

УДК 615.273.53; 547.587.51

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВАРФАРИНА

А.З. Абышев¹, И.К. Журкович², Д.Ю. Ивкин¹, К.Б. Нгуен^{1*}

Резюме. Разработаны методы синтеза 7 производных варфарина, из которых три являются комбинированными. Современными спектральными методами (ИК-, ЯМР-спектроскопия) определены их структурные особенности, физико-химические свойства синтезированных соединений. Изучена их антикоагулянтная активность *in vivo* путем определения протромбинового времени (ПТВ). Наиболее выраженной активностью, сравнимой с препаратом варфарином (37,4±2,8 с), обладали субстанции **AZ-5** (конъюгат варфарина с фрагментом субстанции диуманкала, 41,2±2,3 с) и **AZ-9** (диуманкал, 45,18±4,85 с), сравнимые с препаратом варфарином (37,4±2,8 с).

Ключевые слова: кумарин, варфарин, диуманкал, антикоагулянтная активность.

SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SOME DERIVATIVES OF WARFARIN

A.Z. Abyshev¹, I.K. Zhurkovich², D.Yu. Ivkin¹, C.B. Nguyen^{1*}

Abstract. Methods of synthesis of 7 warfarin derivatives from which three are combined has been developed. Their structural features, physicochemical properties of synthesized compounds by modern and spectral methods (IR, NMR spectroscopy) were determined. Their anticoagulant activity *in vivo* were studied by determining prothrombin time (PT). The most pronounced activity was possessed by substances **AZ-5** (conjugate warfarin with a fragment of the substance diumancal, 41,2±2,3 s) and **AZ-9** (diumancal, 45,18±4,85 s), comparable with the reference drug warfarin (37,4±2,8 s).

Keywords: coumarin, warfarin, diumancal, anticoagulant activity.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14 лит. А

2 – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА», 192019, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, lit. A, 14, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – Institute of Toxicology FMBA, 1, Bekhtereva str., St-Petersburg, 192019, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоэмболия сосудов разной локализации занимает одно из ведущих мест среди причин инвалидизации, смертности и сокращения средней продолжительности жизни населения, которые определяют необходимость широкого применения в медицинской практике препаратов с антикоагулянтными свойствами. Антикоагулянты непрямого действия (антагонисты витамина К) являются краеугольным камнем современной противотромботической терапии [1–3].

Доказательные исследования показали высокую эффективность антикоагулянтов непрямого действия для предупреждения и лечения венозной тромбоэмболии, профилактики системных эмболий, ассоциированных с фибрилляцией предсердий или искусственными клапанами сердца, предотвращения инсульта и повторного инфаркта миокарда [2–4].

Варфарин является наиболее часто применяемым антикоагулянтом данной группы лекарственных препаратов. Однако использование

варфарина в медицинской практике ограничено ввиду его тяжелых побочных эффектов. Среди них нужно выделить возможность возникновения серьезных кровотечений [1, 5].

Исходя из изложенных выше данных мы в течение многих лет продолжаем поиск новых, наиболее активных и безвредных лекарственных веществ среди производных кумарина в двух направлениях:

- 1) среди производных кумарина природного и синтетического происхождения, не содержащих в 4-м положении оксигруппы;
- 2) путем химической модификации структуры варфарина с целью сохранения его высокой фармакологической активности и снижения токсичности, особенно для избавления от такого побочного эффекта варфарина, как обильные кровоизлияния при его оральном применении. Более подробная информация по синтезу и фармакологической активности полученных соединений представлена в монографиях [1, 6].

Поэтому задачей настоящей работы является расширение арсенала антикоагулянтов непрямого действия, поиск нового средства на основе химической структуры варфарина, имеющего более низкую токсичность, чем варфарин, широко применяющийся в медицинской практике. Указанная задача нами решается в течение многих лет путем создания новых антикоагулянтов непрямого действия на основе структуры различных комбинированных производных кумарина, поскольку целенаправленный поиск и синтез новых модифицированных эффективных лекарственных средств на основе молекулы варфарина и изучение их биологической активности является весьма актуальным научным направлением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная химическая часть

На спектрометре ФСМ-1201 («СПб Инструментс», Россия) регистрировали ИК-спектры веществ в виде суспензии в вазелиновом масле или в дисках с KBr. Спектры ЯМР сняты на спектрометрах Bruker Avance III 400MHz (Bruker, США), внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС). Температуры плавления синтезированных соединений определены на приборе Melting points Apparatus IA9000 Series (Electrothermal, США).

