±2,6	42,9±3,1	0,6
CI	-1,1±0,9	-1,7±1,2	-4,9±1,6 P ₁ =0,04	0,00001
LTE(min)	>3 hrs	>3 hrs	>3 hrs	-

Таким образом, результаты проведенных исследований *in vitro* в присутствии соединения Ф-168 выявили следующие биохимические изменения. На фоне нормального уровня тромбоцитов и фибриногена имеется выраженное смещение коагуляционного потенциала в сторону гипокоагуляции. Гипокоагуляция в основном обусловлена снижением адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов, проявляющаяся на АДФ-, коллаген-, адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Альтернативный путь агрегации тромбоцитов, опосредованный активностью фактора Виллебранда и мембранным гликопротеином Ib-IX, остается интактным. Также наблюдается изолированное ингибирующее действие Ф-168 на активность плазменного компонента гемостаза.

Согласно данным литературы [Долгов В.В., Свиринов П.В., 2005], существует заболевание, характеризующееся сходной биохимической картиной - тромбастения Гланцманна. Функциональные нарушения тромбоцитов при этом состоянии отличаются высокой специфичностью - отсутствует агрегация тромбоцитов в ответ на все физиологические активаторы (АДФ, коллаген, адреналин), но сохраняется нормальная агрегация тромбоцитов в ответ на ристомидин. Причиной развития тромбастении Гланцманна является отсутствие или резкий дефицит мембранного рецептора тромбоцитов GP IIb-IIIa [Баркаган З.С., 1988]. Из рисунка 1 видно, что при сопоставлении результатов регистрации агрегации однотипными индукторами при тромбастении Гланцманна и при исследовании Ф-168, изменения на агрегатограммах практически идентичны.

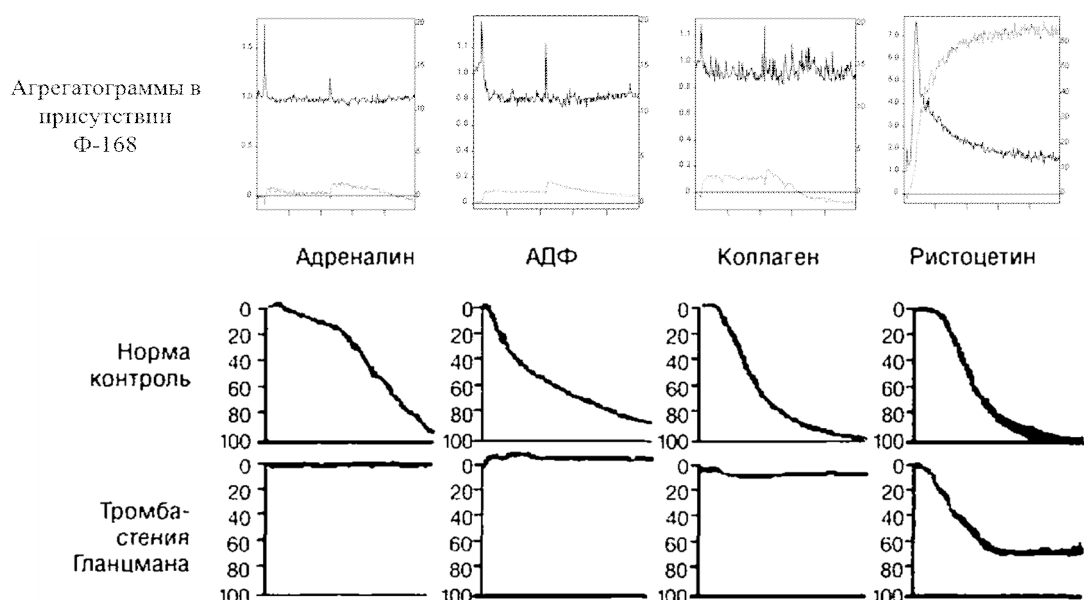


Рисунок 1. Сопоставление агрегатограмм в присутствии Ф-168 с данными литературы [Долгов В.В., Свиринов П.В., 2005].

