

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

**На правах рукописи**

**ГАЙДУКОВА КСЕНИЯ АНДРЕЕВНА**

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ,

доктор медицинских наук, профессор

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Кучерявенко Аида Фатиховна

**ВОЛГОГРАД – 2020**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	6
Глава 1. Основные подходы к поиску и фармакологической коррекции состояний, сопровождающихся повышенным тромбогенным потенциалом крови (обзор литературы).....	13
1.1. Социальная значимость процесса тромбогенеза .....	13
1.2. Механизмы активации тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза .....	14
1.3. Методы фармакологической коррекции процессов агрегации тромбоцитов.....	20
1.4. Обоснование роли перекисного окисления липидов в тромбообразовании. ....	26
1.5. Бензимидазолы как перспективный класс для поиска новых лекарственных средств. ....	27
Глава 2. Материалы и методы исследований .....	30
2.1. Материалы исследований.....	30
2.2. Методы исследований .....	42
Метод исследования функциональной активности тромбоцитов <i>in vitro</i> .....	42
Метод исследования антиоксидантной активности. ....	44
Метод исследования функциональной активности тромбоцитов <i>in vivo</i> . ....	45
Метод проведения анализа зависимости между антиагрегантной активностью и химической структурой производных бензимидазола.....	47
Методы исследования антитромботических свойств соединений. ....	47
Модель «время кровотечения» на мышах .....	53
Методы исследования механизма антиагрегантного действия.....	53
Исследование влияния соединений на баланс тромбоксана $B_2$ и 6-кето-простагландина ( $PGF_{1\alpha}$ ). ....	56
Измерение уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика. ....	57
Изучение общетоксических свойств. ....	58
Исследование острой токсичности ( $LD_{50}$ ). ....	61
Статистическая обработка данных.....	62
Глава 3. Поиск соединений с антиагрегантной активностью в ряду новых производных бензимидазола.....	63

3.1. Поиск соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов <i>in vitro</i> .....	64
3.2. Антиагрегантное действие соединений РУ-1263, РУ-1144 и РУ-1261 в опытах <i>in vivo</i> .....	69
3.3. Острая токсичность соединения РУ-1144.....	72
3.4. Зависимость антиагрегантной активности от химической структуры соединений.....	74
3.5. Заключение.....	87
Глава 4. Исследования влияния соединения РУ-1144 на тромбообразование у интактных животных и животных с экспериментальной патологией.....	88
4.1. Изучение антитромботической активности соединения РУ-1144 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс.....	89
4.2. Исследование антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.....	90
4.3. Изучение антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели Global Thrombosis Test (по Горогу).....	92
4.4. Исследование влияния соединения РУ-1144 на выживаемость мышей на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза.....	93
4.5. Определение антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс с экспериментальным инфарктом миокарда.....	99
4.6. Исследование антитромботической активности соединения РУ-1144 на модели венозного тромбоза, индуцированного полной перевязкой нижней полой вены крыс.....	100
4.7. Изучение влияния соединения РУ-1144 на время кровотечения.....	102
4.8. Заключение.....	102
Глава 5. Изучение механизма антиагрегантного действия нового производного бензимидазола соединения РУ-1144.....	106
5.1. Влияние соединения РУ-1144 на рецепторные пути активации тромбоцитов.....	107

5.1.1. Изучение влияния соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ. ....	107
5.1.2. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на модели адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов. ....	108
5.1.3. Исследование антиагрегантной активности РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на модели агрегации тромбоцитов плазмы кроликов, индуцированной арахидоновой кислотой. ....	109
5.1.4. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов. ....	110
5.1.5. Исследование антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной фактором активации тромбоцитов (ФАТ). ....	111
5.1.6. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной ристоцетином. ....	112
5.1.7. Исследование антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином. ....	113
5.1.8. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, вызванную агонистом PAR1 (протеазо-активированные рецепторы тромбоцитов). ....	114
5.1.9. Исследование антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов U 46619. ....	114
5.1.10. Влияние соединения РУ-1144 на пуриновые P2Y <sub>1</sub> и P2Y <sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов. ....	115
5.2. Влияние соединения РУ-1144 на тромбоксан-простациклиновый баланс в тромбоцитах крыс	117
5.2.1. Исследование влияния соединения РУ-1144 на продукцию тромбоксана В <sub>2</sub> в тромбоцитах интактных крыс. ....	117
5.2.2. Влияние соединения РУ-1144 на продукцию 6-кето-простагландина F1 <sub>α</sub> . ....	119

5.3. Влияние соединения РУ-1144 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах.....	120
5.3.1. Действие соединения РУ-1144 на общий уровень кальция в тромбоцитах.....	120
5.4. Заключение.....	123
Глава 6. Общетоксические свойства соединения РУ-1144.....	128
6.1. Исследование влияния соединения РУ-1144 на поведенческий статус мышей (тест «открытое поле»).....	128
6.2. Влияние соединения РУ-1144 на эмоциональный статус, рефлексы и нервно-мышечную возбудимость.....	133
6.3. Влияние соединения РУ-1144 на реактивность, двигательную и мышечную координацию животных.....	135
6.4. Действие соединения РУ-1144 на вегетативную нервную систему.....	138
6.5. Заключение.....	141
Глава 7. Обсуждение результатов.....	142
Список условных сокращений.....	167
Список литературы.....	169

## **ВВЕДЕНИЕ.**

### **Актуальность темы исследования.**

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

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

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

процессов, что приводит к повышенному тромбообразованию [Berger M., 2019; Fuentes E., 2019].

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

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

Химический класс производных бензимидазола перспективен для разработки потенциальных антиагрегантных средств [Chang Y., 2017; Baldisserotto A., 2019]. В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета была выявлена способность производных бензимидазола блокировать процессы агрегации тромбоцитов, а также наличие антиоксидантной активности у представителей данного класса, в молекулярном остове которых присутствуют «ловушки» свободных радикалов [Косолапов В.А., 2012, 2013; Спасов А.А., 2013; Кучерявенко А.Ф., 2016, 2019]. Именно поэтому, поиск новых соединений с антиагрегантной активностью в ряду производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель, является актуальным.

### **Степень разработанности.**

Одной из проблем современной кардиологии является потребность в высокоэффективных препаратах для лечения и профилактики тромбообразования с минимальными побочными эффектами [Михайлова И. Е., 2014]. Уже длительное время на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолГМУ продолжается поиск высокоактивных соединений в ряду бензимидазола. Среди производных данной группы описано много соединений с антиагрегантной [Кучерявенко А.Ф., 2016], а

также антиоксидантной активностью [Kosolapov V.A. 2019]. Так, было показано, что при введении в структуру бензимидазола диоскифенильного фрагмента, происходит повышение антитромбогенной активности [Спасов А.А., 2013]. В предварительных исследованиях было показано, что при изменении диоскифенильного фрагмента на дитретбутильный в структуре бензимидазолов в положение R1 происходит повышение как антиагрегантной, так и антиоксидантной активности [Алексеева А.А., 2007; Berrani A., 2018]. Таким образом, является целесообразным поиск новых соединений в ряду бензимидазола, с включенным в структуру экранированным фенольным заместителем, на наличие антиагрегантной и антиоксидантной активности.

### **Цель исследования.**

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

### **Задачи исследования.**

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

### **Научная новизна исследования.**

Впервые установлено наличие высоких антиагрегантных и антиоксидантных свойств производных бензимидазола, представленных такими молекулярными

остовами, как *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолы, *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолы и *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолы. В ходе проведенного исследования было выявлено соединение под шифром РУ-1144, у которого наблюдается выраженное антиагрегантное действие, превосходящее препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и антиоксидантное действие сравнимое с препаратом сравнения – дибунолом. Впервые проведено изучение влияния соединения РУ-1144 на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз в тестах *in vitro* и *in vivo*, изучена антитромботическая активность на различных моделях артериальных и венозного тромбозов, а также при экспериментальном некоронарогенном инфаркте миокарда.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

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

### **Методология и методы исследования.**

Для достижения поставленных задач были выбраны современные высокоинформативные методические подходы, входящие в арсенал Волгоградского государственного медицинского университета. В данном исследовании использовались кролики-самцы породы «Шиншилла», а также половозрелые беспородные самцы мышей и крыс. Изучение антитромботических свойств соединения РУ-1144 выполнено согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению антиагрегантной

и антитромботической активности лекарственных средств [Макаров В.А., 2012] и следующим методам [Сакаев М.Р., 2000; Kurz K.D., 1990; Guglielmi G., 1991; Ryu S.K., 2006; Henke P.K., 2007; Gratacap M., 2009; Yamamoto J., 2014; Mohamed A.R., 2014; Rao M.L., 2014], с использованием методов статистической обработки полученных данных.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Производные бензимидазола, представленные молекулярным остовом - экранированным фенольным заместителем - *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолов, *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов и *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолов, являются перспективным классом соединений для поиска новых высокоэффективных антиагрегантных средств.
2. Соединение РУ-1144 оказывает выраженную антиагрегантную активность в тестах исследования агрегации тромбоцитов *in vitro*, индуцированных такими агонистами, как аденозиндифосфат (АДФ), арахидоновая кислота, коллаген и фактор активации тромбоцитов (ФАТ), в тестах *in vivo* ингибирует P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов, влияя на продукты циклооксигеназного каскада, снижает уровень ТхВ<sub>2</sub> и повышает количество 6-кето-простагландина F<sub>1α</sub>.
3. Изученное вещество РУ-1144 оказывает антитромботическое действие *in vivo* на моделях артериальных тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и воздействием электрического тока, системного адреналин-коллагенового тромбоза на мышцах и на модели тромбоза нижней поллой вены крыс.

### **Внедрение результатов исследования.**

Полученные данные о способности новых соединений ингибировать процессы агрегации тромбоцитов, а также анализ влияния заместителей на уровень антиагрегантной активности в ряду производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель, используются при синтезе новых веществ в НИИ ФОХ Южного Федерального университета (г. Ростов-на-Дону). В работе научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-

промышленным производством (НЦИЛС) ВолгГМУ, кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к изучению антиагрегантной активности веществ. Результаты работы включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и фармации ИНМФО (Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования) ВолгГМУ, на кафедрах фармакологии Астраханского государственного медицинского университета, Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко и Кубанского государственного медицинского университета.

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

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

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVII, XIX, XX, XXI, XXII и XXIV Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2012, 2015 - 2019; 72, 73 - 76 открытых научно-практических конференциях молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2014 - 2018 гг.; открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, Волгоград, 2015, 2017; на конференции, посвященной Микроциркуляции и гемореологии X, XI Международной научной конференции, Ярославль, 2015; X международной (XIX Всероссийской Пироговской конференции студентов и молодых ученых), Москва, 2015; VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2016; IV

Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения», г. Пятигорск, 2016, 2017; Материалы «XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии», Екатеринбург, 2016; на Объединенном Конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 8-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии Москва, 2016; Научно-практической конференции с международным участием, посвященной ПГФА, Пермь, 2015, 2016.

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

#### **Личный вклад автора.**

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

#### **Структура и объем диссертации.**

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

# ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ СОСТОЯНИЙ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ ПОВЫШЕННЫМ ТРОМБОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ КРОВИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

## 1.1. Социальная значимость процесса тромбогенеза.

Проблема тромбообразования является распространенной социально-значимой проблемой, опасными осложнениями которой могут быть такие заболевания, как инфаркт миокарда, инфаркт мозга, сосудистые осложнения сахарного диабета, венозный тромбоэмболизм, снижение результативности хирургического лечения ишемической болезни сердца [Yusuf S., 2014; Mozaffarian D., 2016; Reed G.W., 2017].

Распространённость тромбоза значительно возросла за последние 4 десятилетия. Если данная тенденция сохранится, то к 2030 году 25,4% людей умрут от сердечно-сосудистых заболеваний и острой недостаточности мозгового кровообращения [Чазов, Е.И., 2015; Шляхто Е.В., 2019; WHO. Global health estimates summary tables: projection of deaths by cause, age and sex. 20 Leading Causes of Death, 2013].

На развитие тромбозов влияют различные факторы риска, среди которых гипергликемия, курение, сахарный диабет, артериальная гипертензия, длительная иммобилизация, ожирение, пожилой возраст и др. [Eichinger S., 2016; Leung A., 2016; Panova-Noeva M., 2019]. Также одной из основных причин возникновения сердечно-сосудистых заболеваний является атеросклеротическое поражение сосудов [Lu H., 2015; Poredoš P., 2017; Melnikov I.S., 2019]. Атеросклероз поражает коронарные, церебральные и периферические артерии, приводя к патологическим изменениям в коронарной артерии, ишемическому инсульту и другим заболеваниям.

В некоторых случаях артериальный тромбоз может возникать из-за анатомического источника, наиболее часто встречающегося, из которых - внутрисердечный тромб, тромб предсердного отростка, открытое овальное

отверстие с парадоксальной эмболией, а также клапанный тромбоз [Spronk Н.М.Н., 2018].

Также еще одним общепризнанным значимым фактором риска для развития тромбозов является тромбофилия, особенность организма, определяющая его повышенную склонность к формированию внутрисосудистых тромбов в обычных ситуациях, даже при отсутствии иных факторов риска, и чаще всего передается по наследству [Бокарев И. Н., Попова Л. В., 2014]. В настоящее время открыто множество врожденных тромбофилий и их количество продолжает расти.

Существует также ряд других врожденных и приобретенных нарушений в системе свертывания крови, способных потенцировать влияние клинических факторов риска. К ним относятся резистентность к активированному протеину С (Лейденский фактор V); антифосфолипидным антителам (волчаночный антикоагулянт и антикардиолипиновое антитело); дефицит или дисфункция антитромбина, протеина С, или кофактора гепарина II; дисфибриногенемия; сниженный уровень плазминогена или активаторов плазминогена; тромбоцитопения, вызванная гепарином; гипергомоцистеинемия; миелопролиферативные заболевания (полицитемия, первичный тромбоцитоз). У многих больных может присутствовать несколько факторов риска и от этого вероятность возникновения венозного тромбоза становится еще выше [El-Menyar A., 2017; Yang P.S., 2018].

Все вышеперечисленное сопровождается активацией тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза, что приводит к образованию тромбов [Fredman G., 2017].

## **1.2. Механизмы активации тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза.**

Известно, что в процессе образования тромбов, как в физиологических, так и в патологических условиях ведущую роль играют тромбоциты [Papanagiotou A., 2016; Ye T., 2019]. В сосудистом русле они преимущественно находятся в инактивированном состоянии, а интактный эндотелий обладает противотромботическими свойствами, ввиду способности к образованию таких

веществ, как оксид азота, простаглицлин, тканевой активатор плазминогена и ингибитор тканевого фактора. В момент образования дефекта в структуре эндотелия или при изменении напряжения сдвига происходит высвобождение основных структур - медиаторов процесса агрегации тромбоцитов, которые запускают коагуляционный и клеточный гемостаз [Scharf R.E., 2018].

Процесс сосудисто-тромбоцитарного гемостаза направлен на остановку кровотечений из сосудов мелкого калибра, который начинается спазмом сосудов с последующей активацией тромбоцитов и выделением ими вазоконстрикторов: серотонина, тромбоксанов. На следующем этапе происходит образование тромбоцитарной пробки посредством адгезии и агрегации тромбоцитов (рис.1.1) [Кутафина, Н. В., 2012].

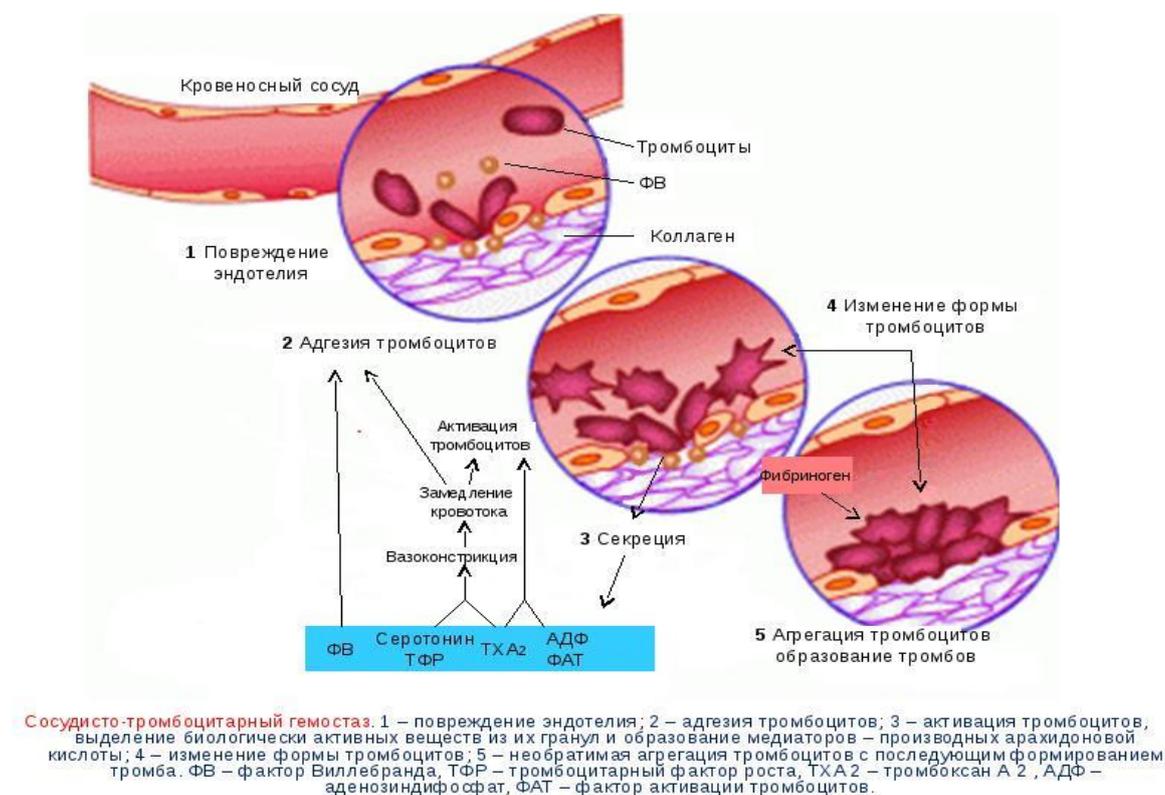


Рисунок 1.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз [Говорова Н.В., 2014].

Первая стадия агрегации тромбоцитов представлена адгезией, при которой происходит прилипание тромбоцитов к субэндотелиальному матриксу или активированному эндотелию в результате повреждения сосуда. Процесс опосредуется через рецепторы на поверхности плазматической мембраны

тромбоцитов и наличием адгезивных молекул в околоклеточном пространстве, высвобождающихся из эндотелиальных клеток в кровь и экстрацеллюлярный матрикс. Главную роль в прикреплении кровяных пластинок возле стенки сосуда играет гликопротеиновый Ib-IX-V (GPIb-IX-V) комплекс рецепторов, состоящий из 4 субъединиц: GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX и GPV [Li R., 2013]. Он является мембранным рецептором для фактора фон Виллебранда (vWF), выделяющегося из альфа-гранул тромбоцитов и эндотелиальных клеток в кровяное русло [Schmugge M., 2013]. vWF способствует адгезии тромбоцитов к коллагену, обеспечивая их прикрепление к месту повреждения сосуда [Ozaki Y., 2005]. Далее происходит накопление и закрепление тромбоцитов на повреждённой поверхности за счет присутствия различных рецепторов на плазматической мембране тромбоцитов и наличия адгезивных молекул в околоклеточном пространстве. Первыми структурами участвующими в процессе активации коллагеновых рецепторов являются GPIa/IIa (интегрин  $\alpha 2/\beta 1$ ) и GPVI. При их взаимодействии с коллагеном происходит изменение формы тромбоцита и закрепление на участке повреждения. Затем происходят многоступенчатые стадии трансмембранной передачи сигнала, приводящей к активации тирозинкиназы Syk (Spleen tyrosine kinase), запускающей ряд следующих друг за другом реакций, необходимых для активации фосфолипазы C $\gamma 2$  (PLC $\gamma 2$ ), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI $_3$ K) и малых G белков, что в итоге ведет к мобилизации ионов кальция из внутриклеточных депо, секреции гранул и агрегации тромбоцитов [Induruwa I, 2018]. Однако для данного процесса необходима связь тромбоцитов через гликопротеиновые комплексы GPIIb/IIIa (интегрин  $\alpha IIb\beta 3$ ), которые являются рецепторами для фибриногена и фактора фон Виллебранда [Scharf R.E., 2018].

Кроме приведенных выше сигнальных путей в активации тромбоцитов и последующей их агрегации участвует ряд индукторов, секретируемых из внутриклеточных депо или находящихся в крови, а механизм их действия основан на стимулировании специфических рецепторов непосредственно на поверхности тромбоцитов. При секреции из внутренних депо тромбоцитов выделяются следующие молекулы: АДФ, тромбоксан A $_2$ , серотонин, вазопрессин, фактор

активации тромбоцитов (platelet-activating factor; PAF), адреналин и др (рис. 1.2) [Gorog, D.A.,2015].

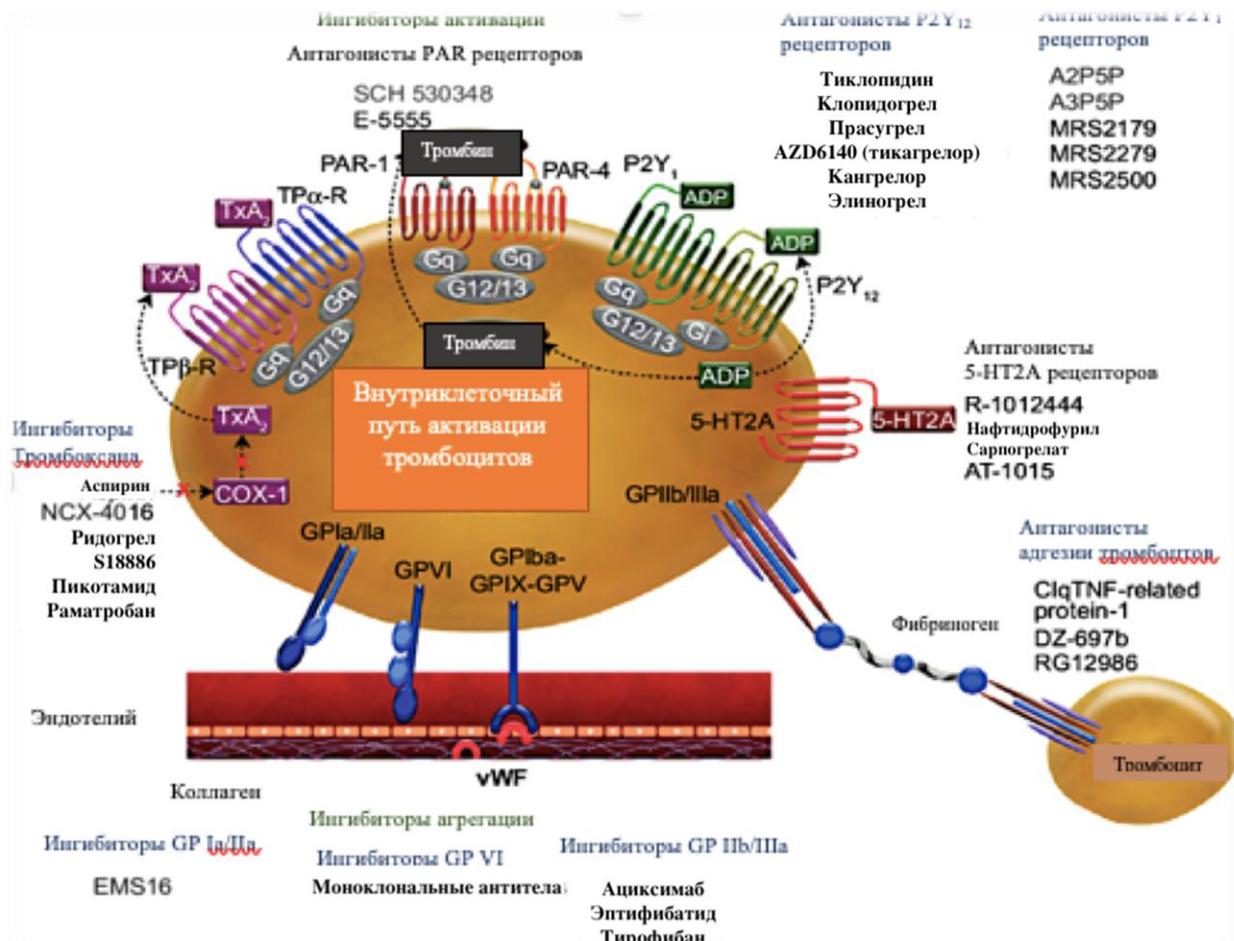


Рисунок 1.2. Основные мишени антиагрегантных препаратов [Gorog, D.A.,2015 (рисунок, дополненный переводом)].