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil UV254 (ПТСХ-П-В-УФ) (ЗАО «Сорбполимер», Россия) или Kieselgel 60 F254 (Merck, США) размером 10×20 см в системе растворителей бензол – этилацетат в соотношении 3:1.

ВЭЖХ-анализы выполнены на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором модели 168 с диодной матрицей. Рабочая длина волны 220 нм. Колонка из нержавеющей стали (250×4,6 мм), упакованная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм типа Nucleosil C₁₈, температура колонки 30±1 °С.

Подвижная фаза 1: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 150 мл деионизованной воды, доводят объем до метки ацетонитрилом (сорт 0, ос.ч., «Криохром», Россия) и перемешивают.

Подвижная фаза 2: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 100 мл деионизованной воды, доводят объем до метки ацетонитрилом и перемешивают.

Испытуемые растворы образцов с концентрацией 0,1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ацетонитриле и доводят объем раствора до метки тем же растворителем.

Условия хроматографирования:

Колонка: Symmetry C18, 5 мкм, 4,6×250 мм (Waters, США)

Подвижная фаза: смесь воды и ацетонитрила в соотношении 15:85 (для AZ-1,5) или 10:90 (для AZ-9)

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Температура колонки: 35 °С

Объем пробы: 20 мкл

Длина волны УФ-детектора: 220 нм

Время регистрации хроматограммы: 0–40 мин.

Общая методика синтеза соединений AZ-4 и AZ-5

В круглодонную колбу объемом 100 мл помещают 0,27 г (1 ммоль) 4-(2-бромэтокси)кумарина или 7-(2-бромэтокси)кумарина, 0,31 г (1 ммоль) варфарина, 1,0 г карбоната калия; добавляют 25 мл ДМФА. Реакционную смесь в течение 10 часов нагревают при температуре 100–110 °С при постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки. Цвет раствора: оранжево-коричневый. Затем реакционную массу вливают в стакан с водой 150 мл с работающей магнитной мешалкой. Цвет раствора становится мутно-молочным. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, тщательно промывают водой и остаток перекристаллизовывают из различных растворителей.

Общая методика синтеза соединений AZ-1 и AZ-2

1,0 г (3,2 ммоль) варфарина растворяют в 15 мл ДМФА, 1,0 мл (12,4 ммоль) сухого пиридина в круглодонной колбе вместимостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой, добавляют 2,0 мл уксусного ангидрида или пропионового ангидрида. Реакционную смесь постоянно перемешивают при комнатной температуре (20–25 °С) до полного исчезновения исходного варфарина при ТСХ-контроле (около 3 ч). Затем реакционную смесь вливают в стакан с дистиллированной водой (100 мл). Выпадает осадок белого цвета. Осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из спирта.

Общая методика синтеза соединений AZ-3 и AZ-6

3,1 г (19,1 ммоль) 4-гидроксикумарина растворяют в 50 мл ацетона и 20 мл ДМФА в круглодонной колбе вместимостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой, добавляют 3,3 мл (38,3 ммоль) дибромэтана и 1,66 г (12,0 ммоль) K₂CO₃. Затем реакционную смесь кипятят в течение 24 часов и вливают в стакан с водой 150 мл с работающей магнитной мешалкой. Осадок отфильтровывают. Чистый продукт получают с помощью колоночной хроматографии на колонке (5×150 см) с нейтральной Al₂O₃ (800 г, II степени активности). Элюирование проводят смесью хлористого метилена и петролейного эфира, постепенно увеличивая полярность системы.

Методика синтеза соединений AZ-7

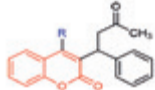



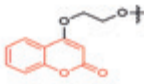

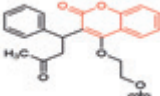
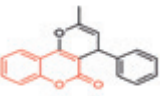
В круглодонную колбу объемом 50 мл помещают 0,31 г (1 ммоль) варфарина, 15,0 мл хлористого тионила. Реакционную смесь постоянно перемешивают в обратном холодильнике до кипения в течение 2 ч с использованием магнитной мешалки. Избыток SOCl_2 упаривают при пониженном давлении. Реакционная масса была помещена в морозильную камеру ($-18\text{ }^\circ\text{C}$) на 10 часов. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают водой. Затем перекристаллизовывают из изопропилового спирта. Осадок отфильтровывают, промывают водой и высушивают при $80\text{ }^\circ\text{C}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение и физико-химические свойства синтезированных нами новых соединений определены современными химическими и спектральными методами (ИК-, ЯМР-спектроскопия и хроматография, в частности ВЭЖХ) (таблицы 1–5).