В лабораторной диагностике тромбастении Гланцманна используется специальная диагностическая проба. Проводится ристомидин-индуцированная агрегация тромбоцитов с предварительным воздействием АДФ. Тест считается положительным, если уровень подъема кривой агрегации ниже, чем в отсутствие АДФ [Баркаган З.С., 1988].

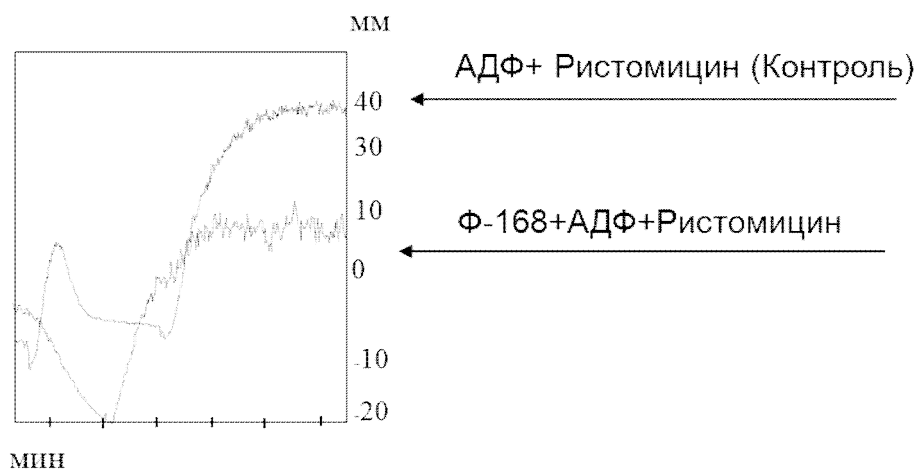


Рисунок 2. Ристомидин-индуцированная агрегация тромбоцитов в присутствии АДФ и Ф-168.

На рисунке 2 представлены агрегатограммы данной диагностической пробы, обработанные с использованием компьютерного обеспечения Aggwbr, при добавлении соединения Ф-168.

По результатам нашего исследования при добавлении в среду соединения Ф-168, согласно данным рекомендациям, выявлено значительное снижение уровня подъема ристомидин-индуцированной агрегации в присутствии АДФ. Тест положительный, что является косвенным признаком функциональной или количественной недостаточности тромбоцитарных рецепторов GP IIb-IIIa.

Целью дальнейших экспериментов стал анализ биохимических аспектов механизма действия соединения Ф-168 на интактных лабораторных животных и на фоне моделирования гиперкоагуляционных состояний. Предварительно была

установлена токсичность изучаемых веществ при их внутрибрюшинном введении (таблица 7).

Таблица 7 - Параметры токсичности пентоксифиллина и Ф-168

Соединение	ЛД ₅₀ , мг/кг
Пентоксифиллин	250
Ф-168	>400

В результате проведенного исследования было установлено, что токсичность соединения Ф-168 существенно меньше токсичности пентоксифиллина. По классификации К. К. Сидорова при внутрибрюшинном введении соединение Ф-168 относится к IV классу опасности (малотоксичные).

Для комплексной оценки влияния Ф-168 на систему гемостаза в условиях *in vivo*, проводилась тромбоэластометрия на аппарате TEG 5000. Результаты исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Показатели тромбоэластографии исследуемых веществ *in vivo*, n=7

Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	Ф-168	P ₂
SP(min)	10,3±1,6	8,6±1,2	18,3±3,2 P ₁ =0,0006	<0,0001
R(min)	11,6±1,2	9,9±1,2	22,6±3,6 P ₁ <0,0001	<0,0001
K(min)	4,3±1,1	4,8±1,5	19,9±5,9 P ₁ <0,0001	<0,0001
Angle(deg)	43,98±7,0	39,9±2,3	13,1±3,1 P ₁ =0,0002	0,0004
MA(mm)	55,9±3,2	49,6±2,2 P ₁ =0,003	34,3±9,9 P ₁ =0,000008	0,0006
TMA(min)	35,4±2,3	33,4±1,8	59,7±16,1 P ₁ <0,000001	0,002
G(d/sc)	6,3±0,8	4,6±0,81 P ₁ =0,01	2,5±1,3 P ₁ <0,00001	0,4
E(d/sc)	127,3±16,4	101,5±5,9 P ₁ =0,0007	53,6±18,8 P ₁ =0,0001	0,003
TPI(/sec)	15,1±4,6	7,7±1,3 P ₁ =0,001	1,7±1,1 P ₁ =0,0003	0,0005
EPL(%)	1,5±1,1	0,0±0,0 P ₁ =0,0002	0,0±0,0 P ₁ =0,0006	-
A30(mm)	54,6±3,9	39,2±1,7 P ₁ =0,0001	34,2±9,2 P ₁ =0,00007	0,008
CL30(%)	97,5±2,5	100±0,0	99,3±1,9	0,8
LY30(%)	0,58±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	-
CLT(min)	36,9±14,8	46,5±4,1 P ₁ =0,003	20,2±14,9	0,4
A(mm)	52,7±7,1	40,7±1,5 P ₁ =0,004	35,6±7,5 P ₁ =0,00007	0,3
CI	0,38±0,1	-1,8±0,7	-4,9±1,6 P ₂ <0,0001	0,004
LTE(min)	127,5±3,6	>3 hrs	>3 hrs	-

Оценка общего коагуляционного потенциала выявила:

- Индекс тромбодинамического потенциала (ТРІ), который описывает общую коагуляцию, у контрольной группы составил в среднем $15,1 \pm 4,6$. У группы крыс, получавшей Ф-168, он статистически значимо ниже ($1,7 \pm 1,1$), свидетельствуя о развитии гипокоагуляции.

- Время формирования максимальной прочности сгустка (ТМА) у экспериментальной группы удлиняется по сравнению с контролем практически в 1,7 раза.

Характеристики функциональной активности тромбоцитов и состояния фибриногена выявили следующие изменения:

- Параметр МА, характеризующий функциональную активность тромбоцитов, в экспериментальной группе крыс составил $34,3 \pm 9,9$ мм, что достоверно различается с группой контроля – $55,9 \pm 3,2$ мм и пентоксифиллина – $49,6 \pm 2,2$.

- Период R, характеризующий энзиматическую часть коагуляции, удлинился у экспериментальных крыс практически в 2 раза в сравнении с контролем и пентоксифиллином.

- Параметр Angle, отображающий функциональное состояние фибриногена, при введении животным соединения Ф-168, снижен в 3,4 и 3 раза по сравнению с контролем и пентоксифиллином соответственно.

Анализ фибринолитического процесса при введении исследуемого соединения позволил обнаружить, что индекс лизиса сгустка цельной крови (CL30) и LY30, указывающий на процесс фибринолиза в течение 30 мин (динамический показатель) не изменились, а время лизиса сгустка (CLT), в отличие от действия пентоксифиллина, статистически значимо снижался.

Физико-механические свойства сгустка образцов крови (показатели А и G) у животных, получавших соединение Ф-168, были статистически значимо ниже по сравнению с контролем.

Таким образом, при внутрибрюшинном введении соединения Ф-168 характер тромбозаграмм демонстрирует статистически значимое смещение коагуляционного потенциала в сторону гипокоагуляции (ТРІ, ТМА). Образовавшийся сгусток по механико-физическим характеристикам становится неполноценным, склонным к повышенному лизису (А, G).

При этом, чрезмерной активности фибринолитической системы не отмечается (LY30, CL30, A30, CLT).

Эти данные вполне согласуются с результатами исследования методом тромбозаграфии *in vitro*. Изменение показателя связывания тромбоцитов с фибрином (МА), на фоне нормального содержания тромбоцитов и фибриногена, свидетельствует в пользу функционального блока GP IIb-IIIa, что является дополнительным доказательством действия Ф-168, как потенциального блокатора GP IIb-IIIa. При этом отмечается ингибирующее влияние Ф-168 на активность плазменного гемостаза (R, Angle). Снижение показателя, характеризующего функциональное состояние фибриногена, может свидетельствовать об антикоагуляционном действии Ф-168 по типу дисфибриногенемии.