Тромбоксан A<sub>2</sub> и серотонин воздействуют через активацию 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов [Liu M-Y., 2015], что способствует скоплению тромбоцитов в месте повреждения и вазоконстрикции. Биологическое действие тромбоксана A<sub>2</sub> осуществляется через его специфический рецептор (TP), находящийся на поверхности тромбоцитов. Тромбоксан A<sub>2</sub> является достаточно слабым индуктором агрегации тромбоцитов, а его действие ограничено коротким периодом полураспада и гидролиза с образованием тромбоксана B<sub>2</sub>.

Фактор активации тромбоцитов (PAF), индуцирует клеточную активацию путем связывания с рецептором, сопряженным с G-белком, вызывая доза-

зависимую агрегацию. Он также стимулирует секрецию из плотных и  $\alpha$ -гранул биологически активных веществ, усиливает активность GTP-азы и увеличивает внутриклеточный уровень свободного кальция. Согласно литературным данным основные процессы, связанные с PAF, не протекают через сигнальные пути, транслирующие эффекты АДФ, адреналина и коллагена, а его способность вызывать вторую волну агрегации и секрецию реализуется, главным образом, с помощью циклооксигеназного пути [Wang Z.G., 2017].

Регуляторная роль активированной протеинкиназы C заключается в снижении концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме клетки за счет фосфорилирования и последующего ингибирования активности рецептор-управляемых кальциевых каналов плазматической мембраны.

Циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) экспрессируется только молодыми тромбоцитами из родительских мегакариоцитов, а зрелые тромбоциты человека в норме выделяют только ЦОГ-1 [Ghoshal K., 2014]. ЦОГ необходима для катализа двух реакций: образование из арахидоновой кислоты простагландина  $G_2$  ( $PGG_2$ ) и последующее восстановление  $PGG_2$  до простагландина  $H_2$  ( $PGH_2$ ) [Knights K. M., 2010], который важен при ингибировании активности ЦОГ.  $PGH_2$  при помощи различных PG-синтаз приводит к образованию  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_2\alpha$ , простациклина ( $PGI_2$ ) и тромбоксана  $A_2$  ( $TxA_2$ ) с участием тромбоксан-синтазы. При этом простациклин является вазодилататором и ингибитором агрегации тромбоцитов, а тромбоксан  $A_2$  выполняет противоположную функцию, являясь вазоконстриктором и промотором агрегации.

В связи с тем, что  $TxA_2$  и  $PGI_2$  выполняют противоположные роли, дисбаланс в их синтезе приводит к тромботическим осложнениям.

PAR-рецепторы (Protease-Activated Receptors) являются рецепторами тромбина. Тромбин - основным активатором тромбоцитов, главным ферментом системы свертывания крови, который необходим для превращения фибриногена в фибрин, а также действует на тромбоциты за счет необратимого связывания с мембранными PAR-рецепторами [Shaturny V., 2014]. Образование тромбина

инициируется взаимодействием тканевого фактора с факторами свертывания в плазме после нарушения сосудистого эндотелия.

На поверхности тромбоцитов присутствуют 2 типа PAR-рецепторов: PAR1 и PAR4 [Nieman M.T., 2016]. Исследования с использованием антагонистов этих рецепторов показали, что именно PAR1 обладает большим сродством к тромбину, чем PAR4, который активируется низкими концентрациями тромбина и вносит свой вклад в активацию тромбоцитов в основном в условиях ингибирования или десенситизации PAR1 [Shaturny V., 2014]. PAR1 способствует резкому увеличению концентрации внутриклеточного кальция и очень быстро десенситизируется при больших концентрациях тромбина, в то время как PAR4 характеризуется более продолжительным ответом и может поддерживать этот эффект при больших концентрациях тромбина [De Candia E., 2012].

Молекулы АДФ и АТФ, секретлируемые из плотных гранул активированных тромбоцитов, являются лигандами P2 пуринорецепторов. Находящиеся на поверхности тромбоцитов пуринорецепторы типа P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub> являются G-белок-сопряженными рецепторами (G<sub>p</sub>(q)- и G<sub>i</sub>-белками). Один из них (P2Y<sub>1</sub>) связан с активацией фосфолипазы C, а другой (P2Y<sub>12</sub>) – с ингибированием аденилатциклазы. P2X<sub>1</sub>, активируется при помощи АТФ и представляет собой Ca<sup>2+</sup>-канал [von Kügelgen I., 2016].

P2Y<sub>1</sub>-рецепторы связаны с мобилизацией кальция через Rho/Rho-киназы и сопряжены с G<sub>12/13</sub>-белками. Также, G<sub>i</sub> и G<sub>q</sub> белки активируют SFK (Src family kinase) Lyn-киназу, которая запускает каскад биохимических реакций, что ведет к секреции α-гранул и синтезу TxA<sub>2</sub>. P2Y<sub>1</sub> рецепторы играют ключевую роль в изменении формы тромбоцитов.

P2Y<sub>12</sub> рецептор тромбоцитов специфичен для АДФ, ингибирует аденилатциклазу при взаимодействии с G<sub>i</sub>-белками, приводя к снижению уровня сАМР в клетке, что имеет важное значение для полного ответа на АДФ-индуцированную агрегацию и стабилизацию агрегатов [von Kügelgen I., 2016], а также усилению ответа тромбоцитов на другие агрегирующие агенты, в том числе тромбоксан A<sub>2</sub>, тромбин и коллаген. При помощи АДФ происходит стимуляция

P2Y<sub>12</sub> рецепторов, которая важна для активации гликопротеина Пб-Ша и интегрина  $\alpha$ Пб $\beta$ 3. P2Y<sub>12</sub>-зависимая активация тромбоцитов имеет важное значение в процессе адгезии тромбоцитов к фибриногену, а также в коллаген-индуцированном формировании тромба [Gao Y., 2019].

Третьим P<sub>2</sub> пуринорецептором на поверхности тромбоцитов является P2X<sub>1</sub>. P2X<sub>1</sub>-зависимая активация  $\alpha$ Пб $\beta$ 3, предположительно, осуществляется за счет Ca<sup>2+</sup> и диацилглицерол-управляемого гуанин-нуклеотидного фактора обмена I (CalDAG-GEFI), являющегося внутриклеточной сигнальной молекулой, участвующей в активации малых GTP-аз семейства Ras. При активации P2X<sub>1</sub> рецептора тромбоцитов, происходит стимуляция быстрого и обратимого изменения формы тромбоцита [Bergmeier W., 2009].

Ионы кальция также являются главным внеклеточным фактором. Так, при резком увеличении концентрации кальция в цитоплазме, происходит быстрая агрегация и реакция высвобождения, а при его снижении - дезагрегация. Кальций, необходимый для таких ответов, как изменение формы, активации и секреции гранул тромбоцитов может быть внеклеточным, а также секретироваться из внутриклеточных депо, представленных рецептор-опосредованными ионными каналами и обратными Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменниками [Watanabe Y., 2019].

### **1.3. Методы фармакологической коррекции процессов агрегации тромбоцитов.**

Антиагреганты служат основными терапевтическими средствами для лечения острых тромбоокклюзивных ишемических явлений и предотвращения вторичных осложнений сосудистых заболеваний.

На данный момент в клинической практике используются препараты с высоким уровнем доказательности: ингибиторы ЦОГ (циклооксигеназы), блокаторы рецепторов АДФ и блокаторы гликопротеиновых- GP Пб/Ша рецепторов [Бокерия Л.А., 2014; Попова Л.В., 2014; Patrono C., 2017].

Группа ингибиторов циклооксигеназы основным представителем которой является аспирин (ацетилсалициловая кислота, АСК), широко используемый антиагрегант, назначаемый для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний,

с уровнем доказательности: класс I, уровень A. На протяжении последних 50 лет и по сей день он остаётся основой антиагрегантной терапии [Dobesh P.P., 2016]. Механизм действия аспирина направлен на необратимое и неизбирательное блокирование ЦОГ, ключевого фермента синтеза простагландинов и  $\text{TxA}_2$ , при котором ацетилируется остаток серина в области каталитического участка ЦОГ [Caуla G., 2019]. ЦОГ-1 тромбоцитов выполняет важную функцию при синтезе тромбосана  $\text{A}_2$  (через его предшественник простагландин  $\text{H}_2$ ), именно поэтому ингибирование ЦОГ-1 будет вызывать соответствующие терапевтические и побочные эффекты. Эндотелий, в свою очередь, синтезирует ПГ  $\text{I}_2$  - который менее чувствителен к аспирину. Низкие дозы аспирина селективно ингибируют ЦОГ-1, оказывая антиагрегантный эффект, в то время как высокие дозы ингибируют ЦОГ-1 и ЦОГ-2, оказывая противовоспалительный и анальгетический эффекты. Поэтому малые дозы аспирина имеют ограниченное влияние на ПГ  $\text{I}_2$ -зависимые функции, такие как регуляция АД, функции почек и взаимодействие с диуретиками и ИАПФ [Patrignani P., 2015].

Трифлузал является ингибитором ЦОГ-1 и ФДЭ. Препарат показал аналогичную аспирину эффективность в предотвращении сосудистых событий у пациентов с инфарктом миокарда и инсультом (класс доказательности I, уровень A) [Milionis H., 2016].

Другая группа, применяемая в клинической практике - блокаторы рецепторов АДФ, действующие через  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$ -рецепторы, активация которых приводит к ингибированию аденилатциклазы и снижению уровня цАМФ в тромбоцитах. В результате данной реакции активируются  $\text{Pb}/\text{Pшa}$  рецепторы, повышается синтез тромбосана, что пролонгирует агрегацию тромбоцитов [Berwanger O., 2018].

Группу препаратов, блокирующих  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$ -рецепторы, дополнительно подразделяют на 2 подгруппы по химической структуре, где выделяют тиенопиридины, блокирующие рецепторы необратимо (клопидогрел, тиклопидин) с уровнем доказательности: класс I, уровень A и производные других

химических групп, влияющие на данный подтип рецепторов обратимо (кангрелор, тикагрелор) с уровнем доказательности: класс I, уровень B [Berger J.S., 2018].

Самым первым представителем данной группы является тиклопидин, который образует под влиянием изофермента CYP3A4 четыре метаболита [Pultar J., 2019]. Клопидогрел также является производным тиенопиридина, которое в 6 раз сильнее тиклопидина подавляет агрегацию тромбоцитов, а также селективно и необратимо блокирует P2Y<sub>12</sub>-рецепторы. При применении данного препарата происходит уменьшение АДФ-зависимой экспрессии GP IIb/IIIa рецепторов, что препятствует их связыванию с фибриногеном [von Kügelgen I., 2019].

Празугрел, представитель группы тиенопиридинов, отличающийся более высокой эффективностью по сравнению с клопидогрелом. Активные метаболиты данного препарата образуются под влиянием эстераз кишечника и плазмы крови и цитохромов печени [Spartalis M., 2017]. В отличие от тиклопидина и клопидогрела, тикагрелор является циклопентил-триазоло-пиримидином и прямым обратимым антагонистом P2Y<sub>12</sub>-рецепторов. Как и празугрел, тикагрелор действует быстро и считается более сильным ингибитором агрегации тромбоцитов, чем клопидогрел, а также вызывает меньший риск кровотечений. Тикагрелор не является пролекарством и ингибирует активность тромбоцитов без изменения исходной молекулы. Препарат обратимо связывает неконкурентный сайт P2Y<sub>12</sub>-рецептора, таким образом, являясь аллостерическим регулятором АДФ-зависимой активации тромбоцитов. Кроме этого, тикагрелор ингибирует обратный захват аденозина, т.е. повышает его уровень в плазме [Jneid H., 2019].

Кангрелор является аналогом АТФ, который обратимо блокирует рецепторы P2Y<sub>12</sub> тромбоцитов, для данного соединения также не требуется метаболической активации. Последний представитель данной группы элиногрел относится к производным сульфонилмочевины и является обратимым антагонистом P2Y<sub>12</sub>-рецепторов, также, как и кангрелор не требует метаболической активации, подходит для приема внутрь и внутривенного введения [Patelis N., 2018].

Группа средств, блокирующих гликопротеиновые Пб/Ша рецепторы тромбоцитов, представлена препаратами для внутривенного применения абциксимабом, тирофибаном и эпитфибатидом с уровнем доказательности: класс I, уровень A. Абциксимаб представлен макромолекулой и изготовлен на основе моноклональных химерных антител к Пб/Ша гликопротеинам мембраны тромбоцитов в комплексе с константным участком иммуноглобулина человека с7Е3. Данный препарат нарушает связывание с рецепторами активаторов адгезии и агрегации - витронектина, фибронектина, фактора фон Виллебранда и фибриногена. Тирофибан - производное тирозина непептидной природы, а эпитфибатид является синтетическим циклическим пептидом, который обратимо блокирует рецепторы Пб/Ша тромбоцитов [Verheugt F.W., 2017].

Также существуют другие группы антиагрегантных препаратов, не имеющие доказательной базы. Так действие блокаторов PAR1 рецепторов тромбоцитов - ворапаксара и атопаксара заключается в ингибировании процесса тромбин-опосредованной активации. Ворапаксар является синтетическим 3-фенилпиридином, аналогом химбацина. Вторым представителем данной группы атопаксар, вызывает изменения в экспрессии основных поверхностных рецепторов, включая гликопротеин Пб/Ша, (PECAM)-1, виронектин и тромбоспондин [Tantry U.S., 2018].

Также в качестве антиагрегантных препаратов используются ингибиторы фосфодиэстеразы (ФДЭ). Основными представителями данной группы являются дипиридамолом и пентоксифиллин. Дипиридамолом уменьшает агрегационную активность тромбоцитов благодаря нескольким механизмам: снижает уровень ФДЭ, блокирует обратный захват аденозина (который действует на А<sub>2</sub>-рецепторы тромбоцитов и активирует аденилатциклазу) и ингибирует синтез тромбоксана А<sub>2</sub>. Ингибируя аденозиндезаминазу и фосфодиэстеразу III, димиридамолом повышает в крови содержание эндогенных антиагрегантов - аденозина и цАМФ, стимулирует выделение простаглицлина эндотелиальными клетками, тормозит захват АТФ эндотелием, что ведёт к увеличению его содержания на границе между тромбоцитами и эндотелием. Дипиридамолом в большей степени подавляет

адгезию тромбоцитов, чем их агрегацию, удлиняет продолжительность циркуляции тромбоцитов [Belova L.A., 2017].

Наиболее важный эффект пентоксифиллина - улучшение деформируемости эритроцитов. Под влиянием пентоксифиллина в эритроцитах активируется гликолиз, что увеличивает содержание факторов эластичности. Такими факторами являются дифосфоглицерат (снижает сродство компонента цитоскелета эритроцитов спектрина к сократительному белку актину) и АТФ (связывает гемоглобин). Пентоксифиллин, предотвращая потерю эритроцитами ионов калия, придаёт им устойчивость к гемолизу [Heifetz-Li J.J., 2019].

Цилостазол является селективным ингибитором ФДЭЗ. Данный препарат способствует увеличению уровня цАМФ, повышает активность протеинкиназы А (ПКА), которая опосредованно ингибирует агрегацию тромбоцитов [Noma K., 2018].

В последние годы было разработано большое количество антагонистов рецепторов к тромбоксану: GR 32191, BMS-180291 (ифетробан), и др. блокаторов TP-рецепторов, дополнительно ингибирующих  $TxA_2$ -синтазу (пикотамид, ридогрел и EV-077). Но, несмотря на хорошие результаты в исследованиях начальных фаз, данная группа препаратов оказалась недостаточно эффективной при их исследовании на стадии клинических испытаний. Антитромботическая, кардиопротективная и антиатерогенная активность этих веществ, продемонстрированная в эксперименте, не была подтверждена в клинических исследованиях. Так, ни один из ингибиторов TP-рецепторов не оказался эффективней аспирина в первичной и вторичной профилактике заболеваний сердечно-сосудистой системы [Михайлова И. Е., 2014; Depta J. P., 2015; Capodanno D., 2016].

До недавнего времени лечение атеротромбоза фокусировалось на использовании монотерапии или двойной антиагрегантной терапии (класс I, уровень B). Для вторичной профилактики текущие рекомендации используют низкие дозы аспирина или применение клопидогрела, в случае непереносимости аспирина или резистентности к нему. Двойная антитромбоцитарная терапия,

состоящая из комбинации аспирина и антагонистов P2Y<sub>12</sub>, преимущественно рекомендуется для пациентов с острым коронарным синдромом [Yeо К.К., 2018]. Также используется сочетание ацетилсалициловой кислоты с дипиридамолом, с целью замедленного высвобождения для лечения острого нарушения мозгового кровообращения (уровень доказательности класс I, уровень A). Согласно многочисленным исследованиям была выявлена бесспорная польза при применении антиагрегантных препаратов всех вышеперечисленных групп, с целью профилактики сердечно-сосудистых заболеваний [Florescu С., 2019]. По данным метаанализа более 287 исследований, включивших более 200 000 пациентов с высоким риском развития сосудистых осложнений, который был произведен Antithrombotic Trialists Collaboration, антиагреганты приводят к снижению относительного риска инфаркта миокарда на 23%, а всех сердечно-сосудистых заболеваний на 18% [Poredos P., 2015].

Тем не менее, несмотря на применение монотерапии или двойной антитромбоцитарной терапии, сохраняется риск серьезных побочных эффектов, связанных с применением данной терапии, основными из которых являются повышенный риск возникновения кровотечений, гастропатии, тромбоцитопении, развитие резистентности [Guthrie R., 2011; Bala M.M., 2017; Cayla G., 2019; Paciaroni M., 2019].

Таким образом, антиагрегантные средства являются важными препаратами для лечения и профилактики тромбообразования, однако оказываются не всегда эффективными и имеют повышенный риск возникновения побочных эффектов в виде кровотечений [Veron-Esquivel D., 2018]. Неэффективность антиагрегантных препаратов объясняется тем, что отдельные средства оказывают влияние только на одну мишень активации тромбоцитарного звена, тогда, как другие мишени остаются не заблокированными. Поэтому для лечения тромботических состояний и используется двойная, а иногда даже тройная антиагрегантная терапия. Следовательно, необходимо разрабатывать новые препараты, влияющие на различные пути патогенеза агрегации тромбоцитов. Одним из таких путей

тромбообразования, помимо тромбоцитарного звена гемостаза является активация перекисного окисления липидов.

#### **1.4. Обоснование роли перекисного окисления липидов в тромбообразовании.**

Окислительный стресс, примером которого является перепроизводство активных форм кислорода (АФК) и окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), играет ключевую роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с атеросклерозом. Дисбаланс между образованием радикалов (образование активных форм кислорода, а также азота) и системами поглощения радикалов (система антирадикальной защиты) является основной причиной окислительного стресса [Manasa K., 2016].

Известно наличие у антиоксидантных средств способности ингибировать процессы перекисного окисления липидов, что важно для стабилизации структуры и функций мембран, что необходимо для обеспечения процесса гомеостаза [Sies H., 2015; Kattoor A.J. et al., 2017].

Активные формы кислорода участвуют в качестве вторичных мессенджеров в процессах передачи сигналов с помощью МАРК, малых GTP-связывающих белков, семейства тирозинкиназ Src и цитокинов, которые активируют ядерные факторы транскрипции, связанные со стрессом. Таким образом, уменьшается проявление гипоксии и реоксигенации. Данные процессы играют немаловажную роль в процессе ишемии-реперфузионного повреждения, которое обычно возникает у пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST [Strutyns'kyi R.B., 2013].

Также известно, что в настоящее время атеросклероз считается хроническим воспалительным заболеванием. Окислительный стресс, вызванный образованием избыточного количества активных форм кислорода, является окончательным механизмом при атеросклерозе. Активные формы кислорода представляют собой группу небольших реактивных молекул, которые играют критическую роль в регуляции различных функций клеток и биологических процессов [Berger M., et al., 2019]. При инициации оксидативного стресса

происходит нарушение метаболизма при патологических состояниях, поэтому при фармакологической коррекции основной упор идет на ингибирование активных форм кислорода [Malekmohammad K., 2019].

Во многом, из-за того, что АФК и продукция окисленных ЛПНП являются основными причинами атеросклеротического прогрессирования, использование антиоксидантов вполне может представлять собой рациональную терапевтическую стратегию для предотвращения развития этого состояния [Спасов А. А., 2013; Kosolapov V.A., 2019].

В последние годы идея о существенной роли перекисного окисления липидов при патогенезе повышения тромбогенного потенциала крови является высоко актуальной [Fuentes E., 2019]. Механизм проагрегантного действия  $H_2O_2$  напрямую связан с генерацией АФК, активацией ПОЛ в мембранах тромбоцитов и образованием гидропероксидов из полиненасыщенных жирных кислот, что в свою очередь, способствует повышению тромбогенного потенциала крови. Все эти нарушения гемостаза способствуют прогрессированию атеросклероза и увеличивают риск тромбоза [Кучерявенко А.Ф., 2016].

Окислительный стресс способствует атерогенной модификации ЛПНП и отложению липидов на поверхности сосудов, изъязвлениям и разрывам атеросклеротической бляшки. Эти факты служат теоретической основой для использования антиоксидантов в качестве патогенетической терапии, что открывает новые подходы к коррекции тромбогенного потенциала крови.