Таблица 1.

Структуры некоторых новых комбинированных производных варфарина

		
Соединения	Название	R
AZ-1	4-ацетат варфарина	
AZ-2	4-пропионат варфарина	
AZ-3	4-бром-этокси-варфарин	
AZ-4	4-кумаринил-этокси-варфарин	
AZ-5	7-кумаринил-этокси-варфарин	
AZ-6	димер варфарина	
AZ-7	метаболит варфарина	

При этом следует отметить, что для подтверждения структуры синтезированных новых и известных (для сравнения их фармакологических свойств) веществ и возможных примесей в них исходных используемых компонентов, наряду с характерной хи-

мической реакцией на 2Н-1-бензопиранового цикла, также использовали вышепредставленные результаты физико-химических и спектральных исследований. В частности:

- ИК-спектр исследуемого вещества, снятый в виде суспензии в вазелиновом масле или в диске с KBr в области от 400 до 4000 см^{-1} , должен иметь полное совпадение полос поглощения с полосами поглощения прилагаемого к соответствующим ФС или ФСП спектра по положению и относительным интенсивностям полос (таблица 4).

Таблица 2.

Структуры синтетических веществ, используемых для сравнительного анализа фармакологических данных

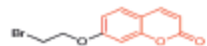
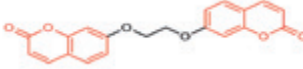
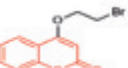
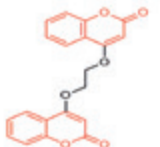
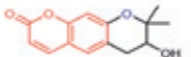
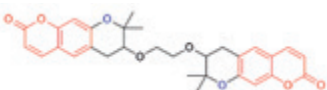
Соединения	Название	Структурные формулы
AZ-8	7-(2-бромэтокси)-кумарин	
AZ-9	диуманкал	
AZ-10	4-(2-бромэтокси)-кумарин	
AZ-11	4,4'-этилендиокси-2Н-1-дibenзопиран-2,2'-дион	
AZ-12	декурсинол	
AZ-13	димер декурсинола	

Таблица 3.

Содержание основного вещества и примесей в наиболее активных синтезированных субстанциях

№ п/п	Лабораторные названия	Содержание основного вещества и примесей (%)*		
		Действующее вещество	Примеси	
			Единичные	Суммарно
1	AZ-1	98,7	Варфарин – 1,3	1,3
2	AZ-5	99,7	7-бромэтоксикумарин – 0,2; Варфарин – 0,1	0,3
3	AZ-9	99,5	7-оксикумарин – 0,3; 7-бромэтоксикумарин – 0,2	0,5

Примечание: * – расчет выполнен по методу внутренней нормализации площадей.

Таблица 4.