Данные, полученные при исследовании влияния на систему гемостаза Ф-168 и пентоксифиллина при внутрибрюшинном введении интактным крысам, по

спектру антиагрегационной активности полностью соотносятся с результатами, полученными на этапе *in vitro*. Однако соединение Ф-168 проявляло *in vivo* и антикоагуляционную активность (таблица 9). Удлиненное ПВ, АПТВ и время определения концентрации фибриногена в плазме (определенной коагулометрически по методу D. Clauss) в сочетании с удлиненным ТВ позволяет предположить, что в фибриногенез вступает фибриноген с измененными свойствами. Данная биохимическая картина сходна с состояниями, при которых в крови значительно повышено количество различных (физиологических и патологических) антикоагулянтов. Блокируя действие естественным путем образовавшегося тромбина, они имитируют состояние дисфибриногенемии. На это же указывает и удлинение времени свертывания в тесте с рептилазой.

Таблица 9 - Влияние Ф-168 и пентоксифиллина на показатели гемостаза *in vivo*,
n=7

№	Показатель	Контроль	Пентоксифиллин	Ф-168	P ₂
1	Тромбоциты *10 ⁹ /л	724,4±27,6	723,8±34,0 P ₁ =0,96	731,2±31,6 P ₁ =0,53	P ₂ =0,54
2	АДФ- агрегация, мм	52,4±3,8	28,6±4,8 P ₁ <0,00001	17,7±3,2 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001
3	Кол.- агрегация, мм	55,9±4,3	51,6±2,1 P ₁ =0,001	39,5±3,4 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001
4	Адреналин- агрегация, мм	49,8±1,9	47,6±2,8 P ₁ =0,95	33,5±2,9 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001
5	Ристомицин- агрегация, мм	57,3±2,9	55,6±2,9 P ₁ =0,4	56,3±3,7 P ₁ =0,8	P ₂ =0,6
6	Время свертывания по Г.В.Сухареву, сек	94,2±7,6	98,8±7,1 P ₁ =0,11	131,0±4,8 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001
7	Каолиновое время, сек	81,4±3,9	83,2±0,8 P ₁ =0,2	87,3±1,5 P ₁ =0,0004	P ₂ =0,004
8	АПТВ, сек	23,1±1,2	23,4±0,9 P ₁ =0,7	26,4±1,4 P ₁ =0,00003	P ₂ =0,0002
9	ТВ, сек	27,2±0,9	28,3±0,8 P ₁ =0,2	32,5±0,7 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001
10	ПВ, сек	12,4±0,8	12,9±0,9 P ₁ =0,3	16,3±1,1 P ₁ =0,02	P ₂ =0,03
11	Фибриноген, сек	24,3±0,8	25,9±1,9 P ₁ =0,2	27,5±1,4 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001
13	РФМК, ×10 ⁻² г/мл	3,14±0,6	2,9±0,6 P ₁ =0,38	3,2±0,5 P ₁ =0,78	P ₂ =0,23
14	АТ III, %	95,4±0,9	97,2±0,9 P ₁ =0,4	96,5±0,7 P ₁ =0,1	P ₂ =0,7
15	D-димеры, мкг/мл	2,2±0,6	3,0±0,6 P ₁ =0,2	2,6±0,6 P ₁ =0,3	P ₂ =0,1
16	Активность ф-ра Виллебранда, %	78,0±0,3	77,4±0,6 P ₁ =0,14	78,2±0,4 P ₁ =0,7	P ₂ =0,8
17	Рептилазное время, сек	19,8±1,4	18,6±1,2 P ₁ =0,14	24,7±0,7 P ₁ <0,00001	P ₂ <0,00001

Примечание: P₁- уровень статистической значимости различий с контролем; P₂ – групп, получавших пентоксифиллин и Ф-168.

Но результаты проведенных исследований исключают ингибирующее действие на тромбин и фибринообразование ПДФ и РФМК, ввиду их нормальной концентрации в сравнении с контролем, при неизменной активности основного антикоагулянта крови (АТ III). Анализ коагулограммы с применением теста с разведением показывает, что плазма экспериментальной группы крыс пролонгирует время образования сгустка при добавлении ее к плазме контрольных крыс, что, в свою очередь, так же свидетельствует об измененных свойствах фибриногена в присутствии Ф-168. Таким образом, полученные результаты указывают на действие Ф-168 на плазменный компонент гемостаза на уровне III этапа свертывания крови. А определение влияния Ф-168 на время полимеризации фибрин-мономера убедительно свидетельствует о том, что ингибирующий эффект реализуется именно на стабилизирующей стадии трансформации фибриногена в фибрин (таблица 10). Определение активности фактора Виллебранда и данные тромбозластографии свидетельствуют об интактности этого фактора при введении Ф-168, что дополнительно подтверждает предположение о действии исследуемого соединения на сосудисто-тромбоцитарный компонент гемостаза по механизму блокирования рецепторов GP IIb-IIIa.