### **1.5. Бензимидазолы как перспективный класс для поиска новых лекарственных средств.**

Производные бензимидазола находят широкое применение с 70-х годов XX века и привлекают большое внимание компаний и организаций, занимающихся созданием новых лекарственных препаратов (рис. 1.3). Бензимидазольный скаффолд может быть отнесен к разряду привилегированных скаффолдов, так как производные бензимидазола проявляют весьма широкий спектр биологической активности - противовирусную, противоглистную, психотропную, противоопухолевую, анальгетическую, антигипертензивную,

местноанестезирующую, антиагрегантную и другие эффекты [DarwishM., 2015; Wu L.T., 2016; KhokharM.A., 2016; Borem L.M.A., 2018; KuzinM., 2018].

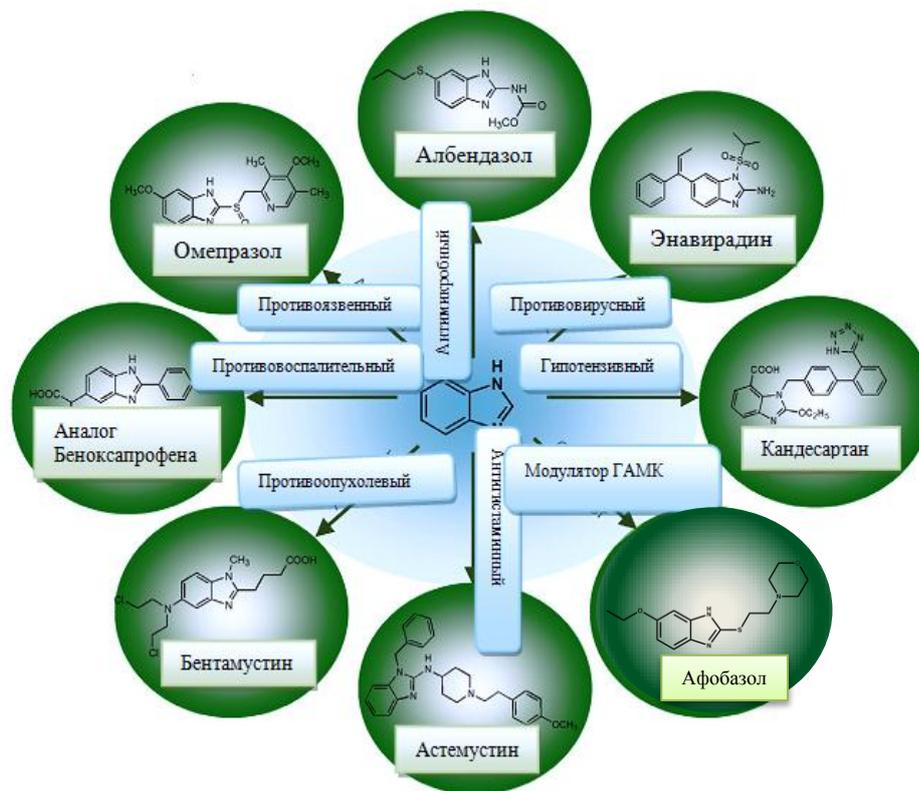


Рис.1.3. Ядро бензимидазола в некоторых известных лекарственных препаратах различного типа действия.

Согласно литературным данным, эти молекулы способны подавлять и процессы агрегации тромбоцитов, оказывают влияние на самые различные патогенетические звенья данного процесса [Yen T.L., 2016]. Кроме того, у ряда фармакологических препаратов: дибазола, нокодазола, одермедаглизола, астемизола, созданных на основе бензимидазола - обнаружено ингибирующее влияние на агрегацию тромбоцитов [Спасов А.А., 2013; Кучерявенко А.Ф., 2016; Sathler P.C., 2014]. Антиагрегантная активность дазоксибена, мидазогрела и ридогрела, содержащих в своей структуре имидазольное кольцо, связана со способностью снижать активность тромбоксансинтетазы тромбоцитов, уменьшая, таким образом, функциональную активность красных кровяных телец [Кио Н.Л., 2010]. Производное бензимидазола транквилизирующее средство афобазол проявляет церебропротекторные свойства [Кадников И. А., 2015]. Кроме того, у

некоторых производных бензимидазола обнаружена антиоксидантная активность [Косолапов В.А., 2013, 2018, 2019; Neochoritis C.G., 2011], которая приводит к нормализации тромбогенного потенциала крови.

За длительный период исследовательской работы на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета среди производных бензимидазола были выявлены соединения с различными видами биологической активности, в том числе вещества, ингибирующие процессы агрегации тромбоцитов [Кучерявенко А.Ф., 2016]. Кроме того, у соединений, имеющих в своей структуре, экранированный фенольный заместитель был выявлен и изучен вид активности, косвенно свидетельствующий о присутствии интересующих нас механизмов действия, а именно антиоксидантный вид активности [Алексеева А.А., 2007; Berrani A., 2018]. Есть основания предполагать, что этот вид активности может реализовываться, в том числе благодаря антиагрегантным механизмам действия веществ.

Все это послужило основанием для изучения антитромбогенной активности соединений, в молекулярном остове которых находится экранированный фенольный заместитель.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

### 2.1. Материалы исследований.

Изучено 26 производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель. Из них 5 относятся к производным пиримидобензимидазола, 15 - к производным *1H*-бензимидазола, 2 - к производным триазинобензимидазола, 1 - к производным 2,3-тиазинобензимидазола, 1 - к производным имидазоизохинолина и 2 - к производным *N*<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазобензимидазола.

Данные соединения синтезированы на кафедре химии природных и высокомолекулярных соединений химического факультета Южного Федерального университета к.х.н. О.Н. Жуковской.<sup>1</sup> Структурные формулы изученных соединений представлены в таблице 2.1.

Для выполнения исследований использовались следующие *реактивы*: динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Sigma», США), арахидоновая кислота («Sigma», США), адреналин («Sigma», США), U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) («Sigma», США), тромбин («Sigma», США), коллаген («Sigma», США), ФАТ (фактор активации тромбоцитов, «Sigma», США), PAR1 (TFLLP-NH<sub>2</sub> Trifluoroacetate salt - агонист PAR1, «Sigma», США), TRAP (активатор рецепторов тромбина, «Sigma», США) и ристоцетин («Sigma», США), хлоралгидрат (Органика, Россия), хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия), физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия), цитрат натрия (Реахим, Россия), натрия хлорид (Реахим, Россия), калия хлорид (Реахим, Россия), магния хлорид (Реахим, Россия), натрия гидрокарбонат (Реахим, Россия), глюкоза (Реахим, Россия), натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) («ICN», США), трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид (х.ч.), кальция хлорид (ч.д.а.) производства «Мосреактив» (Россия), Hepes free acid («Sigma», США), BSA («Sigma», США), формалин (Acros organics, США), ЭГТА (этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир тетрауксусной кислоты)) («Sigma», США), калия хлорид

---

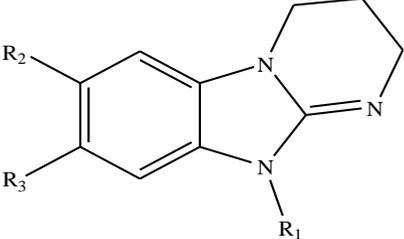
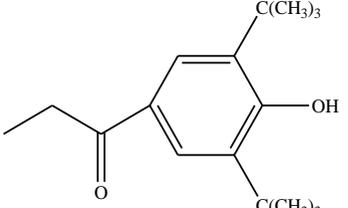
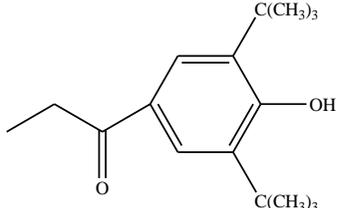
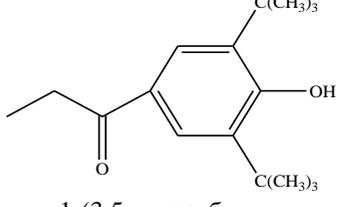
<sup>1</sup>Выражаем искреннюю благодарность к.х.н., О.Н. Жуковской за любезно предоставленные субстанции веществ.

(х.ч.), гидрокарбонат натрия (х.ч.), магния хлорид (х.ч.), изопротеренол (Sigma, США), TxB<sub>2</sub> ELISA kit (ENZO kit, США), 6-keto-PGF1 $\alpha$  ELISA kit (ENZO kit, США), флуоресцентный зонд Fura-2/AM (Sigma, США).

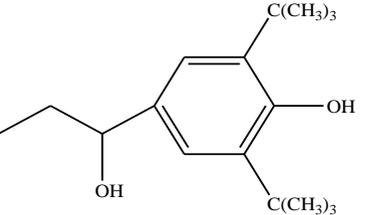
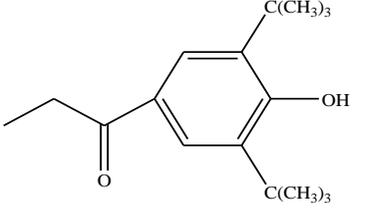
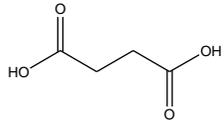
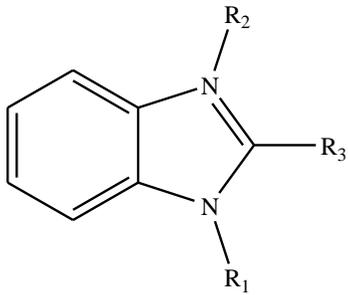
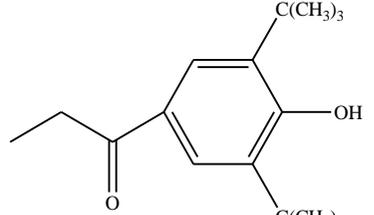
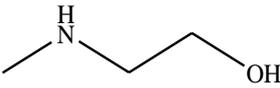
В качестве веществ и препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту («Sigma», США), клопидогрел (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия), дибунол (Merck, Германия), верапамил (ЗАО «Северная звезда», Россия), вещество – MRS-2179 («Sigma», США). В качестве растворителя веществ использовали дистиллированную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

*Приборы*, использованные в данных исследованиях: аквадистиллятор ДЭ-4-2, №24994 (ЗАО Электромедоборудование», Россия, Саранск), облучатель рециркулятор медицинский («Armed», Китай), агрегометр Viola220 LA (ООО НФП "Биола", Россия), кюветы стеклянные для агрегометра Биола (ООО НФП "Биола", Россия), магнитные мешалки (ООО НФП "Биола", Россия), центрифуга MultiCentrifuge Elmi CM 6MT (Elmi, Латвия), ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург), лазерный анализатор «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия), многофункциональный микропланшетный ридер Infinite 200 PRO (Tecan, Австрия) электронные весы (Ohaus corporation, США), дозаторы автоматические переменного объема (Gilson, Франция), металлический гастральный зонд (ОАО «МИЗ-Ворсма», Россия), пластмассовый гастральный зонд (Instech Laboratories, Inc. USA), стерильные одноразовые пластиковые шприцы объемом 1,0 мл, 5,0 мл (SFM Hospital Products GmbH, GERMANY), тепловая баня с ячейками для подогрева до 37°C (SOLAR, Беларусь), электронный термометр (AND, Япония), актометр (UgoBasile, Италия), установка открытое поле (ООО "НПК Открытая Наука", Россия), секундомер СОП пр-2б (АГАТ, Россия), диагностический фонарик Little Doctor (LittleDoctor, Сингапур), пинцет хирургический П-99 (МИЗ-Ворсма, Россия), корнцанг прямой (МИЗ им. В.И. Ленина, Россия), Р.А.М. система (UgoBasile, Италия), микроскоп AxioCamplus (CarlZeiss, Германия), цифровая камера AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия), термошейкер для планшетов, PST-60HL (Biosan, Латвия), набор инструментов для вскрытия.

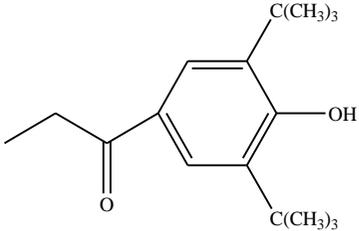
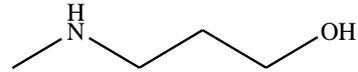
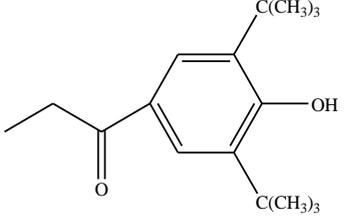
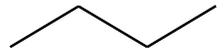
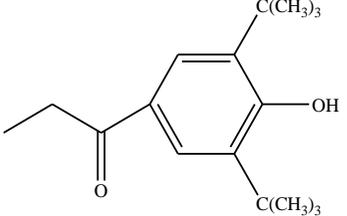
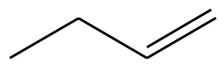
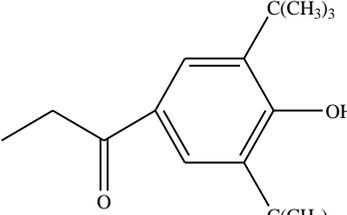
Таблица 2.1. Химическое строение производных бензимидазола

№ п/п	Соединение	Заместитель			Солевой остаток	Молек. вес	
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			
		 <p>Пиримидобензимидазолы</p>					
1.	РУ-871	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	Н	Н	НВr	419,56	
2.	РУ-873	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	Н	Н	НCl	419,56	
3.	РУ-903	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	СН <sub>3</sub> МЕТИЛ	СН <sub>3</sub> МЕТИЛ	НВr	447,61	

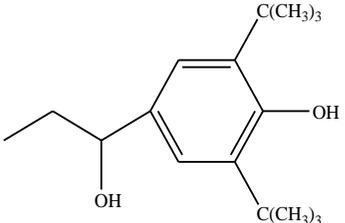
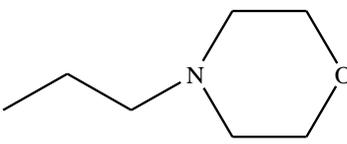
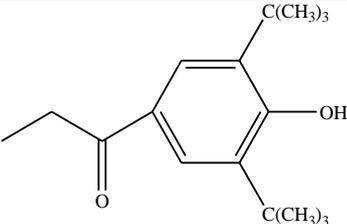
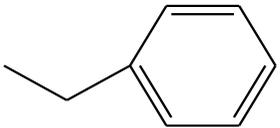
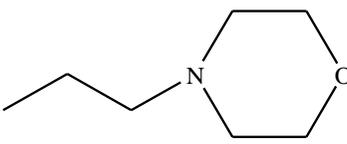
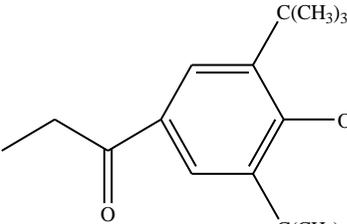
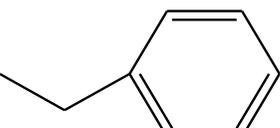
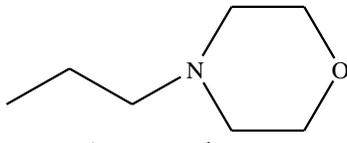
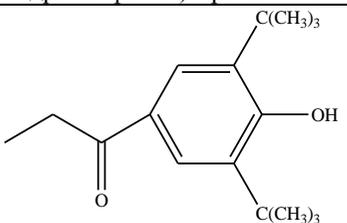
Продолжение таблицы 2.1.

4.	РУ-1144	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил</p>	Н	Н	НCl	458,14
5.	РУ-1249	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	Н	Н	 <p>Янтарная кислота</p>	537,28
 <p>1H-бензимидазолы</p>						
6.	РУ-1250	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	-	 <p>2-аминоэтанол</p>	HBr	503,18

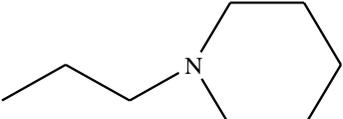
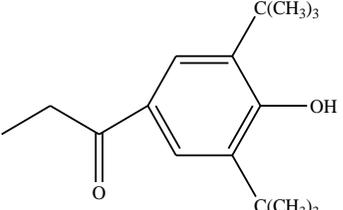
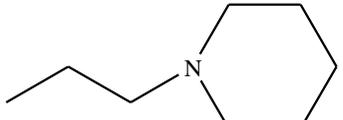
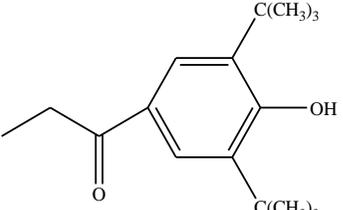
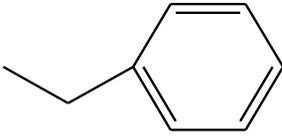
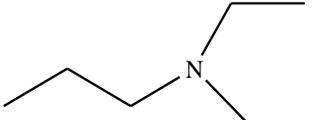
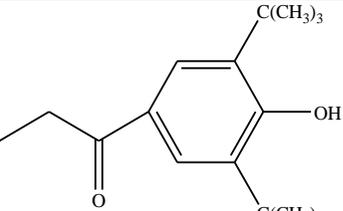
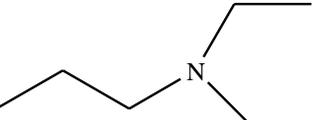
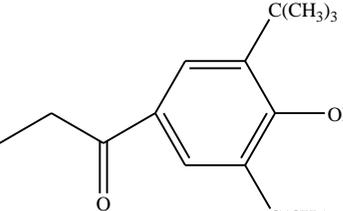
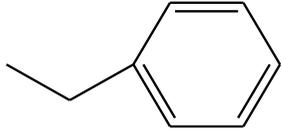
Продолжение таблицы 2.1.

7.	РУ-1251	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	-	 <p>3-аминопропанол</p>	HBr	517,19
8.	РУ-1260	<p>CH<sub>3</sub> метил</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	NH <sub>2</sub> амин	HBr	474,44
9.	РУ-1261	 <p>пропил</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	NH <sub>2</sub> амин	HBr	502,49
10.	РУ-1263	 <p>пропен-1</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	NH <sub>2</sub> амин	HBr	500,48

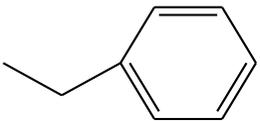
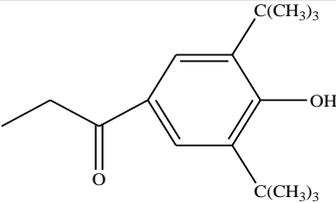
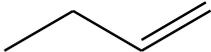
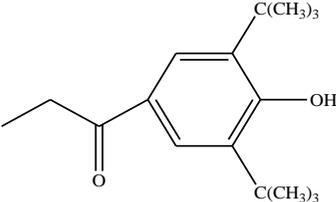
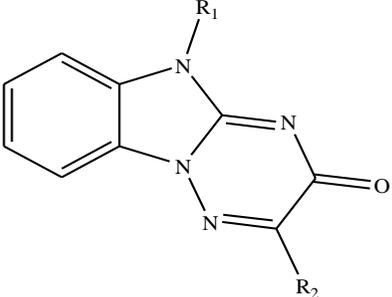
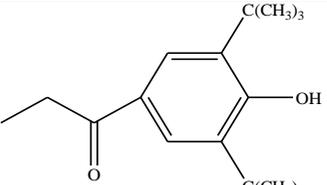
Продолжение таблицы 2.1.

11.	РУ-1265	$\text{CH}_3$ метил	$\text{NH}_2$ амин	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил</p>	HBr	476,46
12.	РУП-2	 <p>4-этилморфолин</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	 <p>этилбензен</p>	HBr	568,769
13.	РУП-2Б	 <p>4-этилморфолин</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	 <p>этилбензен</p>	2HBr	649,769
14.	РУП-3Б	 <p>4-этилморфолин</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	$\text{CH}_3$ метил	2HBr	492,673

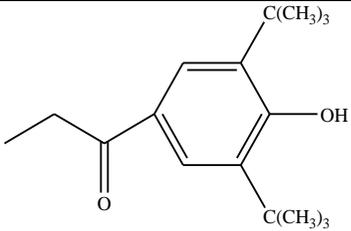
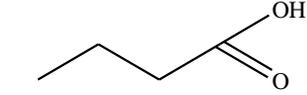
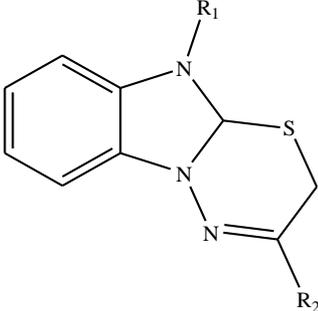
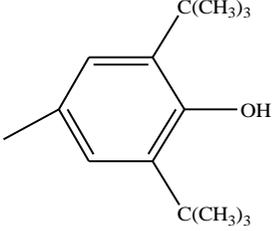
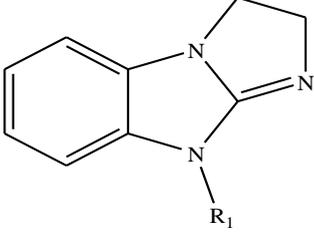
Продолжение таблицы 2.1.

15.	РУП-4Б	 <p>N-этилпиперидин</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	$\text{CH}_3$ метил	2HBr	490,7
16.	РУП-5Б	 <p>N-этилпиперидин</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	 <p>этилбензен</p>	2HBr	566,796
17.	РУП-6Б	 <p>N,N-диэтиламиноэтил</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	$\text{CH}_3$ метил	2HBr	478,689
18.	РУП-7Б	 <p>N,N-диэтиламиноэтил</p>	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	 <p>этилбензен</p>	2HBr	554,785

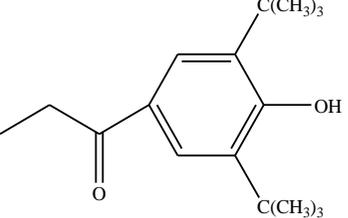
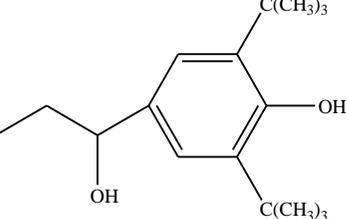
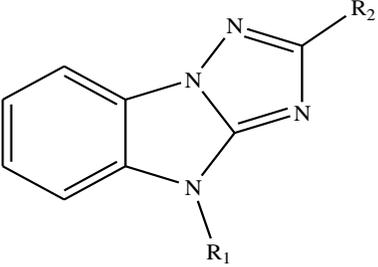
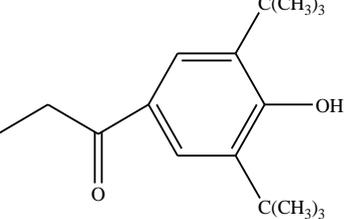
Продолжение таблицы 2.1.