Некоторые данные ИК- и ¹H-ЯМР – спектров синтезированных соединений

Соединения	Молекулярная формула	Выход, %	Температура плавления, °С	ИК-спектр, см ⁻¹	¹ H-ЯМР (δ, м.д.)
AZ-1	C ₂₁ H ₁₈ O ₅	89	116–118	1763 (оч.с.), 1720 (с.), 1454-1627 (ср.)	2,1 (с, 3H), 2,51 (с, 3H), 3,49 (д, 2H), 4,85 (т, 1H), 7,22-7,52 (м-комплекс)
AZ-2	C ₂₂ H ₂₀ O ₅	50	134–136	1626 (C=O в алифатической цепочке), 1718 (C=O в бензолирановом цикле), 1774 (сложноэфирная группа)	1,38 (т, J = 7,53 Гц, 1H), 2,19 (с, 1H), 2,83 (дк, J = 7,49, 2,64 Гц, 1H), 3,48 (ддд, J = 41,40, 18,14, 7,02 Гц, 1H), 7,33-7,17 (м, 1H), 7,36 (дд, J = 11,02, 4,2 Гц, 1H), 7,52-7,46 (м, 1H)
AZ-3	C ₂₁ H ₁₉ O ₄ Br	30	181–183	1720 (C=O в бензолирановом цикле), 1455-1565 (-CH=CH- в аром. цикле)	1,25 (т, 1H), 1,80 (с, 1H), 2,0 (с, 4H), 3,00-5,20 (м, 7H), 7,0-8,0 (м, 9H)
AZ-4	C ₃₀ H ₂₄ O ₇	42	198–200	1622 (оч.с.), 1710 (с.), 1454-1564 (ср.)	2,1 (с, 3H), 4,62-4,71 (д, 4H), 3,5 (д, 2H), 4,98 (т, 1H), 7,2-7,7 (м-комплекс)
AZ-5	C ₃₀ H ₂₄ O ₇	38	210–212	1700, 1730 (C=O в циклах), 1650 (C=O в алифатической цепочке), 1600 (-CH=CH-) 1280, 1285(-O-CH ₂ -)	2,20 (с, -COCH ₃), 2,90 и 3,20 (д и дд, J = 29,09 Гц, J ₁ = 5,4 и 18,3 Гц, 2-CH), 4,0 (дд, J = 9,6 и 18,3 Гц, 3-CH), 4,70 (д, J = 5,7 Гц, 13-CH ₂), 5,0 (д, J = 5,4 Гц, 14-CH ₂), 6,30 (д, J = 9,48 Гц, 18-CH), 6,9 (м, 15-CH), 19-CH), 7,3 (м, 16-, 11-, 10-, 9-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-CH), 7,70 (д, J = 9,49 Гц, 17-CH), 7,9 (д, J = 7,85 Гц, 12-CH)
AZ-6	C ₄₀ H ₃₄ O ₈	28	192–195	1624 (C=O в алифатической цепочке), 1722 (C=O в бензолирановом цикле), 2926, 3101 (-CH ₂ -CH ₂ -)	2,19 (д, J = 7,01 Гц, 1H), 3,08 (дд, J = 18,32, 4-83 Гц, 1H), 4,15 (тд, J = 21,78, 10,90 Гц, 1H), 4,69-4,57 (м, 1H), 4,93-4,84 (м, 1H), 5,12 (дд, J = 10,32, 10,32 Гц, 1H), 7,39-7,14 (м, 1H), 7,58-7,47 (м, 1H), 7,93 (дд, J = 7,91, 1,09 Гц, 1H)
AZ-7	C ₁₉ H ₁₃ O ₃	30	141–143	1612,7, 1635,8 (C=C), 1726,5 (C=O в бензолирановом цикле)	2,10 (с, 1H), 4,52 (дд, J = 4,46 Гц, 0,99 Гц, 1H), 5,09 (дд, J = 4,51, 0,95 Гц, 1H), 7,27-7,20 (м, 1H), 7,40-7,27 (м, 1H), 7,58-7,51 (м, 1H), 7,89 (дд, J = 7,87, 1,48 Гц, 1H)
AZ-8	C ₁₁ H ₉ O ₃ Br	82	135–136	1720, 1650 (C=O); 1500, 1610 (-CH=CH-), 1405 (-O-CH ₂ -), 500-610 (-CH ₂ -Br)	4,66 (т, J = 6,0 Гц, 2H), 4,33 (т, J = 6,0 Гц, 2H), 6,24 (д, J = 9,6 Гц, 1H), 6,77 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 6,84 (дд, J = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 7,37 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7,62 (д, J = 9,6 Гц, 1H)
AZ-9	C ₂₂ H ₁₄ O ₆	65	239–241	1730 (C=O), 1520, 1630 (-CH=CH-), 1405 (-O-CH ₂ -)	4,42 (с, 4H), 6,37 (д, J = 9,29 Гц, 2H), 6,85-6,93 (м, 4H), 7,40 (д, J = 8,28 Гц, 2H), 7,65 (д, J = 9,54 Гц, 2H)
AZ-10	C ₁₁ H ₉ O ₃ Br	65	166–168	1700 (-C=O), 1610, 1570, (-CH=CH-), 1430 (-O-CH ₂ -), 500-595 (-CH ₂ -Br)	5,70 (с, H-3), 7,20–7,80 (м, H-5 и H-6), 3,80 (т, Ar-O-CH ₂ -), 4,50 (т, -CH ₂ -Br)
AZ-11	C ₂₂ H ₁₄ O ₆	75	234–236	1695 (-C=O), 1650, 1630, 1505 (-CH=CH-), 1450–1390 (-O-CH ₂ -)	4,72 (с, 4 H), 6,04 (с, 2 H) 7,25–7,35 (м, Гц = 7,78, 7,78 Гц, 2 H), 7,38 (д, J = 8,28 Гц, 2 H), 7,57–7,68 (м, J = 7,53, 7,53 Гц, 2 H), 7,78 (д, J = 7,78 Гц, 2 H)
AZ-12	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	40	180–181	3460 (-OH), 1710 (C=O в бензолирановом цикле), 1635, 1570, 1500 (-CH=CH-)	6,24, 7,60 (д, J = 10 Гц, H-3 и H-4), 6,80, 7,30 (с, H-8 и H-5), 3,9 (т, J = 6 Гц, H-3), 3,15 (дд, J ₁ = 17,1 Гц, J ₂ = 4,6 Гц, HA-4), 2,85 (дд, J ₁ = 17,1 Гц, J ₂ = 6,6 Гц, HB-4), 1,9 (д, J = 6,6 Гц, -OH), 1,34, 1,45 (с, 2CH ₃)
AZ-13	C ₃₀ H ₃₀ O ₈	60	236–238	1700 (C=O), 1610, 1560, 1500 (-CH=CH-), 1280 (простая эфирная связь)	6,0 и 7,33 (д, J = 10 Гц, H-3 и H-4), 6,54 и 6,94 (с, H-8 и H-5), 1,26 и 1,28 (с, 4-CH ₃), 2,66 и 2,97 (к, J ₁ = 5,0 Гц, J ₂ = 17,0 Гц, 2 Ar-CH ₂ -), 3,70 (м, 2 -CH-O-), 4,5 (с, -O-CH ₂ -CH ₂ -O-)