Таблица 10 - Показатели полимеризации фибрин-мономера животных контрольной и экспериментальной групп

Показатель	n	Контроль	Ф-168	R
Время сборки фибрин-мономеров, сек.	7	36,3±2,8	45,8±3,1 P<0,00001	1,3

Исследование влияния соединения Ф-168 на систему гемостаза с использованием модельных состояний, сопровождающихся повышением агрегации и адгезии тромбоцитов, показало его достаточную эффективность при моделировании генерализованного тромбоза. При моделировании генерализованного коллаген-адреналинового тромбоза соединение Ф-168 и пентоксифиллин в разной степени уменьшали гибель животных (рисунок 3).

При введении раствора, содержащего 0,5 мг коллагена и 0,06 мг адреналина из расчета на килограмм массы тела, в хвостовую вену животным контрольной группы, в течение уже первого эксперимента наблюдали гибель животных. В первые час после инъекции гибель составляла 60% мышей, в первые 3 суток падеж составил 100%. Пентоксифиллин достоверно уменьшал гибель мышей при моделировании системного коллаген-адреналинового тромбоза по сравнению с контролем. Выживаемость составила 57,1%. Основной падеж пришелся на первые сутки после введения индукторов тромбоза. В экспериментальной группе у животных, получивших Ф-168, гибель была значимо меньше, чем в контроле и при введении препарата сравнения. Выживаемость составила 85,7%, а основной падеж пришелся в первые 4 часа эксперимента.

Таким образом, соединение Ф-168 оказалось в 1,5 раза эффективнее пентоксифиллина, проявляя выраженное ингибирующее действие на сосудисто-тромбоцитарный и плазменный компоненты гемостаза.

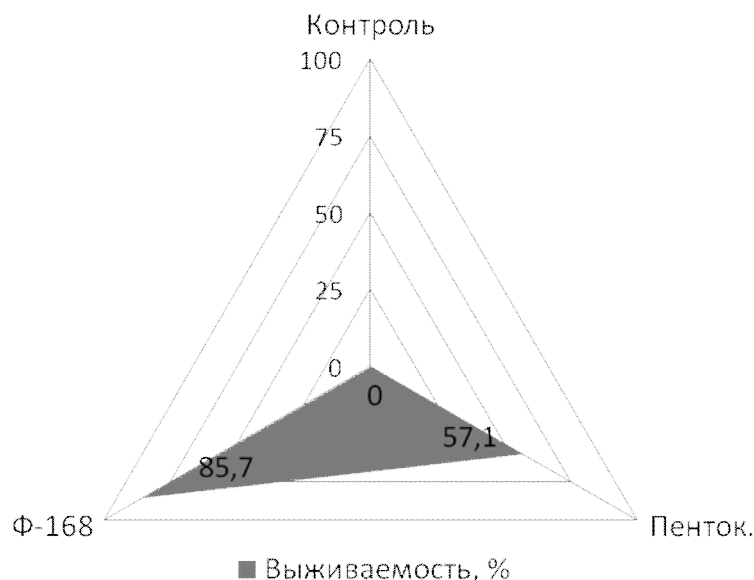


Рисунок 3. Спектры антитромботической активности пентоксифиллина и Ф-168 при моделировании генерализованного тромбоза у мышей.

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости дальнейшего подробного изучения производных ксантина данного ряда, как перспективных антитромботических средств.