19.	РУЧ-2	 этилбензен	 1-(3,5-дитретбутил-4- гидроксифенил)-пропан-1-он	-	HBr	536,6
20.	РУЧ-6	 пропен-1	 1-(3,5-дитретбутил-4- гидроксифенил)-пропан-1-он	-	HBr	486,6
		 Триазинобензимидазолы				
21.	РУС-190	 1-(3,5-дитретбутил- 4-гидроксифенил)-пропан-1-он	$\text{CH}_3$ метил	-		446,54

Продолжение таблицы 2.1.

22.	РУС-191	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	 <p>остаток пропановой кислоты</p>	-	504,58
 <p>2,3-тиазинобензимидазолы</p>					
23.	РУС-193	<p>CH<sub>3</sub> метил</p>	 <p>2,6-дитретбутил-1-гидроксифенил</p>	-	408,58
 <p>N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы</p>					

Окончание таблицы 2.1.

24.	PY-887	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	-	-	HBr	485,17
25.	PY-1180	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил</p>	-	-	HCl	444,02
 <p>триазолобензимидазолы</p>						
26.	PYC-198	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	CH <sub>3</sub> метил	-	-	418,53

Все процедуры проведены согласно утвержденному плану доклинических исследований. Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под ред. Миронова А.Н., 2012 г.), статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в редакции Федерального закона от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ (ред. от 13.07.2015 г.) «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» и Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 и Приказ МЗ РФ № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» от 1 апреля 2016 года).

Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Исследования одобрены Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)) протокол №2083 - 2016 от 18.11.2016 г.

Эксперименты были выполнены на 24 кроликах породы «Шиншилла» весом 3-4 кг, 350 белых нелинейных крысах обоего пола массой 250-350 г. и 215 белых нелинейных мышах обоего пола массой 20-32 г. Изучение влияния веществ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистами PAR1 и TRAP, проводили на крови доноров (договор № 7 от 3 марта 2017 г. с ГБУЗ "Волгоградский областной центр крови").

Все животные подвергались карантину в течение 14 дней (крысы) и 21 дня (кролики) в условиях отдельных боксов вивария кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. В течение карантина, не менее чем 2 раза (1 и 14 день у крыс) и не менее 3 раз (1,14 и 21 день у

кроликов), проводилось измерение массы тела животных. Ежедневно проводили контроль клинического состояния путем визуального осмотра в группах. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями были исключены из экспериментальных групп.

Животные были распределены по экспериментальным группам рандомизированно, при использовании в качестве критерия массу тела, с индивидуальным значением массы, не отклоняющимся от среднего значения более чем на  $\pm 10\%$ .

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» на специальном гигиеническом наполнителе древесном (ООО «Производственный комплекс «ГлавРезерв»). Температурный режим помещения вивария постоянно поддерживался от +18 до +22 С. Использовалось совмещенное (естественное и люминисцентное) освещение вивария. В помещении вивария проводилась бактерицидная обработка стационарным настенным облучателем рециркулятором (Armed, Китай) дважды в день (утром и вечером). Кролики содержались в стандартных лабораторных клетках для крупных грызунов. Крысы и мыши содержались в лабораторных клетках для мелких грызунов. В состав корма входили: комбикорм полнорационный для кроликов (ООО «ТПК Альянс», Россия; состав: ячмень, пшеница, кукуруза, жмых подсолнечный, соевый шрот, рыбная мука, мясокостная мука, ракушечная мука, травяная мука, премикс) и кормовая смесь для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) (ООО «ТПК Альянс», Россия; состав: отруби, ячмень, пшеница, жмых подсолнечный, мел кормовой, соль), зерно-продукты и сочные корма (овощи и травы). Замена воды в поилках производилась ежедневно.

Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам с водой, соответствующей ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82 и СанПиН 2.1.4.1074-01

«Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток вода из централизованных систем питьевого водоснабжения».

В течение 24 часов до начала экспериментов, все животные помещались в условия полной пищевой депривации, со свободным доступом к воде. На момент выполнения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

Каждому животному присваивалась своя метка, которая фиксировалась в протоколе. Для этого метка наносилась на хвост животного специальным маркером. На клетки крепились этикетки со следующей информацией: дата начала и конца эксперимента, название, способ введения и доза исследуемого вещества, вид, пол и количество животных, их индивидуальный номер.

Забой животных проводили с использованием хлоралгидратного наркоза, согласно правилам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012 г.] и осуществлялся своевременно, без причинения страданий, в помещении, где не содержатся другие животные.

Острую токсичность соединений изучали в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития [Миронов А.Н., 2012].

## **2.2. Методы исследований.**

***Метод исследования функциональной активности тромбоцитов *in vitro*.***

Изучение влияния соединений на функциональную активность тромбоцитов в тесте *in vitro* проводили по методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов НПФ «Биола» 220LA (Россия). Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971). Для этого венозную кровь, забранную из ушной краевой вены кролика, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин на центрифуге

MultiCentrifuge CM 6M (Elmi, Латвия).

Затем полученную богатую тромбоцитами плазму полученную по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971) путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об./мин центрифуге CM-6M (Elmi, Латвия), затем отбирали в чистую пластиковую пробирку и центрифугировали 10 мин при 1000 об./мин для осаждения оставшихся эритроцитов крови, а очищенную от эритроцитов плазму перемещали в чистую пробирку. Плазму центрифугировали 20 мин при 3000 об./мин для осаждения тромбоцитов, надосадочный слой удаляли и добавляли отмывочный буферный раствор до исходного объема, при этом осадок ресуспендировали три раза подряд. После последней отмывки надосадочный слой удаляли и добавляли финальный буферный раствор до исходного объема, осадок рперемешивали.

При проведении исследования использовался постоянный объем суспензии отмывтых тромбоцитов в количестве 300 мкл, который отбирали от полученного образца, при последующем добавлении индуктора агрегации тромбоцитов.

Данный метод основан на регистрации степени изменений светопропускания PRP или суспензии отмывтых тромбоцитов, при добавлении к последней веществ, индуцирующих агрегацию (в условиях постоянного перемешивания), а также на анализе флюктуаций светопропускания образца суспензии, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале прибора. Необходимым условием возникновения агрегации является механическое перемешивание плазмы при 800 об/мин, которое проводится с помощью магнитной мешалки, прилагаемой к агрегометру. Перед началом исследования выполнялся подсчет тромбоцитов на агрегометре в течение 2 минут при добавлении к образцу с плазмой богатой тромбоцитами стандартного раствора ЗА. Каждая проба содержала 280-300 тыс./мкл тромбоцитов.

Для получения контроля агрегации тромбоцитов в стеклянную кювету агрегометра последовательно вносили 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы и 10 мкл индуктора агрегации тромбоцитов аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Sigma» США), в конечной концентрации 5 мкМ. При изучении

антиагрегантной активности соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмой добавляли 10 мкл раствора исследуемого соединения в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М. Пробы инкубировали в термостатируемых ячейках агрегометра при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут. После включения записи агрегатограммы, на 10 секунде регистрации процесса, в кювету добавляли индуктор агрегации. Все исследуемые соединения растворялись в дистиллированной воде. В качестве препарата сравнения использовали известное антиагрегантное средство ацетилсалициловую кислоту с высоким уровнем доказательности. Ацетилсалициловая кислота растворялась в 30 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) с дальнейшим добавлением дистиллированной воды до необходимо объема.

В процессе регистрации агрегации тромбоцитов в течение 5 минут получали кривые, которые отражали падение оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы. Степень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Расчёт ингибирующего влияния изучаемых соединений на агрегацию тромбоцитов (ИНАТ) проводили по формуле:  $\text{ИНАТ} = 100 - (B/A) \times 100\%$ ; где:

А-степень агрегации тромбоцитов крови кроликов без изучаемых соединений,

В-степень агрегации тромбоцитов после инкубации плазмы богатой тромбоцитами с изучаемыми соединениями.

Новые производные бензимидазола, имеющие в структуре экранированный фенольный заместитель были изучены в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-6}$  М. Препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-5}$  М. Для соединений, проявивших высокую антиагрегантную активность, рассчитывали величину  $\text{IC}_{50}$  (концентрация, ингибирующая активацию тромбоцитов на 50 %).

#### ***Метод исследования антиоксидантной активности.***

Антиоксидантную активность веществ изучали в экспериментах *in vitro* на модели аскорбат-зависимого ПОЛ [Ланкин В.З., 1975]. Соединения исследовали в

диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$  М. В качестве субстрата использовали 4% гомогенат печени крыс. Реакцию инициировали 50 мМ аскорбиновой кислотой (*Chemapol*, Чехия). О скорости окисления судили по накоплению малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой (*Fluka*, Швейцария). Оптическую плотность окрашенного продукта измеряли при длине волны 532 нм на спектрофотометре PD-303 UV (*APEL*, Япония) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Активность веществ оценивали в % по отношению к пробе без соединения. В качестве препарата сравнения использовали дибунол (*Merck*, Германия). Расчет  $IC_{50}$  (ингибирующая концентрация, подавляющая ПОЛ на 50%) выполнялся с применением регрессионного анализа в программе Microsoft Excell.

***Метод исследования функциональной активности тромбоцитов in vivo.***

Влияние вещества на функциональную активность тромбоцитов в тесте *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 PRP, которую забирали у 72 беспородных половозрелых крыс самцов массой 250,0-300,0 г, которым за 2 часа до исследования внутривенно с помощью металлического атравматического интрагастрального зонда вводили соединения, проявившие наибольшую антиагрегантную активность в опытах *in vitro* и превосходящие по значениям  $IC_{50}$ , препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Перед началом исследования выполняли подсчет тромбоцитов. Каждая проба содержала тромбоциты в диапазоне 800-900 тыс./мкл, расчет которых производился с помощью специального счетчика клеток Биола LA220.

Калибровка прибора проводилась по дистиллированной воде, согласно инструкции. При этом светопропускание дистиллированной воды принимали за 100%.

Для получения контрольной пробы в кювету агрегометра вносили 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы контрольного животного, которому внутрижелудочно вводили дистиллированную воду, и после включения записи агрегатограммы на 10 секунде регистрации процесса в кювету добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 5 мкМ.

С целью получения результатов опытной пробы в кювету агрегометра поэтапно вносили сначала 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы животного, опытной группы, которому вводили тестируемый образец, а после включения записи агрегатограммы на 10 секунде процесса в кювету добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 5 мкМ.

В процессе регистрации агрегации тромбоцитов в течение 5 минут получали кривые, которые отражали падение оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы. Степень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Расчёт ингибирующего влияния изучаемых соединений на агрегацию тромбоцитов (ИнАТ), проводили по формуле:  $\text{ИнАТ} = 100 - (B/A) \times 100\%$ ; где

А-степень агрегации тромбоцитов крови крыс без изучаемых соединений,

В-степень агрегации тромбоцитов после инкубации плазмы богатой тромбоцитами с изучаемыми соединениями.

В ходе исследования антиагрегантной активности производных бензимидазола *in vitro*, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель, было выявлено три соединения под шифрами РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263, проявляющие высокую антиагрегантную активность. Поэтому, данные образцы были изучены в тесте *in vivo*, в дозах, эквимолярных дозе препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты – 19 мг/кг (доза, эквимолярная  $IC_{50}$  ацетилсалициловой кислоты, полученной в опытах *in vitro*). Для соединения РУ-1144, она составила 48 мг/кг (доза, эквимолярная препарату сравнения ацетилсалициловой кислоте), а для соединений под лабораторным шифром РУ-1261 и РУ-1263 эта доза составила 53 мг/кг (ввиду схожей молекулярной массы данных соединений). С целью исследования показателя  $ED_{50}$  все соединения были

дополнительно изучены в убывающих дозах. Так, для соединения РУ-1144 эти дозы были равны 24; 18 и 12 мг/кг, а соединения по шифру РУ-1261 и РУ-1263 были также изучены в дозах равных 40 и 26 мг/кг.

Препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 19 мг/кг (доза, эквимолярная  $IC_{50}$ , полученной в опытах *in vitro*), а также в возрастающих дозах равных 28 и 38 мг/кг. А препарат сравнения клопидогрел был изучен в дозе 32 мг/кг (доза, эквимолярная дозе ацетилсалициловой кислоты -19 мг/кг) и в убывающих дозах 16; 8 мг/кг. Для всех тестируемых образцов рассчитывали величину  $ED_{50}$  (эффективная доза, в которой вещество ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

***Метод проведения анализа зависимости между антиагрегантной активностью и химической структурой производных бензимидазола.***

При анализе зависимости выбранных видов активности от химической структуры производных бензимидазола все изученные вещества были разделены на классы с различным уровнем активности. В целях определения границ класса соединений с высокой антиагрегантной активностью выполнялся кластерный анализ данных по показателю  $\Delta\%$ . После разделения веществ на классы активности была проведена корреляция между антиагрегантным и антиоксидантным видом активности [Мандель И. Д., 1988].

***Методы исследования антитромботических свойств соединений.***

Эксперименты были выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 350-400 г и беспородных мышах. Изучено новое производное бензимидазола под шифром РУ-1144. В качестве препаратов сравнения использовались ацетилсалициловая кислота (Sigma, США) и клопидогрел («Dr. Reddy's Laboratories Ltd.», Индия). Вещество растворяли в дистиллированной воде и исследовали в изоэквимолярной дозе ацетилсалициловой кислоте (19 мг/кг), которая составила для соединения РУ-1144 – 48 мг/кг, а для препарата сравнения клопидогрел 32 мг/кг, которые вводились внутривенно за 2 часа до моделирования тромбозов, что соответствует времени достижения максимальной

концентрации ацетилсалициловой кислоты в крови. Контрольная группа животных получала растворитель в эквивалентном объеме.

*Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа.*

Антитромбогенную активность соединений изучали при использовании модели артериального тромбоза сонной артерии у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) согласно методу [Kurz K.D., 1990], которую воспроизводили через 2 часа после введения соединений. Крыс внутрибрюшинно наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг), затем послойно вскрывали кожу и ткани, а после выделяли сонную артерию на 3 см в длину. На участок под и над сонной артерией длиной в 1 см укладывали ватный диск размером 2 мм x 8 мм, смоченный 50% раствором хлорида железа (III) (0,025 мл), и пленку Parafilm с целью изоляции окружающих тканей. Для детекции скорости кровотока использовали ультразвуковой доплерограф «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург). Ультразвуковой датчик прибора устанавливался на расстоянии 0,5 см от сонной артерии, без контакта с ватным диском (рис. 2.1). Регистрацию кровотока проводили до полной остановки кровотока и, как следствие, полной окклюзии сосуда.

С целью определения показателя ED<sub>50</sub> (доза, в которой изученные соединения увеличивают время окклюзии сосуда тромбом по отношению к контролю на 50%) в зависимости от проявленного антитромботического эффекта, доза соединения-лидера и препаратов сравнения либо увеличивались, либо уменьшались. Для соединения РУ-1144 они составили - 12 и 24 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты – 100 и 150 мг/кг, а для препарата сравнения клопидогрел - 60, 120, 180 мг/кг.

*Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.*

Исследования выполнены согласно методу Guglielmi G. et al. (1991) на нелинейных крысах – самцах массой 300-350 г. В результате повреждения эндотелия сосудистой стенки воздействием постоянного электрического тока

происходит инициация процессов активации и агрегации тромбоцитов с формированием, в конечном итоге, тромбиновых сгустков крови.

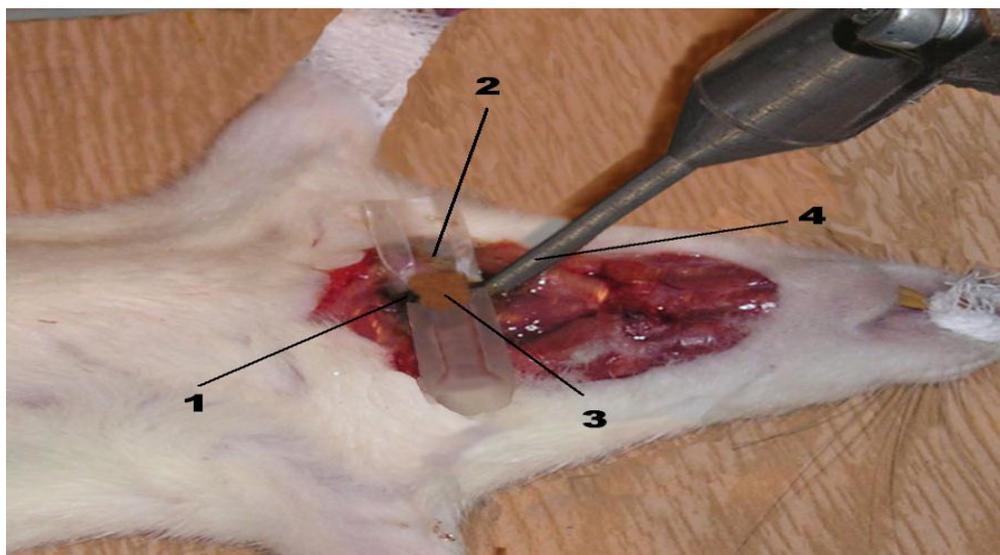


Рис. 2.1 - Моделирование артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III).

Примечание: 1 – сонная артерия, 2 - пленка Parafilm, 3 - ватный диск, смоченный 50% раствором хлорида железа (III), 4 - ультразвуковой датчик.

Артериальный тромбоз, вызванный аппликацией анодного электрического тока на сонную артерию крыс, моделировали на наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно) животных. После наркотизации проводили послойное вскрытие кожи и тканей, после чего отпрепаровывали сонную артерию на 3 см в длину.

На участок сосуда длиной 1 см были наложены титановые электроды, на места их контакта с артерией наносился акустический гель. Окружающие ткани изолировались пленкой Parafilm. На расстоянии 0,5 см от данного участка устанавливался датчик аппарата с рабочей частотой ультразвукового зондирования 25 МГц.

Индуцирование тромбоза сонной артерии проводилось постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока при этом соответствовала 50 мА. Регистрация показателей скорости кровотока выполнялась с момента иницирования тромбоза и до момента полной окклюзии. Определение артериального кровотока проводилась с помощью ультразвукового доплерографа «Минимакс-Допплер-К («СП Минимакс», Санкт-Петербург,

Россия) (рис. 2.2). В качестве параметра, характеризующего антитромботические свойства исследуемых веществ, использовался интервал времени от момента начала стимуляции до полной окклюзии каротидной артерии. Исходя из проявленного антитромботического действия с целью определения ED<sub>50</sub>, доза соединения РУ-1144 была уменьшена до 24, 12 и 6 мг/кг, а препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела увеличена до 25, 50, 100 и 60, 12 мг/кг, соответственно.

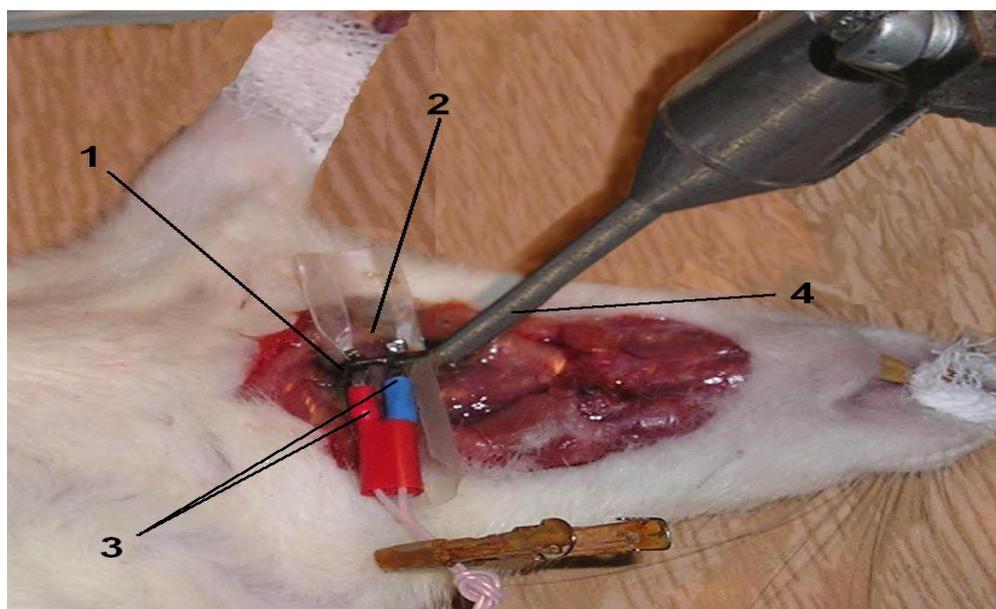


Рис. 2.2 - Моделирование артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.

Примечание: 1 – сонная артерия, 2 - пленка Parafilm, 3 – титановые электроды, 4 - ультразвуковой датчик.

*Модель генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза на мышах.*

Данная модель была воспроизведена в соответствии с методикой [Di Minno G., 1983]. Генерализованный клеточный тромбоз позволяет проводить оценку влияния соединений на процесс системной агрегации тромбоцитов. В качестве агента, вызывающего тромбоз, использовали смесь растворов двух компонентов: коллагена - в дозе 0,5 мг/кг и адреналина - в дозе 0,06 мг/кг. В качестве критерия эффективности исследуемых веществ фиксировали количество выживших

животных по сравнению с группой контрольных животных и проводилось гистологическое подтверждение наличия тромбов в сосудах легких.

За выжившими животными наблюдали в течение суток. Умершие и выжившие мыши (с целью эфтаназии вводился хлоралгидрат 400 мг/кг, внутрибрюшинно) подвергались вскрытию для гистологической оценки тканей легких. У животных всех групп проводили гистологическую оценку печени, сердца, почек, головного мозга. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали с использованием цифровой камеры Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10.

При проведении морфологического исследования выявляли и оценивали признаки тромбообразования в стенке артериальных сосудов мышечного типа, проводился расчет площади и периметра тромбов.

#### *Моделирование Global Thrombosis Test (по Горогу).*

Данное исследование было выполнено на 12 белых беспородных крысах самцах весом 250-300 г. Соединение под шифром РУ-1144 растворяли в дистиллированной воде и вводили внутривенно за 2 часа до начала проведения эксперимента в дозе ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* равной 18,8 мг/кг. Группе контрольных животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. После этого проводили наркотизацию животных, используя хлоралгидрат в дозировке 400 мг/кг (внутрибрюшинно), послойное вскрытие и осуществляли забор крови из брюшной аорты шприцем в объеме 5 мл, содержащем 20 мкМ индуктора агрегации тромбоцитов АДФ [Yamamoto J., 2014]. Следующим этапом, полученную кровь немедленно помещали в специальную пробирку Горога (рис. 2.3) без добавления стабилизаторов и консервантов крови. Основными критериями оценки антитромботического действия тестируемого соединения служили показатели времени окклюзии и времени лизиса с использованием программного обеспечения GTT Draw2.3 для считывания параметров.