2. Время удерживания основного пика на хроматограмме раствора действующего вещества, определенного методом ВЭЖХ, должно соответствовать времени удерживания пика стандартного образца (для варфарина: $3,92 \pm 0,20$, AZ-8: $3,69 \pm 0,20$; AZ-5: $5,26 \pm 0,20$; AZ-9: $9,88 \pm 0,20$).
3. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР в области от 0 до 8 м.д. и от 20 до 160 м.д. соответственно должны иметь набор сигналов, характерных для прилагаемых спектров стандартного образца.

Экспериментальная фармакологическая часть

Данный раздел работы выполнен на 24 белых нелинейных половозрелых мышах-самцах массой 18–20 г и на 70 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 160–200 г, полученных из питомника «Рап-полово» РАМН.

Содержание экспериментальных животных и проведение исследования осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), а также «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [7].

Антикоагулянтную активность устанавливали путем определения протромбинового времени (таблица 5). Анализируемые субстанции вводили (перорально) группе белых беспородных крыс-самцов массой 180–200 г (10 особей) в течение недели, контрольной группе крыс вводили тот же объем ДМСО, препаратом сравнения являлся варфарин. Расчет доз вводимых веществ осуществляли путем пересчета по молярной эквивалентности дозы субстанции варфарина.

По результатам исследований было установлено, что протромбиновое время субстанций AZ-6 (димер варфарина), AZ-7, -8 и AZ-12 оказалось на уровне контрольного опыта, а AZ-2, -3, -4, -10, -11 и -13 – меньше протромбинового времени препарата сравнения – варфарина. Это свидетельствует о том, что димер варфарина и соединения AZ-7, -8 и -12 не обладают антикоагулянтной активностью, а соединения AZ-2, -3, -4, -10, -11 и -13 проявляют слабое антикоагулянтное свойство. Протромбиновое время веществ AZ-1 (ацетат варфарина), AZ-5 (конъюгат варфарина с фрагментом субстанции диуманкала) и AZ-9 (субстанция диуманкала) оказалось больше протромбинового времени препарата сравнения. При этом стоит отметить, что данный показатель у вещества AZ-9 немного превышает значение показателя веществ AZ-1 и AZ-5.

Из этого можно сделать вывод, что субстанции AZ-1, AZ-5 и AZ-9 обладают более высокой антикоагулянтной активностью в сравнении с варфарином. Таким образом, антикоагулянтная активность исследуемых соединений возрастает в ряду AZ-6, -7, -8, -12 < AZ-2, -3, -4, -10, -11, -13 < варфарин < AZ-1 < AZ-5 < AZ-9 (таблица 5).