ВЫВОДЫ:

1. Впервые синтезированные производные ксантина обладают проагрегантной (С-41, С-53), антиагрегационной и антикоагуляционной активностью (Р-14, Р-15, Ф-170, Ф-168).
2. Удлинение углеродной цепи по N¹-радикалу производных ксантина не влияет на уровень антиагрегационной и антикоагуляционной активности. Активность С⁸-замещенных производных ксантина снижается в следующем порядке: амины (Ф-168, Ф-170) > металлосодержащие соли (Р-14, Р-15) > пиперидиниевые соли (С-52, Р-16) > морфолиниевая соль (Р-19) > диэтиламмониевая соль (Р-18) > гексаметилениминиевая соль (М-13). Наибольшую антиагрегационную и антикоагуляционную активность проявляет соединение Ф-168, содержащее в положении N¹ – этильный, С⁸ - пиперазиновый радикал.
3. По антиагрегационной, дезагрегационной и антикоагуляционной активности соединение 3-метил-8-пиперазино-7-(тиетанил-3)-1-этилксантина гидрохлорид (лабораторный шифр — Ф-168) в экспериментах *in vitro* на донорской крови человека превосходит пентоксифиллин. Об этом свидетельствует выраженное смещение коагуляционного потенциала на тромбоэластограммах, снижение адгезивно-агрегационной функции при АДФ-, коллаген-, адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов.
4. Антиагрегационную, дезагрегационную и антикоагуляционную активность соединение Ф-168 проявляет и в условиях *in vivo* при внутрибрюшинном введении интактным крысам. При этом наблюдается ингибирование агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, коллагеном, адреналином; удлиняется ПВ, АПТВ, ТВ, в то время как активность антитромбина III и фактора Виллебранда, содержание РФМК и D-димеров не подвергается существенным изменениям. Соединение Ф-168 эффективнее пентоксифиллина в 1,5 раза при моделировании адреналин-

коллагенового генерализованного тромбоза. По уровню токсичности соединение Ф-168 относится к группе IV (малотоксичные).

5. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что вероятными биохимическими механизмами действия соединения Ф-168 на систему гемостаза *in vitro* и *in vivo* является блокирование тромбоцитарных рецепторов GP IIb-IIIa и ингибирование процесса самосборки фибрин-мономеров.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Сайтгалина, А.З. Синтез солей (3-метилксантинил-8-тио) уксусных кислот, содержащих тиетановый цикл, и их влияние на агрегацию тромбоцитов / А.З. Сайтгалина, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Ф.Х. Камилов, Ф.А. Халиуллин // **Башкирский химический журнал**. – 2008. – Т.15, №3. – С.63-65.
2. Тимирханова, Г.А. Скрининг соединений, обладающих антиагрегационной активностью среди производных бензимидазола и ксантина / Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Е.Э. Клен, О.Ю. Травников, Д.А. Еникеев, В.А. Катаев // **Вестник РУДН, серия «Медицина»**. – 2008. - №4. - С.68-72.
3. Камилов, Ф.Х. Поиск активных соединений среди производных азотсодержащих гетероциклов, влияющих на систему гемостаза / Ф.Х. Камилов, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Е.Э. Клен, Н.Н. Макарова, Ф.А. Халиуллин // **Фундаментальные исследования**. – 2011. - №3. - С.66-70.
4. Камилов, Ф.Х. Поиск активных соединений в ряду производных ксантина, влияющих на сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза / Ф.Х. Камилов, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Ф.А. Халиуллин, Р.А. Губаева // **Вестник РУДН, серия «Медицина»**. – 2011. - №1. - С.66-70.
5. Камилов, Ф.Х. Поиск соединений, влияющих на систему гемостаза, среди производных солей (3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый цикл / Ф.Х. Камилов, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Р.А. Губаева, А.З. Ахмерова, Ф.А. Халиуллин // **Современные проблемы науки и образования**. – 2011. – № 6; URL: www.science-education.ru/100-4977.
6. Самородов, А.В. Влияние производных ксантина на функциональную активность тромбоцитов / А.В. Самородов, А.З. Сайтгалина, Г.А. Тимирханова, Ф.А. Халиуллин, Ф.Х. Камилов // Сборник научных трудов конференции учёных РБ «Научный прорыв – 2008», посвященный Году социальной поддержки семьи, Дню Республики. – Уфа, 2008. – С.35-37.
7. Тимирханова, Г.А. Поиск активных соединений в ряду производных триазола, влияющих на тромбоцитарный компонент гемостаза / Г.А. Тимирханова, Е.Э. Клен, А.В. Самородов, Ф.Х. Камилов, Ф.А. Халиуллин, А.И. Тимирханов // Материалы Всероссийской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии». - Челябинск, 2009. – С.154-156.
8. Самородов, А.В. Результаты первичных исследований влияния производных ксантина на функциональную активность тромбоцитов / А.В. Самородов, Р.А. Губаева, А.З. Сайтгалина, Ф.Х. Камилов, Ф.А. Халиуллин, Г.А. Тимирханова // Материалы 74-ой Республиканской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины». – Уфа, 2009. – Т.2. - С.124-126.
9. Тимирханова, Г.А. Поиск зависимости «структура-активность» производных ксантина в отношении адгезивно-агрегационной функции