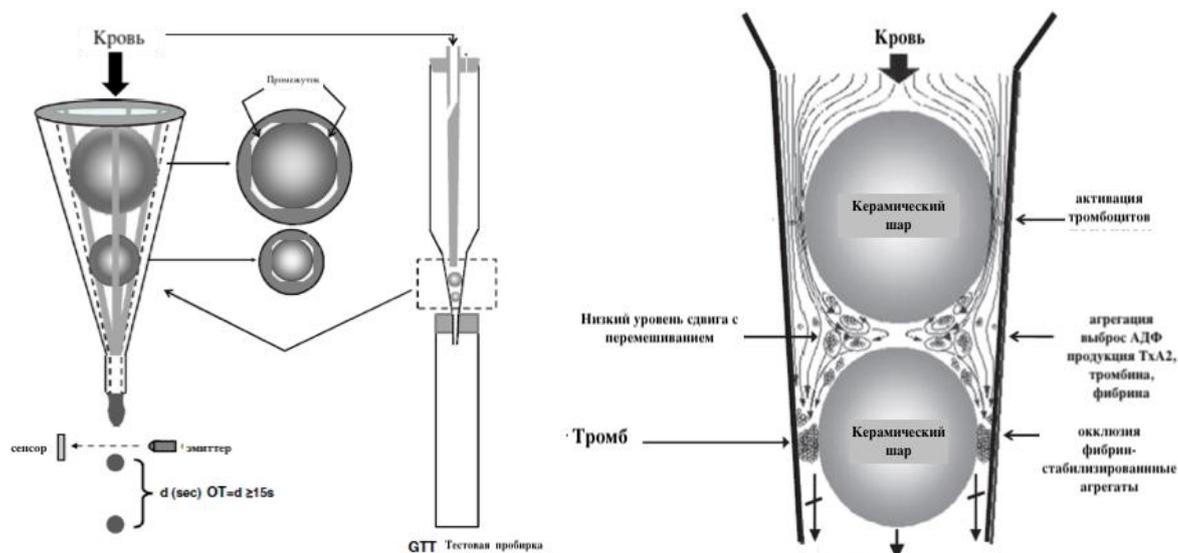


Рис. 2.3-строение пробирки Горога и принцип метода [Yamamoto, J., 2014].

*Модель изучения антитромботического действия в условиях некоронарогенного инфаркта миокарда.*

Формирование некоронарогенного инфаркта миокарда проводили на 12 белых беспородных крысах самцах массой 250-300 г. Патологию воспроизводили с использованием изопротеренола, который вводили двукратно с интервалом 24 часа в дозе 85 мг/кг подкожно в область паховой складки [Mohamed A.R., 2014].

Соединение лидер растворялось в дистиллированной воде и вводилось крысам не ранее чем через 24 часа после последней инъекции изопротеренола. Через 2 часа после введения тестируемого образца проводили исследование антитромботического действия с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990]. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме.

*Модель тромбоза глубоких вен.*

Данная модель была воспроизведена с использованием модели перевязки нижней полой вены крыс по методу Henke P.K. [Henke P.K., 2007]. Все исследуемые образцы растворяли в дистиллированной воде и вводились внутривенно с помощью гастрального зонда за 2 часа до перевязки нижней полой вены, в дозах  $ED_{50}$  антиагрегантной активности *in vivo*. Группа

контрольных животных получала растворитель в эквивалентном объеме. С целью исключения влияния хирургической составляющей на образование тромба или гибель животных в исследование была включена группа ложно-оперированных животных, которой не вводили тестируемые образцы, но проводили лапаротомию и последующее ушивание брюшной полости. Все эксперименты выполнены на 30 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутривнутрибрюшинно) и проводили послойную лапаротомию, затем отделяли аорту от нижней полой вены, и осуществляли перевязку последней на 1 см выше места ее разделения. Затем брюшную полость ушивали и ровно через сутки крыс повторно наркотизировали и производили лапаротомию с последующим извлечением тромба из нижней полой вены. После тщательного отделения тромба от сосуда определяли его массу путем взвешивания.

#### ***Модель «Время кровотечения» на мышах.***

Для определения времени свертывания крови была использована модель «время кровотечения на мышах» [Gratacap M., 2009; Greene T.K.,2010]. Для воспроизведения данной модели у мыши отсекали 5 мм кончика хвоста. Хвост помещали в пробирку с физиологическим раствором, находящейся на водяной бане (37<sup>0</sup> C) и регистрировали время, выраженное в секундах, от момента отсекания кончика хвоста до момента прекращения вытекания крови из сосудов хвоста. По действию на данный параметр соединения и препараты сравнения были изучены в дозах равных ED<sub>50</sub>, которые были получены на модели агрегации тромбоцитов в тесте *in vivo* при пероральном введении животным за 2 часа до исследования. Вещество растворялось в дистиллированной воде и вводилось перорально. Группа контрольных животных получала эквивалентный объем растворителя.

#### ***Методы исследования механизма антиагрегантного действия.***

*Метод изучения влияния соединений на активацию P2Y<sub>1</sub>-рецепторов и P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тромбоцитов.*

Эксперименты проводили на богатой тромбоцитами плазме 6 кроликов-самцов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг, а также 18 крысах-самцах массой 250-300 г, методом малоуглового светорассеяния [Сакаев М.Р., 2000].

Влияние тестируемых соединений на активацию P2Y<sub>1</sub>-рецепторов *in vitro* проводили в безкальциевой среде, которая содержала следующие компоненты: трис-НСl - 0,472 г., NaCl - 2,456 г., ЭДТА - 0,504 г. Навеску растворяли в 300 мл дистиллированной воды с обязательным измерением рН раствора (рН=7,8). Для активации P2Y<sub>1</sub>-рецепторов тромбоцитов использовали АДФ в концентрации 70 нМ.

Для изучения влияния соединений на агрегацию тромбоцитов, вызванную активацией P2Y<sub>12</sub>-рецепторов *in vivo*, эксперименты проводили в кальциевой среде, содержащей следующие компоненты: трис-НСl - 0,472 г., NaCl - 2,456 г., ЭДТА - 0,504 г., CaCl<sub>2</sub> - 11,1 мкл. Навеска растворялась в 300 мл дистиллированной воды с последующим измерением рН раствора (рН=7,8). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов для данного подтипа рецепторов использовали АДФ в концентрации 200 нМ.

Для получения контроля в кювету анализатора вносили 7 мл буфера и проводили запись в течение 5 минут, а затем добавляли 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Затем, примерно через 1-2 минуты в кювету вносили индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 70 нМ или 200 нМ.

При изучении антиагрегантной активности тестируемых образцов в кювету последовательно добавляли 7 мл буфера, а затем 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы. После установления постоянного уровня на графике в пробу вносили 100 мкл раствора исследуемого соединения в определенной концентрации. Запись пробы производилась в течение 5 минут, при постоянном перемешивании магнитной мешалкой (800 об/мин), после чего в кювету добавлялся индуктор агрегации АДФ в определенной концентрации производилась запись агрегатограммы в течение 5 минут. Влияние соединения РУ-1144 на P2Y<sub>1</sub>-рецепторы тромбоцитов *in vitro* оценивали в концентрации 1 мкМ. В аналогичной

концентрации проводили исследование вещества-сравнения под шифром MRS-2179 (высоко селективный блокатор P2Y<sub>1</sub>-рецепторов тромбоцитов). При изучении влияния соединений на P2Y<sub>12</sub>-рецепторы тромбоцитов в качестве препарата сравнения был использован известный блокатор данного подтипа рецепторов - клопидогрел. Соединение под шифром PУ-1144 было изучено в трех дозах- 9,4; 18,8 и 37,6 мг/кг, а препарат сравнения клопидогрел - в дозах, которые составили 1,5; 3,5; 7,0 и 13,8 мг/кг, с целью поиска показателя ED<sub>50</sub>. Тестируемые образцы вводились внутривенно за 2 часа до проведения эксперимента.

Уровень активации тромбоцитов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Расчёт ингибирующего влияния на активацию тромбоцитов (Δ%) изучаемых тестируемых образцов производили по формуле:

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

A-степень активации тромбоцитов без тестируемых соединений (образец контрольной группы);

B-степень активации тромбоцитов после инкубации PRP с тестируемыми соединениями (образцы опытной группы).

*Исследование влияния соединений на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами.*

Функциональную активность тромбоцитов, стимулированных различными индукторами, оценивали согласно методу Born G, в модификации Габбасова В.А. (1989). Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме 6 кроликов, на крови здоровых доноров (ввиду неспецифичности агониста PAR<sub>1</sub>-рецепторов к тромбоцитам кролика) и на суспензии отмытых тромбоцитов кролика.

Для отмыывания тромбоцитов богатую тромбоцитами плазму трижды центрифугировали с буфером (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM глюкозы и 0,35 mM бычьего альбумина, pH 6,7), а затем отмытые тромбоциты ресуспендировали в финальном буфере с вышеуказанным составом, но с pH 7,35.

Тестируемый образец PУ-1144 растворяли в дистиллированной воде непосредственно перед исследованием. Препарат сравнения ацетилсалициловая

кислота растворялась в 30 мкл ДМСО с последующим добавлением дистиллированной воды до необходимого объема. Изучение влияния соединения РУ-1144 и препарата сравнения на процессы агрегации тромбоцитов, вызванной различными индукторами, происходило в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-4}$  –  $1 \times 10^{-7}$  М. Тестируемые образцы добавляли за 5 минут до инициации процесса агрегации. Концентрации индукторов составляли: для АДФ и адреналина – 5 мкМ, арахидоновой кислоты - 50 мкМ, тромбина - 0,5 ед/мл, коллагена - 4 мкг/мл, U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) - 3 мкМ, PAR1-агониста – 30 мкМ, ристоцетина – 1,25 мг/мл, фактора активации тромбоцитов – 10 мкМ. Влияние соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную такими индукторами как: АДФ, адреналин, арахидоновая кислота, коллаген, фактор активации тромбоцитов, ристоцетин, было изучено на богатой тромбоцитами плазме кролика. Действие тестируемого образца РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистом PAR1 рецепторов, изучалось на богатой тромбоцитами плазме здоровых доноров. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную тромбином и U46619, исследовали на суспензии отмытых тромбоцитов кролика. Для оценки активности соединений определяли  $\Delta\%$  ингибирования агрегации тромбоцитов и величину  $IC_{50}$ .

***Исследование влияния соединений на баланс тромбоксана  $B_2$  и 6-кето-простагландина ( $PGF_{1\alpha}$ ).***

Эксперименты были выполнены на 36 крысах-самцах массой 250-300 г. Влияние тестируемого образца РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на уровень тромбоксана  $B_2$  ( $TxB_2$ ) и 6-кето-простагландина ( $PGF_{1\alpha}$ ) осуществляли методом иммуноферментного анализа, воспроизведенном на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200, через 2 часа после однократного внутрижелудочного введения соединений при использовании наборов ELISA kit для определения уровней данных веществ (Enzo, США) [Rao M.L., 2014]. Тестируемый образец РУ-1144 и ацетилсалициловую кислоту предварительно растворяли в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. В качестве биоматериала для исследования

производили забор крови с брюшной аорты крыс, с последующим получением плазмы богатой тромбоцитами по ранее описанному методу. Исследуемое соединение и препарат сравнения были изучены в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo*, составившие для соединения РУ-1144 - 18,8 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты - 27 мг/кг.

***Измерение уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика.***

Исследования проводились на 6 кроликах самцах породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. Отмывание тромбоцитов выполняли по методу описанному ранее. Уровень внутриклеточного кальция измеряли дважды: в суспензии отмывтых тромбоцитов кроликов, индуцированных тромбином, при использовании флуоресцентного зонда Fura 2-AM в кальциевой (CaCl<sub>2</sub> 1мМ) и безкальциевой среде согласно методике [Ryu S.K., 2006] на микропланшетном ридере TECAN (Австрия).

Для исследования в первый ряд планшеты помещали 300 мкл отмывтых тромбоцитов крыс с добавлением 5 мкМ Fura-2/AM. Данную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C (для определения наличия собственной флуоресценции зонда). Затем в лунки планшеты помещали 300 мкл отмывтых тромбоцитов крыс с 5 мкМ Fura-2/AM и индуктора - 0,5 ед/мл тромбина, с последующей инкубацией 30 мин при 37°C (позитивный контроль).

Далее проводилась инкубация 300 мкл отмывтых тромбоцитов с 5 мкМ Fura-2/AM, 0,5 ед/мл тромбина и тестируемым образцом 30 мин при 37°C (образцы опытной группы).

После инкубации проводили измерение интенсивности флуоресценции на микропланшетном ридере при длине волны возбуждения 340 nm и 380 nm и длине волны испускания 510 nm. Измерение флуоресценции производили в 4 точках непосредственно в каждой лунке.

Концентрация катионов кальция рассчитывалась при помощи уравнения [Schaeffer and Blaustein, 1989]:

$$[Ca^{2+}]_i \text{ (нМ)} = 224 \text{ нМ} \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F), \text{ где}$$

224 нМ – константа диссоциации комплекса Fura-2/AM и кальция;

F – интенсивность флуоресценции зонда в пробе (отн.ед.) с тромбином или без и с веществами;

$F_{\min}$  – собственная флуоресценция зонда, свободного от кальция, измеренная после добавления 10 mM ЭГТА;

$F_{\max}$  – флуоресценция зонда, насыщенного кальцием, измеренная после добавления в пробу 10 мкМ 0,1% Triton X-100.

Тестируемый образец РУ-1144 был изучен в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ с последующим расчетом значения  $IC_{50}$ , препарат сравнения верапамил был исследован в концентрации 100 мкМ.

### *Изучение общетоксических свойств.*

Исследования были выполнены на 42 белых беспородных мышах-самцах, массой 20-25 г., с использованием многотестового наблюдения по С. Ирвину в модификации [Бугаевой Л.И., 2012; Irwin S., 1964]. Соединение РУ-1144 растворяли в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Тестируемый образец вводили внутрижелудочно в возрастающих дозах: 50 мг/кг, 100 мг/кг, 250 мг/кг, 500 мг/кг, 750 мг/кг и 1000 мг/кг. Перед введением растворов соединения РУ-1144 исследовались исходные показатели тестов. Всего было 6 экспериментальных и одна контрольная группа животных по 6 особей в каждой.

За животными наблюдали в течение 4 часов после введения соответствующей дозы соединения во временных интервалах – 30, 60, 120, 180, 210 и 240 минут с момента записи исходных параметров. При этом оценивались следующие параметры:

*Вокализация* - частота и длительность вокализации в спокойном состоянии, а также при использовании внешних раздражителей (касание корнцангом или пинцетом животного).

*Настороженность* – данный параметр определялся ориентировочными рефлексамии, так, в непосредственной близости производился громкий хлопок, как звуковой раздражитель, при этом отмечался уровень ответа животного: 0 баллов -

отсутствие реакции; 1 балл - замирание; 2 балла – поворот к источнику звука; 3 балла - вздрагивание; 4 балла - прыжок.

*Пассивность* - оценивалась по изменению показателей горизонтальной двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «открытое поле».

*Стереотипия* – регистрировалась при устойчивом бесцельном повторении движений. Уровень проявляемой стереотипии исследовался при использовании балльной шкалы оценок: 0 баллов - отсутствие стереотипии; 1 балл - отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное приноживание; 2 балла - непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 балла - длительная и интенсивная стереотипия, но с перерывами и изменением стереотипного движения; 4 балла - постоянная и интенсивная стереотипия.

*Агрессия* - (оценка производилась вместе с вокализацией) при прикосновении корнцангом или пинцетом к коже шеи, живота.

*Беспокойство* - оценивалась визуально в сравнении с группой интактных животных.

*Груминг* – изучалось количество и продолжительность груминга в «тесте открытое поле», так длительный груминг (более 10-15 секунд) свидетельствовал о снижении волнения животного, а краткосрочный и повторяющийся груминг указывал на возросшее беспокойство мышей.

*Спонтанная двигательная активность* – определялась по количеству переходов, фиксируемых в «актометре».

*Нервно-мышечные эффекты:*

*Реакция на прикосновение* – фиксируется вокализация при прикосновении, отдергивания головы при раздражении слухового прохода и отдергивания головы при раздражении роговицы.

*Реакция на боль* – регистрация происходила с помощью наложения на основание хвоста зажима в виде корнцанга, при которой фиксировалось время

вокализации, в секундах и отличие в реакции между исходным и фиксируемым значением.

*Реакция на стук* - 0 баллов - отсутствие реакции; 1 балл - замирание; 2 балла – поворот к источнику звука; 3 балла - вздрагивание; 4 балла - прыжок.

*Судороги* – 0 баллов – отсутствие судорог; 1 балл - двигательное возбуждение, бег, штраубе (степень возбуждения спинальных мотонейронов, ответственных за регуляцию тонуса мышц хвоста до 90°); 2 балла – клонические судороги, штраубе (характеризует степень возбуждения спинальных мотонейронов, ответственных за регуляцию тонуса мышц хвоста на 90-180°); 3 балла – тонические судороги; 4 балла – клонико-тонические судороги.

*Тремор* - 0 баллов – отсутствие тремора, 1 балл - локальный, мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 балла - локальный, среднеамплитудный тремор, 3 балла – генерализованный мелкоамплитудный тремор всего тела, 4 балла – генерализованный среднеамплитудный тремор всего тела.

*Тонус конечностей* - оценивается способность удерживаться на сетке и проволоке 4 конечностями в перевернутом положении в течение 30 секунд.

*Расстройство походки* - фиксировались изменения походки животного, скованность движения, шатание при передвижении, порезы, неспособность к передвижению.

*Вегетотропные эффекты:*

*Птоз/экзофтальм* – фиксировалось наличие птоза или экзофтальма в сравнении с показателями контрольной и интактной группами животных.

*Размеры зрачка* - наличие птоза (0 баллов - полное открытие, 1 балл - до 3 мм, 2 балла - до 2 мм, 3 балла - до 2 мм, 4 балла - полное закрытие зрачка)

*Уринация* – количество актов мочеотделения в тесте «открытое поле».

*Дефекация* - количество болюсов в тесте «открытое поле».

*Саливация* - проводилась оценка размера пятна на шее вызванного повышением слюнеотделения: 0 баллов - отсутствие, 1 балл - до 0,25 см, 2 балла - до 0,75 см, 3 балла - до 1,5 см, 4 балла – до 2 см.

*Цвет кожи* - проводился осмотр цвета кожи ушей и сравнение с интактными животными.

*Частота дыхания* - определялась при подсчёте числа дыхательных движений у бодрствующих животных в течение 1 минуты.

*Ректальная температура* – мышь фиксировалась, после чего, датчик термометра предварительно смазанный вазелиновым маслом вводился животным в анальное отверстие, прибор включался и после звукового сигнала фиксировалась полученная температура (результаты трактовались следующим образом, если разница между исходным значением и фиксируемым составляет: от 0 до 0,2 °С - 0 баллов, от 0,2 до 0,5 °С - 1 балл, от 0,5 до 1 °С - 2 балла, от 2 до 3 °С - 3 балла, более 3 °С - 4 балла).

#### ***Исследование острой токсичности (LD<sub>50</sub>).***

Перед введением тестируемого образца РУ-1144 животные были лишены корма на 12 часов. Объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывали исходя из массы тела. Соединение РУ-1144, растворенное в дистиллированной воде в возрастающих дозах 600, 800 и 1000 мг/кг, вводили мышам самцам внутрибрюшинно.

После введения соединения-лидера РУ-1144 за животными было установлено наблюдение, с целью выявления смертности или токсических признаков в течение 14 дней исследования. В первые сутки в течение 6 часов после введения вещества происходила регистрация сроков развития интоксикации и гибель животных [Саноцкий И.В., 1975; Миронов А.Н., 2012], в последующие дни - 2 раза в день (утром и вечером).

Фиксировалось общее состояние животных - состояние шерстного покрова, изменение его гладкости, плотности, опрятности; слизистых оболочек – окраска, отечность, наличие и характер выделений; подвижность, реакцию на тактильные, болевые, звуковые раздражители, потребление корма, воды, изменение массы тела, характеризующее токсическое действие.

Начиная с группы животных, получавших дозу, которая предшествовала дозе, при введении которой наблюдалась хотя бы одна гибель животного и у всех

последующих групп с возрастанием дозы производили оценку параметров негативного влияния на неврологический статус: наличие тремора, судорожного синдрома, изменения подвижности, двигательной активности, стереотипного поведения, седации.

Все умершие животные были подвержены аутопсии. Проводилось вскрытие животного, с последующим макроскопическим изучением внутренних органов.

По результатам гибели животных рассчитывалась величина LD<sub>50</sub> исследуемого соединения РУ-1144 при использовании регрессионного анализа согласно методу Литчфилда и Уилкоксона [Миронов А.Н., 2012]. После получения показателя устанавливалась принадлежность соединения-лидера РУ-1144 к классу токсичности лекарственных средств [Саноцкий И.В., 1975; Березовская И.В., 2003].

#### ***Статистическая обработка данных.***

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

Достоверность эффективности соединения-лидера РУ-1144 относительно препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела определяли с помощью критерия множественного сравнения one-way ANOVA с поправкой Бонферрони («Graph.Pad.Prism5.0»). Статистическую обработку данных, полученных при исследовании гистологических препаратов, проводили с использованием программы «Видео Тест Морфо-4».

### ГЛАВА 3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА.

Процесс образования тромбов играет одну из важнейших ролей в патогенезе ишемических нарушений в различных органах и тканях человеческого организма и, тем самым, определяет высокую значимость использования антиагрегантов и других методов терапии, для их лечения и профилактики [Gaba K., 2018] [Anjum I. 2018]. Однако, известные антиагрегантные средства очень часто не проявляют необходимую активность, а также имеют различные по выраженности побочные эффекты [Simon J., 2017] [Szabó I.L., 2017]. Именно поэтому, высокоактуальной остается необходимость поиска новых ингибиторов процесса агрегации тромбоцитов, с более выраженной активностью и меньшими побочными эффектами. Для исследования новых соединений, решающих проблему регуляции клеточного звена гемостаза, необходимым начальным этапом является поиск и выявление высокоактивных субстанций в опытах *in vitro* [Миронов А.Н., 2012].

Кроме поиска наиболее активных молекул в тесте *in vitro* на модели АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов, важно оценить действие соединений на организм в целом, и учесть влияние различных факторов на процесс тромбообразования в сосудистом русле благодаря опытам *in vivo*, а также точнее оценить антиагрегационный эффект исследуемых соединений по сравнению с исследованиями *in vitro* [GaoW, 2017].

Для дальнейшего более успешного применения нового потенциального антиагреганта в клинической практике, данное соединение должно превосходить по активности известные антиагрегантные препараты [Миронов А.Н., 2012]. Именно поэтому с целью характеристики действия исследуемых соединений и их активности, необходимо сравнение с эталонными препаратами, близкими по механизму действия к тестируемому образцу. Поэтому целью данных исследований явился поиск высокоактивных соединений в ряду производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель в опытах *in vitro*, а также изучение антиагрегантного действия

соединения-лидера в условиях целого организма животного в тесте *in vivo* на модели АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов.

С целью определения безопасности потенциального лекарственного препарата необходимым этапом его изучения является установление величины острой токсичности и определение показателя условного терапевтического индекса.