Таблица 5.

Результаты определения протромбинового времени

Препараты	Испытуемые дозы, мг/кг	ПТВ, с
Диметилсульфоксид (ДМСО, группа контроля)		17,8±1,7
Варфарин (группа препарата сравнения)	0,43	37,4±2,8
AZ-1	0,49	40,4±1,4
AZ-2	0,51	21,2±3,1
AZ-3	0,52	20,3±2,9
AZ-4	0,69	21,8±1,3
AZ-5	0,65	41,2±2,3
AZ-6	0,89	11,4±0,9
AZ-7	0,41	18,3 ±2,8
AZ-8	0,35	15,2±1,7
AZ-9	0,49	45,18±4,85
AZ-10	0,35	21,4±1,2
AZ-11	0,49	27,6±1,6
AZ-12	0,32	18,3±2,8
AZ-13	0,64	24,2±2,1

В связи с тем, что вещества AZ-1, AZ-5 и AZ-9 проявили наиболее высокую активность, для них по ГОСТ 32296-2013 [7] была определена острая токсичность (LD_{50}), которая превышала 2000 мг/кг, что позволяет отнести данные вещества к малотоксичным (таблица 6). Для указанных соединений также был проведен анализ активированного парциального тромбoplastического времени, концентрации фибриногена и величины протромбинового времени.

Определение острой токсичности субстанции определяли методом фиксированной дозы. Группе животных одного пола, используя пошаговую процедуру, дали фиксированные дозы 5, 50, 300 и 2000 мг/кг (в особых случаях можно рассматривать дополнитель-

ную фиксированную дозу 5000 мг/кг). Начальная доза подбирается на основе прицельного исследования, так как доза предполагает воспроизведение некоторых признаков токсичности, не причиняя сильных токсических действий или летального исхода. Затем группам животных могут вводиться более высокие либо низкие дозы, это зависит от наличия или отсутствия признаков токсичности или летального исхода. Процедура продолжается до тех пор, пока доза не приведет к выраженной токсичности или пока не будет зафиксирован один случай смерти, а также до тех пор, пока не будет наблюдаться отсутствие реакции при введении наибольшей дозы или пока не наступит смерть при наименьшей дозе [8].

Следует отметить, что определение протромбинового времени позволяет тестировать II, V, VII и X факторы тромбинового комплекса. Тромбопластин (фактор III тромбиназа) превращает протромбин плазмы крови в присутствии ионов кальция в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин.

Как видно из таблицы 6, соединения AZ-1, AZ-5 и AZ-9 имеют сопоставимое с варфарином значение протромбинового времени, Соединение AZ-9 немного активнее. Также тенденция сохраняется при проверке активированного парциального тромбопластинового времени. Концентрацию фибриногена в плазме данные соединения снижали эффективнее варфарина.

Сравнивая электрокардиограммы животных в начале и конце эксперимента, мы заметили, что у крыс, получавших варфарин, существенно снижалось значение зубца R, что свидетельствует о малом наполнении сердца, тогда как у крыс других групп, получавших AZ-1, AZ-5 и AZ-9 такого не наблюдалось.

Исходя из результатов исследования острой токсичности, проведённой на белых беспородных мышях, следует отметить, что исследуемые соединения

являются менее токсичными, чем варфарин. Испытания специфической активности на двух видах животных (крысы и кролики) показало более высокий антикоагуляционный эффект, чем у препарата сравнения. Безопасность применения наиболее активных соединений AZ-1, AZ-5 и AZ-9 подтверждена гистологическими исследованиями. В качестве примера представляем результаты изучения вещества AZ-5 (рисунок 1).