тромбоцитов / Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Ф.Х. Камилов, Ф.А. Халиуллин, А.З. Сайтгалина // Тезисы докладов VIII Всероссийской конференции «Химия и медицина» с международным участием. - Уфа, 2010. – С.296-297.

10. Халиуллин, Ф.А. Синтез и биологическая активность солей 1-замещенных (3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый цикл / Ф.А. Халиуллин, Р.А. Губаева, Ю.В. Шабалина, Д.З. Муратаев, Ф.Х. Камилов, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов // Тезисы докладов VIII Всероссийской конференции «Химия и медицина» с международным участием. - Уфа, 2010. – С.79.

11. Камилов, Ф.Х. Антиагрегационная и антикоагуляционная активность производных солей (3-метилксантинил-8-тио)уксусных кислот, содержащих тиетановый цикл / Ф.Х. Камилов, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, А.З. Ахмерова, Ф.А. Халиуллин // Materiály VII mezinárodní vědecko - praktická konference «Zprávy vědecké ideje - 2011». – Praha, 2011. – D.17. - P.97-100.

12. Катаев, В.А. Корректор системы гемостаза, проявляющий ингибирующее действие на адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов для профилактики патологического тромбообразования / В.А. Катаев, Г.А. Тимирханова, А.В. Самородов, Е.Э. Клен, А.И. Савлуков, Т.Р. Гизатуллин // Патент № 2373929 (РФ) от 27.11.2009.

13. Халиуллин, Ф.А. 3-Метил-8-пиперазино-7-(тиетанил-3)-1-этил ксантина гидрохлорид, проявляющий антиагрегационную и дезагрегационную активность / Ф.А. Халиуллин, Ю.В. Шабалина, Г.А. Тимирханова, Ф.Х. Камилов, А.В. Самородов, Р.М. Шарафутдинов // Патент № 2404181 (РФ) от 20.11.2010.

ЛИЧНОЕ УЧАСТИЕ АВТОРА В ПОЛУЧЕНИИ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ИЗЛОЖЕННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ.

Экспериментальные исследования, статистическая обработка и анализ результатов полученных данных, выполнены лично автором или с его участием.

СВЯЗЬ С ПЛАНОМ НИР.

Работа выполнена на базе кафедры биологической химии Башкирского государственного медицинского университета в рамках комплексной темы и включена в план научных исследований ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России (регистрационный номер 0120.0804869).

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ:

АДФ – аденозиндифосфат

АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время

АТ III – антитромбин III

ЛД₅₀ – 50% летальная доза

ПВ – протромбиновое время

РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы

Соединение Ф-168 – 3-метил-8-пиперазино-7-(тиетанил-3)-1-этилксантина гидрохлорид

ТВ – тромбиновое время

ТЭГ – тромбоэластография

GP IIb-IIIa – гликопротеин IIb-IIIa

Самородов Александр Владимирович

**Поиск новых азотсодержащих гетероциклических соединений, влияющих
на систему гемостаза**

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.

ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»
450000, РБ, г. Уфа, а/я 1293; тел.: (347) 250-81-20; тел./факс (347) 250-13-82.

Подписано в печать 16.03.2012

Формат 60×84/16. Гарнитура Times New Roman.

Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.

Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л.

Тираж 100. Заказ № 781.