### **3.1. Поиск соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов *in vitro*.**

Исследование по влиянию 26 новых производных бензимидазола было проведено с целью оценки уровня их антиагрегантной активности в концентрации 100 мкМ на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (табл. 3.1). Препаратом сравнения в данном исследовании выступала ацетилсалициловая кислота, как известное антиагрегантное средство с доказанной активностью. При этом антиагрегантная активность ацетилсалициловой кислоты в концентрации 100 мкМ составила 53,1%.

Наиболее активными соединениями в отношении блокирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов оказались образцы под шифрами РУ-871; РУ-873; РУ-903; РУ-1144; РУ-1180; РУ-1249; РУ-1261; РУ-1263; РУП-46; РУП-56; РУП-66; РУП-76 и РУС-193. Ингибирующая активность данных соединений в концентрации равной 100 мкМ составила 82,0; 91,9; 69,9; 91,0; 67,7; 77,7; 80,0; 86,5; 86,1; 65,9; 69,8; 84,4 и 84,3 % соответственно (табл.3.1.1).

Среди данных соединений только образцы под лабораторным шифром РУ-873; РУ-1144; РУ-1263; РУП-46; РУП-76; РУС-193; РУ-871; РУ-1261; РУ-1249; РУП-26; РУС-190; РУ-1265; РУП-2; РУЧ-6; РУ-1260; РУ-1251; РУ-887; РУС-198 и РУЧ-2 по эффективности статистически значимо превосходили препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту.

**Таблица 3.1 - Влияние производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика и на перекисное окисление липидов (ПОЛ) *in vitro* (M±m, n=6)**

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

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

Тестируемые образцы под шифрами РУ-903; РУП-66; РУ-1180; РУП-56; РУП-36; РУС-191 и РУ-1250 также недостоверно превосходили препарат сравнения по ингибирующему влиянию на агрегацию тромбоцитов. Соединения

под лабораторными шифрами РУ-887; РУ-1250; РУ-1251; РУ-1260; РУ-1265; РУП-2; РУП-2б; РУП-3б; РУС-190; РУС-191; РУС-198; РУЧ-2 и РУЧ-6 проявили меньшую антиагрегантную активность, уступая препарату сравнения ацетилсалициловой кислоте (табл. 3.1).

В результате проведенных исследований в ряду производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель, по влиянию на АДФ- индуцированную агрегацию тромбоцитов было выявлено соединений, представителей групп пиримидобензимидазола и *1H*-бензимидазола, для изучения дозозависимой активности с целью нахождения показателя  $IC_{50}$  (эффективная концентрация, в которой тестируемый образец ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

В ранее проведенных исследованиях установлена способность производных бензимидазола, содержащих в своей структуре пространственно затрудненный фенол, проявлять выраженную антиоксидантную активность [Santanam S., 1995; Venkatesan P., 2000; Wright J. S., 2001]. Именно поэтому, кроме исследования антиагрегантной активности, у данных соединений была изучена антиоксидантная активность в тесте аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ).

В отношении ингибирования перекисного окисления липидов среди данных соединений выявлено 12 высокоактивных веществ, которые по своему эффекту были сравнимы с дибунолом. Среднюю антиоксидантную активность проявили 11 соединений, остальные - были неактивными (табл.3.1).

Исследование зависимости между антиагрегантной и антиоксидантной активностями экранированных фенолов проводили вероятностным методом гистограмм [Мандель И. Д., 1988]. Для этого все изученные вещества были разделены на классы с различным уровнем активности. В целях определения границ класса соединений с высокой антиагрегантной активностью был выполнен кластерный анализ данных по показателю  $\Delta\%$  в изученных концентрациях: высокоактивные –  $\Delta\% \geq 50\%$ ; умеренно активные –  $\Delta\% \geq 25\%$  и низко активные –  $\Delta\% \geq 20\%$ .

Далее было проведено исследование корреляционной зависимости антиагрегантной и антиоксидантной активности. В группе соединений с высокой антиагрегантной активностью наблюдалась положительная корреляционная зависимость по отношению ко второму виду активности (табл.3.2). Коэффициент корреляции для данной группы составил 0,73. При сравнении других групп данный показатель не подтверждал корреляционную зависимость.

**Таблица 3.2 - Ранжирование исследуемых веществ по показателям корреляции между антиагрегантной и антиоксидантной активностями на моделях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов *in vitro*.**

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

На следующем этапе для 13 веществ производных групп пиримидобензимидазолов и *1H*-бензимидазолов, проявивших высокую ингибирующую активность в отношении АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, было исследовано дозозависимое действие, на основании которого рассчитана величина  $IC_{50}$  (табл. 3.3).

Наиболее активные соединения были также исследованы в дополнительных концентрациях 10 и 1 мкМ. Таким образом, соединение РУ-873 ингибировало агрегацию тромбоцитов, вызванную индуктором агрегации АДФ в концентрации 10 мкМ на 31,0 %, а в концентрации 1 мкМ – на 18,6 % и (табл. 3.3).  $IC_{50}$  данного соединения составила 12 мкМ.

Для остальных молекул таким же образом было определено значение  $IC_{50}$  методом регрессионной статистики. Для соединений РУ-871; РУ-1144; РУ-1180; РУ-1249; РУ-1261; РУ-1263; РУ-903; РУ-873; РУП-46; РУП-56; РУП-66; РУП-76 и РУС-193, которые составили 8,3; 5,5; 23,0; 20,0; 5,9; 5,3; 17,0; 12,0; 12,0; 22,0; 16,0; 10,0 и 18,0 мкМ соответственно.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в концентрациях 10 мкМ угнетала процесс агрегации тромбоцитов, индуцированный АДФ, на 26,8 %, а в концентрации 1 мкМ на 5,6 %. Значение  $IC_{50}$  препарата сравнения составило 120 мкМ (табл.3.1.3).

**Таблица 3.3 – Антиагрегантная активность ( $IC_{50}$ ) новых производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			$IC_{50}, \text{мкМ}$
		Исследуемая концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	РУ-1263	$86,5 \pm 3,72^*$	$45,4 \pm 3,96^*$	$38,3 \pm 4,40^*$	5,3
2.	РУ-1144	$91,0 \pm 2,53^*$	$52,8 \pm 0,96^*$	$29,9 \pm 4,60^*$	5,5
3.	РУ-1261	$80,0 \pm 8,11^*$	$53,5 \pm 1,77^*$	$32,8 \pm 5,54^*$	5,9
4.	РУ-871	$82,0 \pm 6,33^*$	$49,5 \pm 2,72^*$	$25,5 \pm 1,33^*$	8,3
5.	РУП-76	$84,4 \pm 6,36^*$	$49,9 \pm 1,00^*$	$15,1 \pm 2,73^*$	10
6.	РУ-873	$91,9 \pm 4,31^*$	$31,0 \pm 2,56^*$	$18,6 \pm 1,05^*$	12
7.	РУП-46	$86,1 \pm 2,85^*$	$38,0 \pm 4,36^*$	$19,2 \pm 3,13^*$	12
8.	РУП-66	$69,8 \pm 7,91^*$	$44,0 \pm 2,22^*$	$22,7 \pm 7,39^*$	16
9.	РУ-903	$69,9 \pm 8,34^*$	$36,0 \pm 5,19^*$	$29,5 \pm 5,40^*$	17
10.	Ацетилсалициловая кислота	$53,1 \pm 5,40^*$	$26,8 \pm 1,77^*$	$5,6 \pm 1,25$	120

Примечание: n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

Все исследованные соединения превосходили по значению  $IC_{50}$  препарат сравнения. Однако наиболее активными оказались образцы под шифрами РУ-1263; РУ-1144 и РУ-1261. Как видно из таблицы 3.3 данные соединения превосходили ацетилсалициловую кислоту по данному показателю в 22,6; 21,8 и 20,3 раза, соответственно.

На следующем этапе была изучена дозозависимая антиоксидантная активность этих трех соединений. В качестве препарата сравнения в данном тесте был выбран антиоксидантный препарат дибунол.

**Таблица 3.4 - Антиоксидантная активность соединений РУ-1144, РУ-1261, РУ-1263 на модели аскорбат – зависимого перекисного окисления липидов (опыты *in vitro*) ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ).**

Шифр	Антиоксидантная активность ( $\Delta\%$ ингибирования $M \pm m$ )					IC <sub>50</sub> , мкМ
	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$	
РУ-1144	87,6±6,52*	79,71±0,7*	61,13±1,1*	48,53±1,6*	35,36±2,8	2,12×10 <sup>-6</sup>
РУ-1261	67,9±5,13*	59,71±0,7*	44,71±1,4*	24,20±1,9*	6,25±1,4	5,53×10 <sup>-6</sup>
РУ-1263	80,7±2,34*	76,38±0,8*	53,30±2,6*	31,09±1,8*	17,33±2,7*	4,13×10 <sup>-6</sup>
Дибунол	85,8±2,78*	74,1±3,12*	-	-	45,3±1,8*	1,23×10 <sup>-6</sup>

Статистическая достоверность различий по сравнению с исходными показателями: \*  $p < 0,05$

Все соединения проявили дозозависимую антиоксидантную активность в отношении перекисного окисления липидов и для них были рассчитаны показатели IC<sub>50</sub>, которые в данном тесте уступали препарату сравнения дибунолу (табл.3.4).

### **3.2. Антиагрегантное действие соединений РУ-1263, РУ-1144 и РУ-1261 в опытах *in vivo*.**

Для поиска и выбора наиболее активного соединения для дальнейшего более глубокого изучения были выбраны соединения под шифрами РУ-1263, РУ-1144 и РУ-1261.

Проведенные эксперименты позволили установить, что все изучаемые соединения обладают выраженным дозозависимым антиагрегантным действием при их однократном внутривенном введении крысам. В группе контроля уровень агрегации тромбоцитов составил 36,5 отн.ед. Изучаемые соединения под лабораторным шифром РУ-1263 и РУ-1261 были исследованы, начиная с начальной дозы, равной 53 мг/кг (доза, соответствующая значению IC<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vitro*), ввиду их равной молекулярной массы. Соединение под шифром РУ-1263 в данной дозе достоверно относительно значений, полученных в группе контроля, снижало агрегацию тромбоцитов на 74,9% (табл. 3.5.). А соединение под лабораторным шифром РУ-1261 ингибировало функциональную активность тромбоцитов на 70,7 %. Для расчета показателя ED<sub>50</sub> (эффективная доза, в которой соединение ингибирует агрегацию

тромбоцитов на 50%) каждое соединение было исследовано в дозах, которые были уменьшены и составляли 40 и 26 мг/кг. Таким образом, соединение РУ-1263 в данных дозах блокировало АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 58,6% и 26,5% соответственно. При этом % ингибирования агрегации тромбоцитов соединения РУ-1261 в данных дозах составлял 55,0 и 35,6 %. Показатели ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности соединения РУ-1263 и 1261 составили 37,9 и 40,1 мг/кг (табл. 3.5).

**Таблица 3.5 – Антиагрегантная активность (ED<sub>50</sub>) новых производных бензимидазола, имеющих в своей структуре экранированный фенольный заместитель, при однократном внутривенном введении белым беспородным крысам самцам на модели АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов *in vivo* (M±m) (n=6)**

№ п/п	Название соединения	Доза, мг/кг	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	РУ-1144	48	90,4±4,96*	18,8
		24	81,8±4,30*	
		18	36,0±4,95*	
		12	19,2±0,76*	
2.	РУ-1261	53	70,7±4,03*	40,1
		40	55,0±8,28*	
		26	35,6±5,56*	
3.	РУ-1263	53	74,9±5,56*	37,9
		40	58,6±7,28*	
		26	26,5±6,43*	

\*изменения достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни p<0,02)

Наиболее активным соединением по показателю ED<sub>50</sub> оказалось производное пиримидобензимидазола под шифром РУ-1144. Так, в дозе 48 мг/кг (доза, соответствующая значению IC<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vitro*) данное вещество ингибировало агрегацию тромбоцитов на 90,4%, а в дозах 24 и 18 мг/кг Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов составил- 81,8 и 36,0 % соответственно. На основании полученных данных для соединения РУ-1144 была рассчитана доза ED<sub>50</sub>, которая составила 18,8 мг/кг.

Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел также были изучены в диапазоне доз для расчета показателя ED<sub>50</sub>. Ацетилсалициловая

кислота в дозе 19 мг/кг (доза, соответствующая значению IC<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vitro*) и возрастающих дозах равных 28 и 38 мг/кг блокировала агрегацию тромбоцитов крыс на 28,7; 54,8 и 65,2 мг/кг. Значение ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности ацетилсалициловой кислоты в условиях целостного организма составило 28,5 мг/кг.

Клопидогрел в дозе 32 мг/кг ингибировал агрегацию тромбоцитов на 93,4%. При снижении исследуемых доз до 16 и 8 мг/кг процент блокирования функциональной активности тромбоцитов составил 73,7 и 9,1% соответственно. (табл.3.6). Значение ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности клопидогрела при этом было равно 13,8 мг/кг. Таким образом, соединение под лабораторным шифром РУ-1144 по показателю ED<sub>50</sub> превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и было сравнимо с клопидогрелом.

**Таблица 3.6 - Антиагрегантная активность соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутривенном введении белым беспородным крысам самцам на модели АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов *in vivo*, (M±m, n=6)**

п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень агрегации тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Контроль	-	36,5±0,77	-	-
2.	РУ-1144	48	3,5±1,80	90,4±4,96*	18,8
		24	6,6±1,57*	81,8±4,30*	
		18	23,4±1,81*	36,0±4,95*	
		12	29,5±0,28*	19,2±0,76*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	38	12,7±0,40*	65,2±1,08*	28,5
		28	16,5±0,72*	54,8±1,98*	
		19	26,0±1,52*	28,7±4,17*	
4.	Клопидогрел	32	2,4±0,50*	93,4±1,38*	13,8
		16	9,6±0,35*	73,7±0,98*	
		8	33,2±0,53*	9,1±1,47*	

Примечания: n-число животных в группе

\* изменения достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни p<0,02)

Таким образом, на основании выполненных исследований соединение РУ-1144 было выбрано для более углубленного изучения на различных моделях экспериментальной патологии и механизма антиагрегантного действия.

В связи с этим данное вещество было исследовано на предмет величины острой токсичности ( $LD_{50}$ ).

### **3.3. Острая токсичность соединения РУ-1144.**

Острая токсичность соединения РУ-1144 исследовалась в дозах - 18,8; 100; 300; 600; 800 и 1000. Было установлено, что введение тестируемого соединения в дозах 18,8; 100; 300; 600 мг/кг не вызывало гибели мышей-самцов. Общее состояние животных было в норме, изменений в поведенческом статусе не наблюдалось. При увеличении дозы до 800 мг/кг реакция на звуковые и тактильные раздражители сохранялась, но при этом состояние животных было несколько заторможенным. В данной дозе через 10-15 минут после введения тестируемого образца наблюдалась гибель 40% животных. При визуальном осмотре внутренних органов погибших мышей установлено, что их анатомический рисунок сохранен. Органы брюшной полости, головной мозг без изменений. Легкие красноватого цвета с участками диапедезного кровоизлияния во всех долях. Печень полнокровна. Слизистая желудка без изменений. По прошествии первых суток общий процент летальности особей составил 75%, в последующие сутки вплоть до 14-х гибели животных не наблюдалось.

Дальнейшее увеличение вводимой дозы до 1000 мг/кг приводило к появлению более выраженных токсических эффектов. При этом наблюдалась заторможенность, снижение реакции на звуковые и тактильные раздражители, тонические судороги и гибель 60% животных через 7-10 минут после введения вещества. Через 24 часа с момента введения соединения в дозе 1000 мг/кг наблюдалась 100 %-ная гибель особей.

При макроскопическом исследовании внутренних органов было отмечено, что анатомический рисунок органов сохранен. Органы брюшной полости были без изменения. Головной мозг имел свето-розовый цвет и признаки полнокровия сосудов. Легкие были темно-красного цвета со множественными

кровоизлияниями во всех долях. Печень без изменения. Визуальных изменений со стороны желудка не наблюдалось.

При 14-ти дневном наблюдении за выжившими мышами после введения тестируемого образца под шифром РУ-1144 видимых изменений в поведении не отмечалось, животные реагировали на звуковые и тактильные раздражители. Отдаленной гибели не наблюдалось.

На рисунке 3.1 представлена зависимость количества погибших мышей (%) от логарифма дозы РУ-1144 через 2 недели после однократного внутрибрюшинного введения.

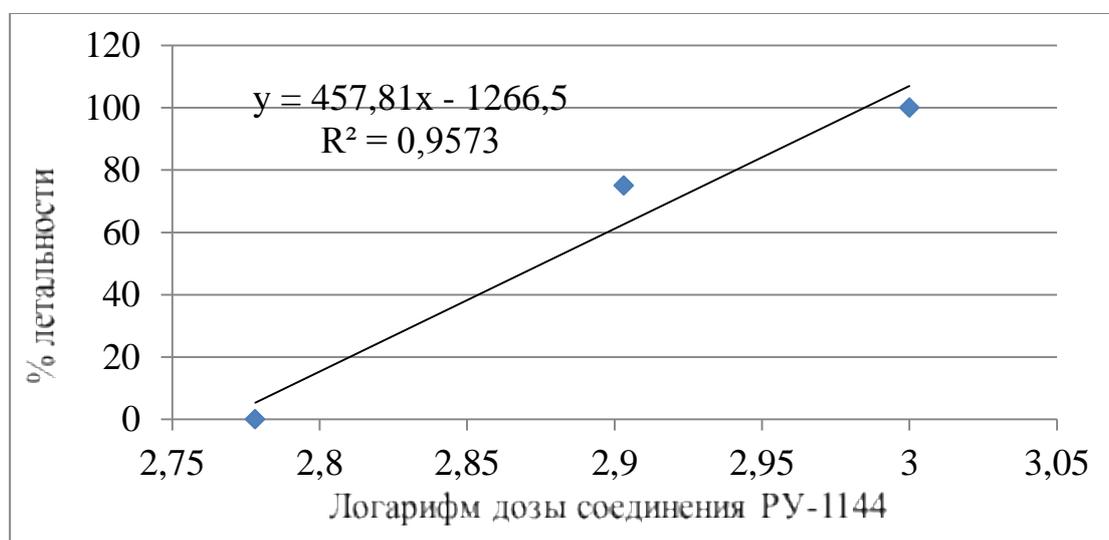


Рисунок 3.1. Гибель мышей самцов через 14 суток после однократного внутрибрюшинного введения соединения РУ-1144.

Значение  $LD_{50}$  для тестируемого образца под шифром РУ-1144 составила 749,2 мг/кг. Согласно классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 и, исходя из величины острой токсичности, полученной при внутрибрюшинном пути введения тестируемого соединения его можно отнести к 4 классу умеренно-токсичных веществ [Саноцкий И.В., 1975; Березовская И.В., 2003].

Наличие данных исследований *in vitro* и показателя острой суточной токсичности, позволили в дальнейшем рассчитать широту терапевтического действия (условный терапевтический индекс (УТИ)) (табл. 3.7). Исследуемое

соединение под лабораторным шифром РУ-1144 по значению УТИ превосходило ацетилсалициловую кислоту в 3,7 раза.

**Таблица 3.7 Антиагрегантная активность ( $IC_{50}$ ), величина острой суточной токсичности ( $LD_{50}$ ), и условный терапевтический индекс (УТИ) РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты.**

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

### 3.4. Зависимость антиагрегантной активности от химической структуры соединений.

Исследованные соединения являются конъюгатами 2,6-ди-*трет*-бутилфенола и конденсированного гетероциклического ядра. Структура последнего позволяет выделить 6 скаффолдов: *1H*-бензимидазолы и соли *1H*-бензимидазолия-3, *N9*-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, 3,5-дигидротриазинобензимидазолы, 2,3,4,10-тетрагидропиримидобензимидазолы, 2,3-дигидротиадиазинобензимидазолы и *4H*-триазоло-бензимидазолы.

Наибольший уровень активности характерен для производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидобензимидазола. Все 5 соединений данной группы в концентрации 100 мкМ блокировали агрегацию тромбоцитов более, чем на 70% и превосходили препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. Наиболее активными из всех исследованных являются соединения этого класса РУ-873 и РУ-1144 - гидрохлориды. Гидробромид РУ-871 и сукцинат РУ-1249 на 10% менее активны. Введение метильных заместителей в молекулу гидробромида 7,8-диметил-2,3,4,10-тетрагидропиримидобензимидазола РУ-903 приводит к потере 20% активности. Гидрохлорид 2,3-дигидроимидазобензимидазола РУ-1180, являющийся ближайшим гомологом соединения-лидера РУ-1144, также обладает достаточно высокой активностью (67,7%).

Кроме того, высокая активность (65,9-86,19% в отношении подавления АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов) отмечена для соединений группы

*1H*-бензимидазолиевых солей, особенно являющихся дигидробромидами (РУП-4Б, РУП-5Б, РУП-6Б, РУП-7Б) и гидрохлоридами, содержащими в положении *N*<sup>1</sup> пропильный (РУ-1261) или пропенильный (РУ-1262) радикал. Остальные гидробромиды *1H*-бензимидазолия проявили существенно меньшую активность или были практически неактивны (РУЧ-2, РУ-1260). Другие заместители (алкильные, бензильный, аминогруппа) встречаются как в кластере активных, так и неактивных соединений. Ограниченное число доступных для исследования производных не позволяет сделать окончательный вывод о вкладе каждого из них в уровень антиагрегантной активности, и, по-видимому, свидетельствует о наличии неаддитивных взаимодействий между радикалами.

Единственное производное 2,3-дигидротриадиазинобензимидазола РУС-193, где экранированный фенольный заместитель находится во втором положении, проявило выраженную антиагрегантную активность (84,3%).

Наименее активными (подавление агрегации тромбоцитов на 40% и менее в концентрации 100 мкМ) является производное *1H*-бензимидазола, содержащие фенольный заместитель в положении *N1*, и производные 3,5-дигидротриазинобензимидазола РУС-190 и РУС-191 *4H*-триазолобензимидазол РУС-198. Можно сделать вывод, что повышенная электронная плотность в 3 кольце конденсированной гетероциклической системы является неблагоприятным фактором.

Таким образом, наибольшее количество высокоактивных соединений относится к группе производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидобензимидазола и *1H*-бензимидазолиевых солей, представители остальных скаффолдов не проявили выраженной активности. Исключением является активный 2,3-дигидротриадиазинобензимидазол РУС-193, который в силу планарной структуры сильно отличается от остальных исследованных производных.

Группа веществ, производных *1H*-бензимидазолов самая большая по количеству представителей и большая часть из них проявила выраженную антитромбоцитарную активность. Большинство представителей данной группы имели в своей структуре солевой остаток, представленный гидробромидом.