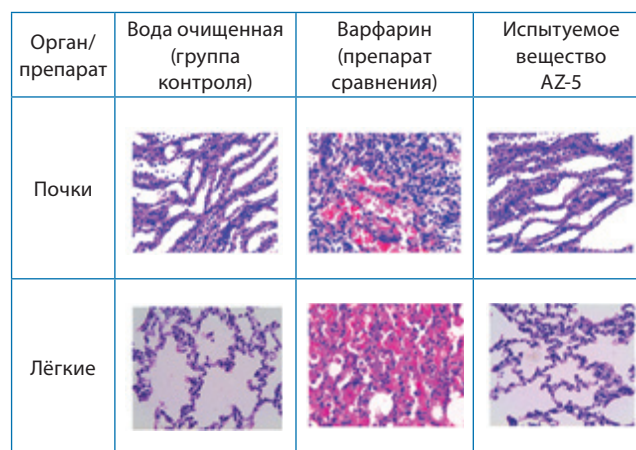


Рисунок 1. Гистологические срезы внутренних органов крыс

Гистологическое исследование выявило массовые кровоизлияния в лёгких, печени, почках, сердце и желудке «варфариновых» крыс и отсутствие их в других группах, например в случае применения AZ-5 и AZ-9. На рисунке 1 представлены гистологические срезы лёгких и почек крыс.

Материал фиксировался в формалине в течение недели. После фиксации объекты были залиты парафином. Полученные парафиновые блоки нарезали на санном микротоме толщиной 10 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Исследование проводилось с помощью объектива x40 (увеличение в 600 раз) на 5 областях. При этом в контрольных

Таблица 6.

Сравнительная антикоагулянтная активность наиболее эффективных субстанций

Субстанции	ED ₅₀ , мг/кг	LD ₅₀ , мг/кг	ПТВ, с	АПТВ, с	СФ/ТВ
ДМСО			17,8±1,7	124,8±10,3	9,1±1,4/26,95±1,95
Варфарин	0,43	90,0	37,4±2,8	363,5±27,2	7,3±1,5/42,22±3,8
AZ-1	0,50	1570	40,4±1,4	290,3±25,0	4,50±2,0/30±3,5
AZ-5	0,65	1750	41,35±4,35	348,4±19,8	5,8±0,8/35,15±2,15
AZ-9 (Диуманкал)	0,1–0,05	2500	45,18±4,85	368,8±23,5	6,8±1,1/44,80±4,35

органах не наблюдалось отека ткани, а при использовании варфарина наблюдались многочисленные кровоизлияния на всех пяти областях. При применении исследуемых новых веществ AZ-5 выраженных отёков паренхимы тканей и кровоизлияний не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в процессе проведенных химико-фармакологических исследований установлено, что из числа синтезированных комбинированных соединений некоторые обладают антикоагулянтной активностью. Наиболее выраженной активностью обладают субстанции AZ-5 (конъюгат варфарина с фрагментом субстанции диуманкала) и AZ-9 (субстанция диуманкала). Это свидетельствует о получении структурных аналогов варфарина со схожей антикоагулянтной эффективностью, но гораздо менее токсичных, чем базовая молекула. Поэтому данные соединения рекомендуются для более глубоких доклинических и клинических фармакологических исследований с целью внедрения их в медицинскую практику в качестве новых непрямым антикоагулянтов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Р.А. Абышев. Природные и синтетические кумарины и флавоноиды. – Баку: Наука и образование, 2014. 482 с.
2. J. Hirsh, J.E. Dalen et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range // CHEST Journal 108. 1995. № 4. P. 231S–246S.
3. D.N. Salem, P.D. Stein et al. Antithrombotic therapy in valvular heart disease – native and prosthetic: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy // CHEST Journal 126. 2014. № 3. P. 457S–482S.
4. E.A. Nutescu, A. Burnett et al. Pharmacology of anticoagulants used in the treatment of venous thromboembolism // Journal of thrombosis and thrombolysis. 2016. V. 41. № 1. P. 15–31.
5. M.I. Aguilar, R.G. Hart et al. Treatment of warfarin-associated intracerebral hemorrhage: literature review and expert opinion // Mayo Clinic Proceedings. 2007. V. 82. № 1. P. 82–92.
6. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Е.В. Семенов. Антагонисты ионов кальция нового поколения. – Баку: АМУ, 2003. 236 с.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
8. ГОСТ 32296-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы. – М.: Стандартинформ, 2014. 12 с.

teg

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И КОМПЛЕКТУЮЩИЕ
ДЛЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

MPA
TECHNICAL DEVICES



Оснастка для блистерно-картонажных
линий ведущих производителей от TEG



Роторно-поршневые насосы, иглы и
комплектующие для стерильных линий розлива
всех ведущих производителей от итальянской
компании MPA technical devices

• оригинальные расходные материалы и комплектующие от европейских производителей
TEG и MPA technical devices - гарантия бесперебойной работы оборудования

• низкие эксплуатационные затраты
• срок поставки по РФ от 3 недель