Однако более высокую активность проявили соединения, имеющие в структуре дигидробромиды. Тестируемые образцы данной группы, у которых экранированный фенольный заместитель находился в первом положении, не проявили выраженной активности и уступали препарату сравнения. Соединение 1-метил-2-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он-3-амин, у которого экранированный фенольный заместитель был во втором положении, а в положении 1 и 3 были метильный и амино- заместители, также не оказало выраженного влияния на его антиагрегантную активность. Наиболее активными оказались представители, которые объединены тем, что во втором положении находится 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он. Активность данных соединений в тесте АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов была наиболее высокой относительно остальных представителей. Введение метильного производного в положение 3 и *N*-этилпиперидина или *N,N*-диэтиламиноэтила в 1-е, приводило к резкому повышению данного вида активности. Бензил, находящийся в 3-ем положении, также увеличивал активность соединений. Остальные представители данной группы проявили низкую антиагрегантную активность. Так включение в структуру бензила в положение 3 и 4-этилморфолина в положение 1 снижало активность. Единственное производное бензимидазола, у которого экранированный фенольный заместитель находился в 3-ем положении, а в положении 1 и 2 у данного соединения находились метил и амин, также не проявил выраженной антиагрегантной активности. Кроме того, включение в структуру соединений в первое положение бензила и пропенила-1 не приводило к повышению антиагрегантной активности.

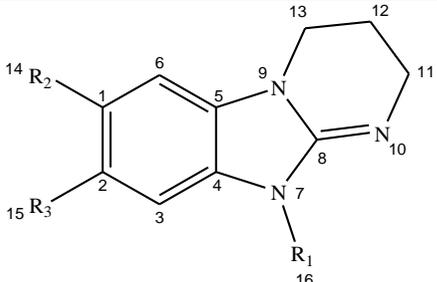
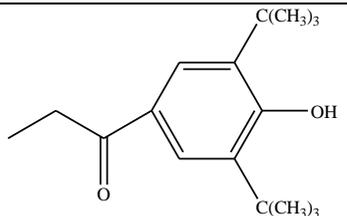
Следующая группа соединений, представленных общей структурой-триазинобензимидазолов, где в первом положении находился экранированный фенольный заместитель, а во втором метила или остаток пропановой кислоты не отличаются высокими антиагрегантными свойствами.

Последние две группы веществ, где основными структурами были *N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы и триазолобензимидазолы, а в первом положении каждого производного был экранированный фенольный заместитель,

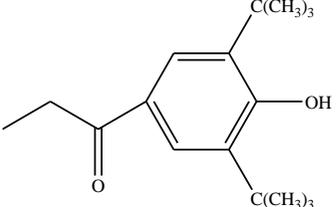
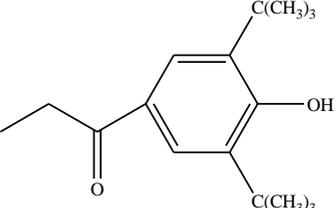
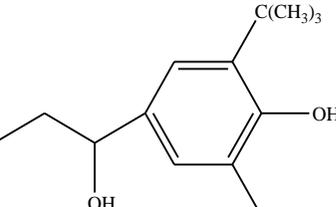
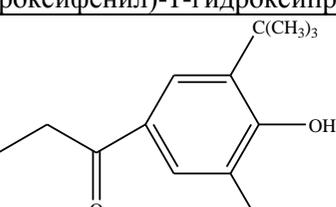
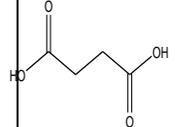
представленный 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-оном, проявили очень низкую антиагрегантную активность. Однако соединение, являющееся производным N9-2,3-дигидроимидазобензимидазола, имеющее в первом положении 2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксипропил)-фенил и солевой остаток в виде гидрохлорида проявило выраженную активность по отношению к ингибированию АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (табл.3.8).

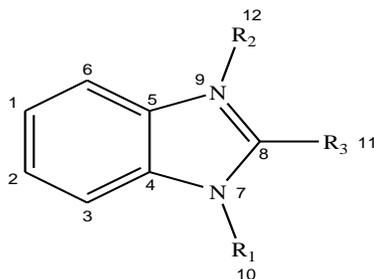
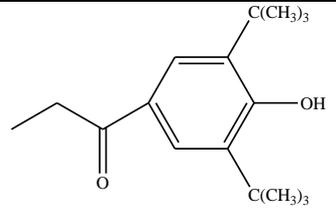
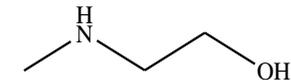
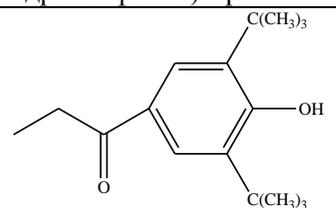
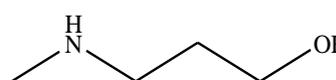
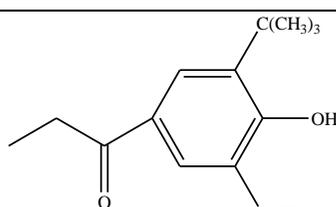
Таким образом, в ходе проведенного анализа зависимости антиагрегантной активности от химической структуры различных групп производных бензимидазола было установлено, что высокий уровень активности обуславливает наличие экранированного фенольного заместителя представленного 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-оном в первом или втором положении или 2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксипропил)-фенилом в положении 1. Также большая активность характерна для солевых форм: гидрохлоридов и (ди)гидробромидов.

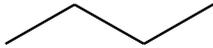
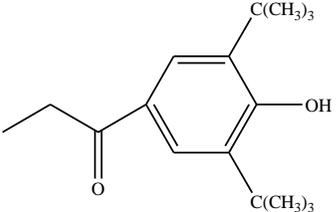
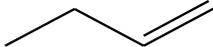
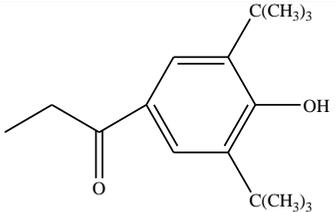
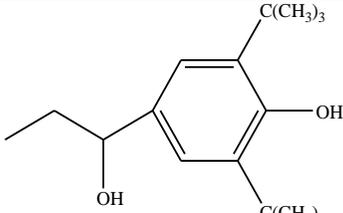
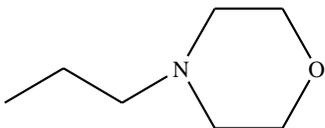
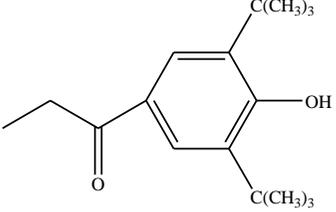
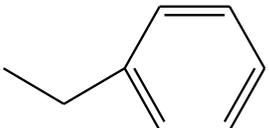
Таблица 3.8 Зависимость антиагрегантной активности от химического строения производных бензимидазола

№ п/п	Соединение	Заместитель			Солевой остаток	Молекулярный вес	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов в концентрации 100 мкМ (M±m)
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			
		 <p style="text-align: center;">Пиримидобензимидазолы</p>					
1.	РУ-871	 <p style="text-align: center;">1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	Н	Н	НВr	419,56	82,0

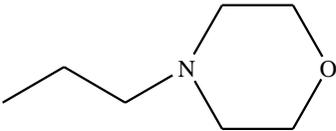
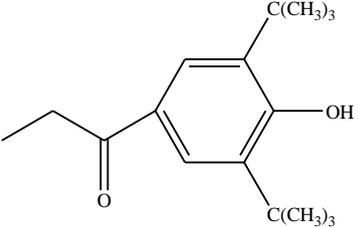
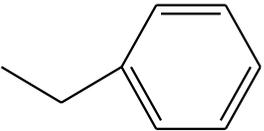
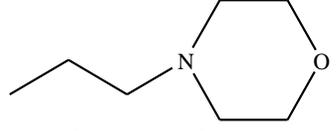
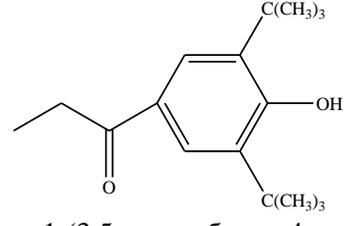
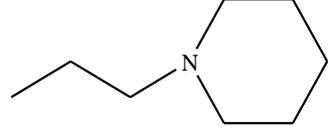
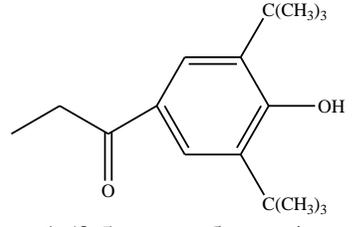
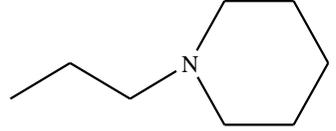
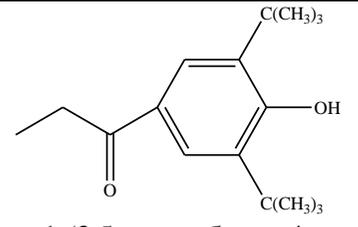
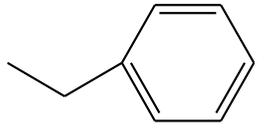
Продолжение таблицы 3.8.

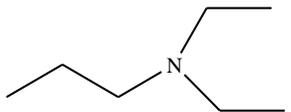
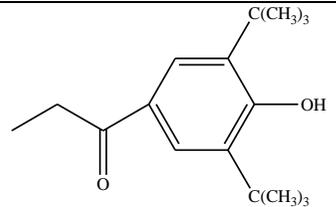
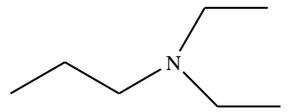
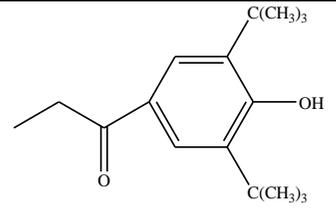
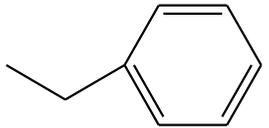
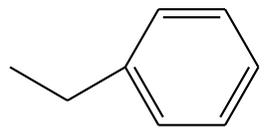
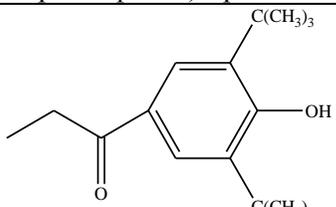
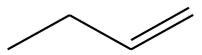
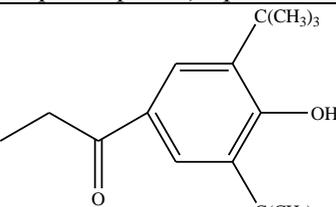
2.	РУ-873	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	Н	Н	НСl	419,56	91,9
3.	РУ-903	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	СН <sub>3</sub> метил	СН <sub>3</sub> метил	НВr	447,61	69,9
4.	РУ-1144	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил</p>	Н	Н	НСl	458,14	91,9
5.	РУ-1249	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	Н	Н	 Янтарная кислота	537,28	77,7

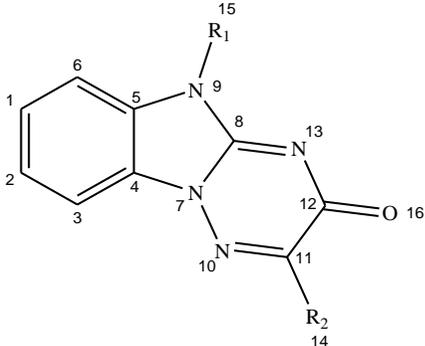
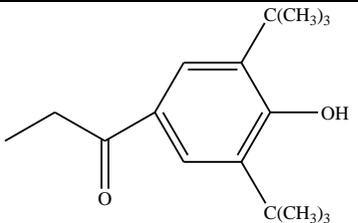
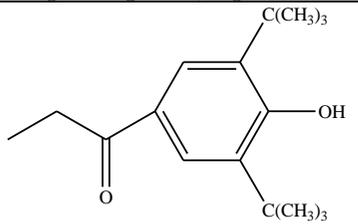
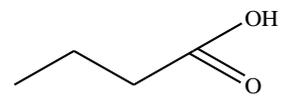
		 <i>1H</i> -бензимидазолы					
6.	РУ-1250	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	-	 2-аминоэтанол	НВr	503,18	36,4
7.	РУ-1251	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	-	 3-аминопропанол	НВr	517,19	13,7
8.	РУ-1260	СН <sub>3</sub> метил	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	NH <sub>2</sub> амин	НВr	474,44	19,4

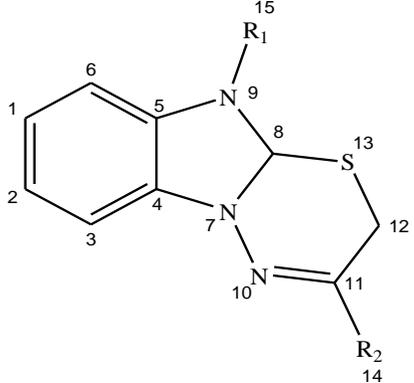
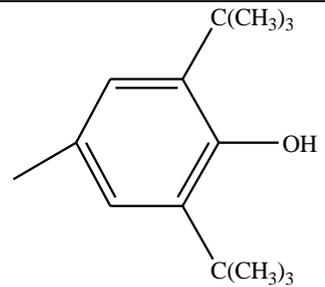
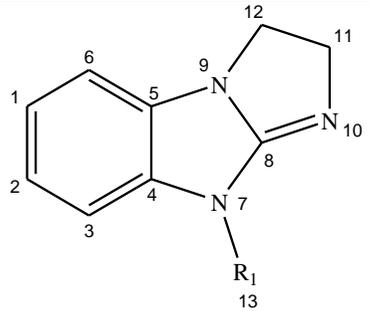
9.	РУ-1261	 пропил	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	$\text{NH}_2$ амин	HBr	502,49	80,0
10.	РУ-1263	 пропен-1	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	$\text{NH}_2$ амин	HBr	500,48	86,5
11.	РУ-1265	$\text{CH}_3$ метил	$\text{NH}_2$ амин	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил	HBr	476,46	27,9
12.	РУП-2	 4-этилморфолин	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	 этилбензен	HBr	568,76	27,3

Продолжение таблицы 3.8.

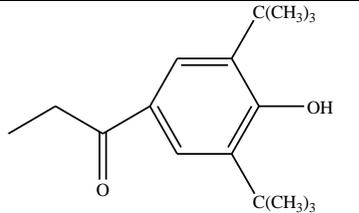
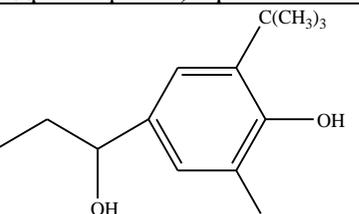
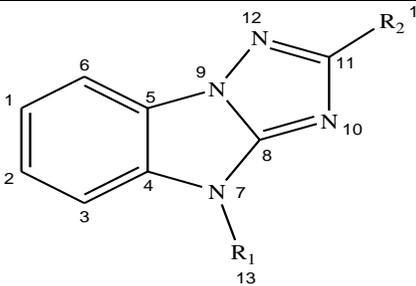
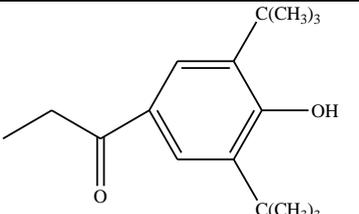
13.	РУП-2Б	 4-этилморфолин	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	 этилбензен	2HBr	649,76	35,0
14.	РУП-3Б	 4-этилморфолин	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	$\text{CH}_3$ метил	2HBr	492,67	45,2
15.	РУП-4Б	 N-этилпиперидин	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	$\text{CH}_3$ метил	2HBr	490,70	86,1
16.	РУП-5Б	 N-этилпиперидин	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	 этилбензен	2HBr	566,79	65,9

17.	РУП-6Б	 N,N-диэтиламиноэтил	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	$\text{CH}_3$ метил	2HBr	478,68	69,8
18.	РУП-7Б	 N,N-диэтиламиноэтил	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	 этилбензен	2HBr	554,78	84,4
19.	РУЧ-2	 этилбензен	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	-	HBr	536,60	3,7
20.	РУЧ-6	 пропен-1	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	-	HBr	486,6	26,0

		 Триазинобензимидазолы				
21.	РУС-190	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	СН <sub>3</sub> метил	-	446,54	34,1
22.	РУС-191	 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он	 остаток пропановой кислоты	-	504,57	40,5

			 <p>2,3-тиазинобензимидазолы</p>			
РУС-193	CH <sub>3</sub> метил	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил</p>	-	408,58	84,3	
		 <p>N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы</p>				

Окончание таблицы 3.8.

24.	РУ-887	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	-	-	HBr	485,17	12,8
	РУ-1180	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил</p>	-	-	HCl	444,02	67,7
 <p>Триазолобензимидазолы</p>							
26.	РУС-198	 <p>1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он</p>	CH <sub>3</sub> метил	-	-	418,53	9,1

### 3.5. Заключение.

В результате проведенного экспериментального изучения 26 новых производных бензимидазола *in vitro*, было выявлено 13 соединений, проявляющих высокую антиагрегантную активность и рассчитана их  $EC_{50}$ . Из данных веществ было выделено 3 наиболее высокоактивных соединения под шифром РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263, превосходящих препарат сравнения по  $EC_{50}$  в 21,8; 20,3 и 22,6 раз соответственно. В связи с этим было изучено их дозозависимое действие с определением  $ED_{50}$ . Так, было выявлено, что наименьший показатель  $ED_{50}$  был у соединения под шифром РУ-1144, составивший 18,8 мг/кг, которое и было выбрано в качестве соединения лидера. Соединение РУ-1144 по параметру острой токсичности ( $LD_{50}$ ) обладает меньшей токсичностью, чем препарат сравнения ацетилсалициловая кислота.

Для изучения условной широты терапевтического действия учитывался терапевтический индекс (отношение  $LD_{50}$  к  $ED_{50}$ ), которое у соединения лидера составило 39,9.

В связи с наличием у данного соединения высокой способности подавлять процессы агрегации тромбоцитов *in vivo* представилось целесообразным изучить данный вид действия на различных моделях артериальных тромбозов.

#### **ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1144 НА ТРОМБООБРАЗОВАНИЕ У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ.**

Тромбозы и их осложнения в настоящее время остаются важнейшей причиной смертности в развитых странах. Тромбы формируются при высокой скорости кровотока, при повреждении сосудистой стенки и состоят в основном из скоплений тромбоцитов, связанных между собой нитями фибрина (белые тромбы) [Phillip Owens III A., 2014]. Именно поэтому, для изучения специфической фармакологической активности потенциального антиагрегантного средства необходимо исследовать антитромботическое действие с использованием различных моделей сосудистых тромбозов у интактных животных, а также животных с экспериментальной патологией.

Ключевыми факторами артериальных тромбозов являются тромбоциты, в связи с этим исследования проводят на тромбоцит-зависимых моделях тромбозов, а именно: индуцированном аппликацией 50% хлорида железа (III) и электрическим током на сонную артерию крыс, системном адреналин-коллагеновом тромбозе на мышах.

Также наиболее часто основной мишенью патологического тромбообразования оказывается нижняя полая вена, так как она является наиболее крупным сосудом в организме и играет главную роль в кровоснабжении правого предсердия [Thachil J., 2014; Di Nisio M, 2016]. Поэтому исследование антитромботической активности новых соединений проводится на модели венозного тромбоза у крыс.

Хорошо известно, что антиагрегантная терапия очень часто осложняется кровотечением [Lewis S.R., 2018; Vidula M.K., 2018]. Следовательно, есть необходимость изучать влияние нового потенциального антиагрегантного средства на показатель времени кровотечения.

#### **4.1. Изучение антитромботической активности соединения РУ-1144 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс.**

Данные эксперименты были выполнены на 66 нелинейных крысах самцах массой 250-300 г. В эксперимент было включено 4 группы, 3 опытные и одна контрольная группа животных.

Показатель времени образования тромба, вызванного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс в контрольной группе животных, которым вводился растворитель составил 19,4 мин.

Соединение РУ-1144 в дозе 48 мг/кг (доза, эквимольная 19 мг/кг препарату сравнения ацетилсалициловой кислоте (согласно методу)) пролонгировало время наступления полной окклюзии сосуда до 31,4 мин, что на 61,1% ( $p < 0,05$ ) было выше относительно значений, полученных в контрольной группе. Далее, с целью расчета показателя  $ED_{50}$ , тестируемый образец РУ-1144 был исследован в убывающих дозах. Так, в дозах 24 и 12 мг/кг происходило статистически достоверное увеличение времени окклюзии сонной артерии до 27,0 и 22,3 мин соответственно. Показатель  $ED_{50}$  соединения РУ-1144 при этом составил 37,8 мг/кг (табл. 4.1.).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 19 мг/кг увеличивала время окклюзии на 20,8 % ( $p < 0,05$ ). При дальнейшем увеличении дозы до 100 и 150 мг/кг время образования тромба пролонгировалось на 29,5 ( $p < 0,05$ ) и 58,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.  $ED_{50}$  ацетилсалициловой кислоты составила 133 мг/кг (табл. 4.1.).

Препарат сравнения клопидогрел в дозе 32 мг/кг увеличивал время образования тромба в сонной артерии крыс на 9,0 % ( $p < 0,05$ ). В дозе до 60 мг/кг данный показатель повышался на 21,8 ( $p < 0,05$ ). При дальнейшем увеличении дозы до 120 и 180 мг/кг время наступления полной окклюзии сосуда увеличивалось на 34,6 ( $p < 0,05$ ) и 65,4 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Значение  $ED_{50}$  для клопидогрела при этом составило 132,0 мг/кг (табл. 4.1.).

**Таблица 4.1. Влияние соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа (III) ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	$\Delta\%$ пролонгирования времени образования тромба	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Контроль		19,4±1,5		
2.	РУ-1144	12	22,3±0,7*	14,1±3,6*	37,8
		24	27,0±0,6*	38,5±2,8*	
		48	31,4±1,0*	61,1±5,4*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	19	20,8±0,3*	6,4±1,6*	133,0
		100	25,3±0,5*	29,5±2,5*	
		150	30,9±0,3*	58,5±1,4*	
4.	Клопидогрел	32	21,3±0,3*	9,0±1,3*	132,0
		60	23,8±0,3*	21,8±1,6*	
		120	25,8±0,4*	34,6±1,3*	
		180	32,3±0,4*	65,4±2,2*	

Примечания:

n-число животных в группе

\*изменения достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ )

Таким образом, на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III), тестируемый образец РУ-1144 продемонстрировал выраженную антитромботическую активность и превзошел по показателю ED<sub>50</sub> препараты сравнения, использованные в исследовании.

#### **4.2. Исследование антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.**

Изучение антитромботической активности тестируемых образцов выполнено на 72 беспородных крысах самцах массой 250-300 г. В контрольной группе животных, которым вводился растворитель время образования тромба при наложении электродов с анодным током на сонную артерию составило 15,2 мин. Соединение РУ-1144 в дозе 48 мг/кг достоверно увеличивало время образования тромба на 98,5 % ( $p < 0,05$ ). При выполнении дальнейших исследований дозы тестируемого соединения были уменьшены. Так в дозах 24, 12 и 6 мг/кг,

соединение РУ-1144 пролонгировало время образования тромба на 74,3; 54,0 и 33,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом показатель  $ED_{50}$  соединения РУ-1144 составил 7,9 мг/кг (табл. 4.2.).

Ацетилсалициловая кислота была изучена в дозе 19 мг/кг, в которой происходило достоверное увеличение времени окклюзии сонной артерии на 40,8 % ( $p < 0,05$ ). Далее, в дозах 25, 50 и 100 мг/кг препарат сравнения достоверно увеличивал время образования тромба в сонной артерии на 66,1 ( $p < 0,05$ ), 98,5 ( $p < 0,05$ ) и 145,1% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Значение показателя  $ED_{50}$  антитромботической активности препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты при этом составило 16,8 мг/кг (табл. 4.2.).

Препарат сравнения клопидогрел в дозе 32 мг/кг статистически значимо увеличивал время окклюзии сонной артерии на 33,7%. При дальнейшем повышении дозы до 60 и 120 мг/кг препарат сравнения увеличивал данный показатель на 56,3 ( $p < 0,05$ ) и 129,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом, эффективная доза  $ED_{50}$  для клопидогрела составила 49,6 мг/кг (табл. 4.2.).

Данное исследование позволяет сделать выводы о том, что соединение РУ-1144 обладает выраженной антитромботической активностью на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией электрического тока. При сравнительном анализе антитромботической активности тестируемого образца РУ-1144 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела оказалось, что относительно значения  $ED_{50}$  соединение РУ-1144 превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,5 и 7,4 раза соответственно (рис. 4.1.).

**Таблица 4.2. Влияние соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	$\Delta\%$ пролонгирования времени образования тромба	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Контроль		15,2±0,5		
2.	РУ-1144	6	20,3±0,5*	33,2±3,5*	6,7
		12	23,4±0,2*	54,0±1,6*	
		24	26,5±0,2*	74,3±1,4*	
		48	30,2±0,2*	98,5±1,4*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	19	21,4±0,2*	40,8±1,5*	16,8
		25	25,3±0,2*	66,1±0,2*	
		50	30,2±0,3*	98,5±2,0*	
		100	37,3±0,3*	145,1±1,9*	
4.	Клопидогрел	32	20,3±0,5*	33,7±3,6*	49,6
		60	23,8±0,3*	56,3±2,0*	
		120	34,8±0,6*	129,2±4,0*	

Примечания:

n-число животных в группе

\*изменения достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ )

### 4.3. Изучение антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели Global Thrombosis Test (по Горогу).

Данная модель тромбоза была использована с целью оценки антитромботического и тромболитического действия соединения РУ-1144. Эксперимент проводился на 12 белых беспородных крысах самцах при однократном внутрижелудочном введении с дальнейшим исследованием биологического материала *in vivo*.

В качестве параметра для оценки антитромботической активности использовали время наступления полной окклюзии, а для оценки тромболитической активности - время лизиса в тест-системе (в индивидуальной пробирке по методу Горога).

В группе контроля среднее время окклюзии составило 95,2 с. Соединение под шифром РУ-1144 имело тенденцию к статистически достоверному

увеличению времени окклюзии до 130,5 с (табл. 4.3.). При этом показатель времени лизиса под действием соединения РУ-1144 был сравним с контролем и составил 711,2 с. (табл. 4.3.).

**Таблица 4.3. Антитромботическая активность соединения РУ-1144 на модели Global Thrombosis Test (по Горогу) в дозе ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время окклюзии, с	Время лизиса, с
1.	Контроль	-	95,2±1,4	635,2±29,0
2.	РУ-1144	18,8	130,5±7,8*	711,2±39,4

Примечания:

n-число животных в группе

\*-изменения достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

Следовательно, исследования, выполненные на данной модели тромбоза, подтверждают, что соединение РУ-1144 проявляет антитромботическое действие, но не вызывает лизис образовавшегося тромба.

#### **4.4. Исследование влияния соединения РУ-1144 на выживаемость мышей на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза.**

Экспериментальное изучение антитромбогенных свойств соединений при использовании данной модели тромбоза было проведено на 40 белых беспородных мышах самцах. Из литературных источников известно, что при введении смеси коллагена и адреналина в хвостовую вену мышей в контрольной группе животных наблюдается 95-100% гибель животных [Kim J.H., 2016].

При выполнении исследования было установлено, что в группе контрольных животных наблюдалась гибель 90% мышей. При этом после введения тромбообразующей смеси у животных наблюдалась выраженная асфиксия, характер дыхания был поверхностный, учащенный. Кроме этого, наблюдались тонические судороги, выраженный экзофтальм и парез задних конечностей. Через 1-3 минуты после внутривенного введения тромботической смеси животные погибали от удушья.

При однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-1144 в дозе 18,8 мг/кг наблюдалась гибель 2 животных. При этом смерть мышей наступала

только спустя 10-15 минут (табл. 4.4.). У всех погибших особей были выявлены признаки асфиксии, которые проявлялись по сравнению с контрольной группой в значительно меньшей степени. Количество выживших животных опытной группы составило 80%. В течение 5-10 минут после введения смеси у выживших мышей наблюдалось учащенное дыхание, которое вскоре полностью восстанавливалось.

В опытной группе животных, получавших препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, процент выживших животных, составил 60, а в группе мышей, получавших клопидогрел - 50 (табл. 4.4.).

**Таблица 4.4. Влияние соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo*, на выживаемость белых беспородных мышей на модели коллаген (0,5 мг/кг) - адреналинового (0,06 мг/кг) тромбоза (M±m)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Число животных	Число погибших животных	Число выживших животных в %
1.	Контроль		10	9	10
2.	РУ-1144	18,8	10	2	80*
3.	Ацетилсалициловая кислота	28,5	10	4	60*
4.	Клопидогрел	13,8	10	5	50*

Примечания:

\*изменения достоверны по отношению к контролю (точный критерий Фишера,  $p \leq 0,01$ )

Таким образом, при исследовании критерия выживаемости соединение РУ-1144 в 1,3 раза превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, а также в 1,6 раза превосходит препарат сравнения клопидогрел.

При проведении макроскопического исследования внутренних органов всех групп животных, принимавших участие в эксперименте, тромбы были обнаружены только в легких животных, в то время как в остальных органах тромбов не наблюдалось, что соответствует данным, полученным другими исследователями [Di Minno G., 1983].

Был выполнен морфометрический анализ срезов легких мышей с целью исследования тромбов в сосудах, а также произведен расчет их площади и периметра.

В контрольной группе исследования в тканях легких преобладали альвеолы средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, прикрепленные к сосудистой стенке и полностью перекрывающие просвет сосуда. В некоторых артериолах обнаруживались смешанные тромбы (рис. 4.1.).

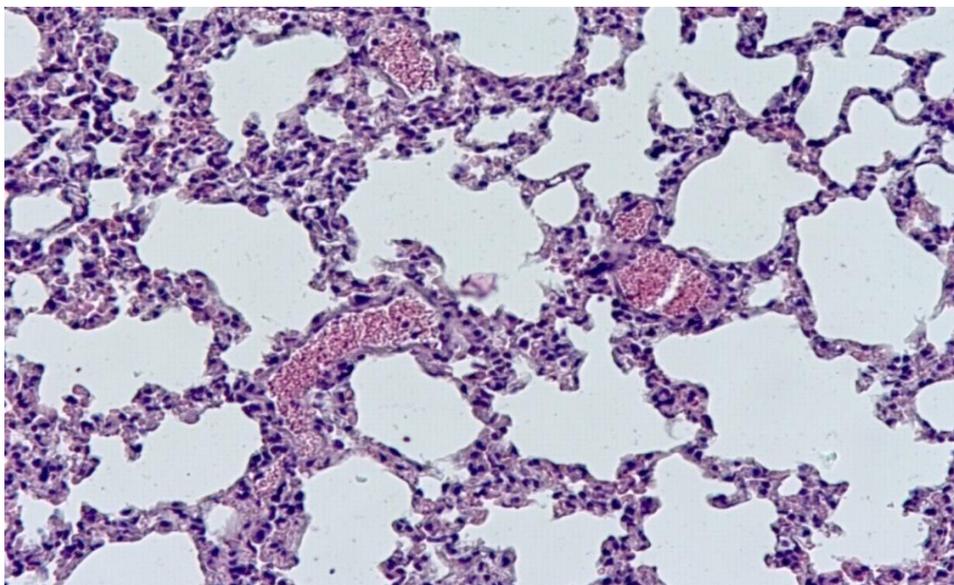


Рис. 4.1. Гистологический срез легкого животного контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Об. X 10.

Отмечалось выраженное расширение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия и отека, обнаружены также явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в просвет некоторых альвеол, явления стаза и очаговые мелкие кровоизлияния. Выявлялась слабо выраженная лимфоидная инфильтрация в периваскулярных отделах и в стенках мелких бронхов. Также в контрольных образцах наблюдалось большое количество тромбов в просветах сосудов. При проведении морфометрического исследования срезов легких выявлено, что относительная площадь тромбов на препаратах легкого составила  $4,15 \pm 1,12\%$ , а средняя площадь тромба на срезах составила  $9858,41 \pm 2261,26 \text{ мкм}^2$  (табл. 4.1.).

При исследовании срезов легких опытной группы животных, получавших соединение РУ-1144, наблюдалось значительно меньшее количество тромбов или их отсутствие. Выявлялись единичные тромбы в венах, адгезированные к

сосудистой стенке. Кровоизлияния отсутствовали (рис.4.2.). Расширение межальвеолярных перегородок не отмечалось ввиду отсутствия пропотевания компонентов крови в межальвеолярное пространство. Относительная площадь тромбов на срезах легкого составила  $1,51 \pm 0,42\%$ , т.е. снижалась на  $2,64\%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, а средняя площадь тромба на срезах составила  $3590,17 \pm 1097,21$  мкм<sup>2</sup>, т.е. была ниже на  $63,58\%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

На основании проведенных исследований можно заключить, что изменения морфометрических параметров соответствуют качественным структурным изменениям в легочных сосудах, которые могут свидетельствовать о выраженных антитромботических свойствах тестируемого образца РУ-1144.

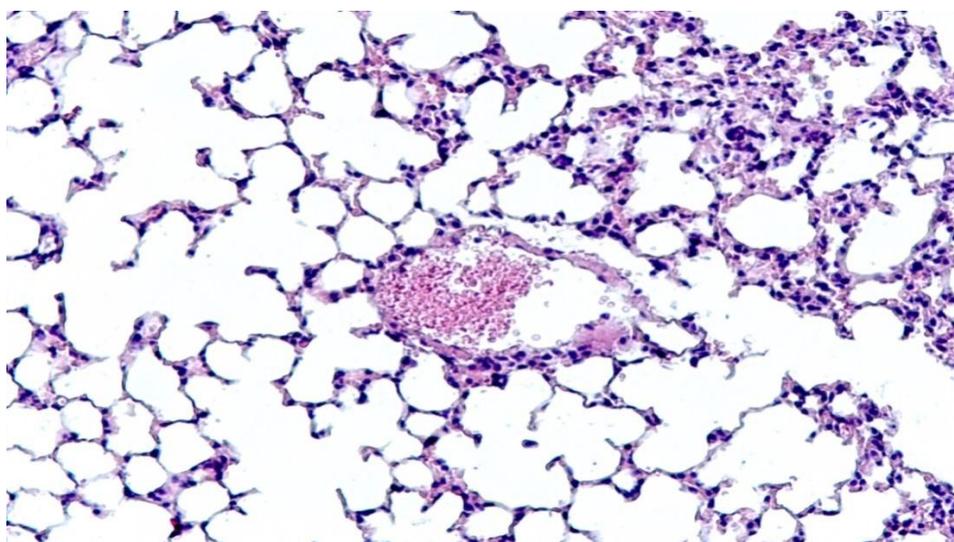


Рис. 4.2. Гистологический срез легкого животного, получавшего соединение РУ-1144  
Окраска гематоксилином и эозином. Об. х 10.

У животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, наряду с альвеолами средних размеров, встречались эмфизематозно-расширенные альвеолы и альвеолы меньших размеров. 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 (рис.4.3.).

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, выявлено, что относительная площадь тромбов на срезах легкого составила  $1,83 \pm 0,58\%$ , т.е. была ниже на 2,32% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, а средняя площадь тромба на срезах составила  $4372,69 \pm 1237,61$  мкм<sup>2</sup>, т.е. снижалась на 55,65% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 4.5.).

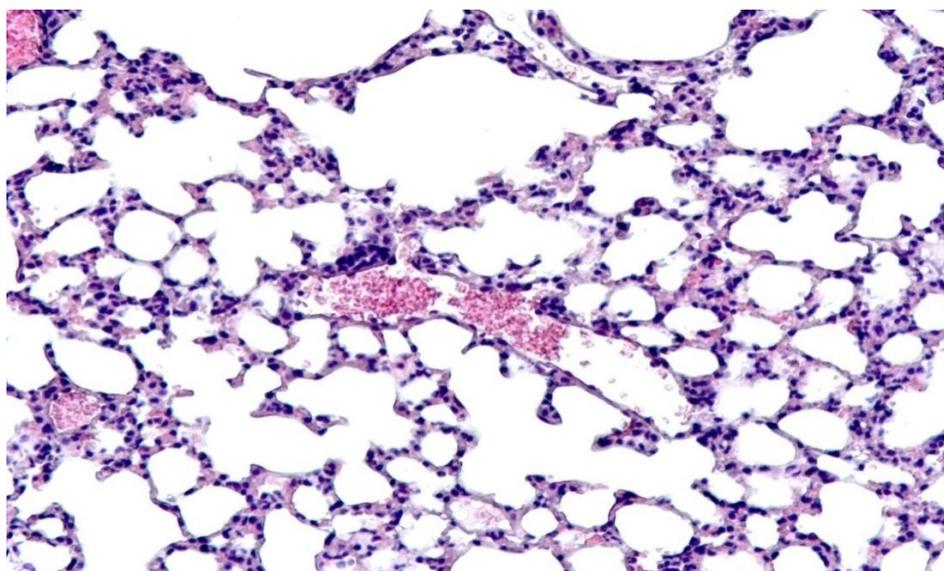


Рис. 4.3. Гистологический срез легкого животного, получавшего ацетилсалициловую кислоту  
Окраска гематоксилином и эозином. Об. x 10.

При исследовании препарата сравнения клопидогрела, у лабораторных животных отмечалось разнообразное по выраженности нарушение кровообращения. Наиболее часто в поле зрения были выявлены небольшие единичные тромбы в венах, как правило, адгезированные к сосудистой стенке (рис. 4.4.). Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия сосудов. Наблюдались мелкоочаговые кровоизлияния в стенку капилляров, просвет альвеол и в интерстиции перибронхиальных отделов.

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших клопидогрел, выявлено, что относительная площадь тромбов на срезах легкого составила  $1,98 \pm 0,67\%$ , т.е. снижалась на 2,17% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, а средняя площадь тромба на срезах составила

4768,83±1479,71 мкм<sup>2</sup>, т.е. была ниже на 51,63%(p<0,05) по сравнению с контролем.

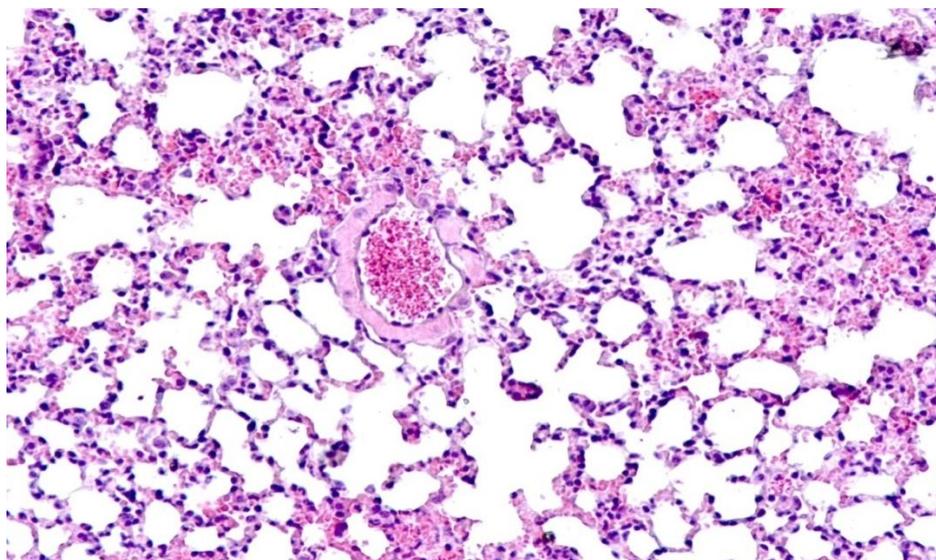


Рис. 4.4. Гистологический срез легкого животного, получавшего клопидогрел  
Окраска гематоксилином и эозином. Об. х 10.

**Таблица 4.5. Влияние соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности, на изменение некоторых морфометрических параметров тромбов в сосудах легких мышей (M±m, n=10)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Средняя площадь тромбов, мкм <sup>2</sup>	Относительная площадь тромбов, %
1.	Контроль	-	9858,41±2261,26	4,15±1,12
2.	РУ-1144	18,8	3590,17±1097,21*	1,51±0,42*
3.	Ацетилсалициловая кислота	28,5	4372,69±1237,61*	1,83±0,58*
4.	Клопидогрел	13,8	4768,83±1479,71*	1,98±0,67*

Примечание:

n-число животных в группе

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

Таким образом, выявленные изменения морфометрических параметров в целом соответствуют качественным структурным изменениям в сосудах легких, что свидетельствуют о более выраженной антитромботической активности соединения РУ-1144 по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и

клопидогрелом на модели адреналин-коллагенового артериального тромбоза у мышей.

Относительно полученных морфометрических показателей исследуемое соединение РУ-1144 превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения. При изучении такого показателя как средняя площадь тромбов, на гистологических срезах легких мышей тестируемый образец РУ-1144 превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,2 и 1,3 раза соответственно. При сравнении соединения-лидера с препаратами сравнения по такому показателю, как относительная площадь тромбов, было выяснено, что соединение РУ-1144 превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,2 и 1,3 раза соответственно.

#### **4.5. Определение антитромботического действия соединения РУ-1144 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс с экспериментальным инфарктом миокарда.**

Одним из серьезных осложнений сердечно-сосудистой патологии является острый коронарный синдром. Следовательно, вопрос профилактики этой патологии - один из важнейших в современной медицине. Поэтому исследование антитромботической активности на модели экспериментального инфаркта миокарда является актуальным.

В контрольной группе животных с моделированным некоронарогенным инфарктом миокарда, тромб в сонной артерии образовывался уже через 13,4 мин, что на 6 минут раньше, чем в группе животных без экспериментальной патологии. Данный факт указывает на повышение тромбогенного потенциала крови в условиях некоронарогенного инфаркта миокарда.

При однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-1144 крысам с экспериментальным инфарктом миокарда показатель времени образования тромба составил 19,8 мин, что на 47,7 % больше по сравнению с контрольной группой животных с инфарктом миокарда (табл. 4.7.).

**Таблица 4.7. Антитромботическая активность соединения РУ-1144 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50% р-ром хлорида железа (III) в условиях некоронарогенного инфаркта миокарда ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	$\Delta\%$ пролонгирования времени образования тромба
1.	Контроль (интактные животные)		19,4 $\pm$ 1,5	
2.	Контроль (животные с экспериментальным инфарктом миокарда)		13,4 $\pm$ 0,9*	-44,8 $\pm$ 1,5*
3.	Животные с экспериментальным инфарктом миокарда+ РУ-1144	18,8	19,8 $\pm$ 0,3*	47,7 $\pm$ 2,3*

Примечания:

n-число животных в группе

\*-изменения достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

Таким образом, на модели экспериментального инфаркта миокарда соединение РУ-1144 проявляет более выраженную антитромботическую активность, чем на данной модели у животных с моделированным некоронарогенным инфарктом миокарда. Так, в группе животных с некоронарогенным инфарктом миокарда получавших соединение РУ-1144 дозе 18,8 мг/кг происходило увеличение времени полной окклюзии сонной артерии крыс на 47,7 %, при сравнении с группой контроля, в которой моделировался инфаркт миокарда.

#### **4.6. Исследование антитромботической активности соединения РУ-1144 на модели венозного тромбоза, индуцированного полной перевязкой нижней поллой вены крыс.**

Исследования были выполнены на 30 белых беспородных крысах самцах согласно описанному методу [Henke P.K., 2007]. Для подтверждения отсутствия влияния хирургических манипуляций на организм животного, в исследование была включена ложнооперированная группа животных. При проведении

исследования в данной группе животных тромбы в системе нижней полой вены обнаружены не были (табл. 4.6.).

Антитромботическую активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения оценивали по средней массе тромбов, извлеченных из нижней полой вены крыс. В контрольной группе животных данный показатель составил 120,6 мг. При этом, однократное внутривенное введение соединения РУ-1144 достоверно снижало массу тромбов на 81,1% и составляло 22,8 мг (табл. 4.6.).

Ацетилсалициловая кислота статистически достоверно уступала по активности соединению РУ-1144. Показатель средней массы тромбов, извлеченных из нижних полых вен крыс, которым вводили данный препарат, составила 78,6 мг, что на 34,8% достоверно ниже показателя группы контроля (табл. 4.6.).

Второй препарат сравнения клопидогрел приводил к достоверному снижению массы тромбов до 43,5 мг (табл. 4.6.).

**Таблица 4.6. Антитромботическая активность соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на модели тромбоза нижней полой вены крыс, в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Масса тромба, мг
1.	ЛО		0
2.	Контроль		120,6±12,23
3.	РУ-1144	18,8	22,8±9,20 <sup>*#</sup>
4.	Ацетилсалициловая кислота	28,5	78,6±5,83 <sup>*</sup>
5.	Клопидогрел	13,8	43,5±9,03 <sup>*</sup>

Примечания:

n-число животных в группе

ЛО-ложнооперированные животные

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

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

Таким образом, соединение - лидер РУ-1144 на данной модели тромбозов более эффективно ограничивает формирование извлеченных тромбов и

превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 3,5 и 1,9 раза, соответственно.

#### 4.7. Изучение влияния соединения РУ-1144 на время кровотечения.

При исследовании влияния соединения РУ-1144 и препаратов сравнения на время кровотечения из хвостовой вены мышей было показано, что в контрольной группе животных время составило 349,3 с, что совпадает с данными полученными другими исследователями [Bath P.M., 2018]. В таблице 4.8 отображены результаты изучения влияния тестируемого образца РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей.

Введение соединения РУ-1144 не приводило к увеличению времени кровотечения по сравнению с группой контроля. Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел статистически значимо пролонгировали время кровотечения на 67,2 и 62,0% соответственно (рис. 4.7.). Следовательно, соединение РУ-1144 уступало по данному показателю препаратам сравнения.

**Таблица 4.7. Влияние соединения РУ-1144, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей, в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время кровотечения, с	Δ% пролонгирования времени кровотечения
1.	Контроль		349,3±7,2	
2.	РУ-1144	18,8	445,5±10,5*	27,5±3,0
3.	Ацетилсалициловая кислота	28,5	583,9±9,1*	67,2±2,6
4.	Клопидогрел	13,8	566,0±10,0*	62,0±2,9

Примечания:

n-число животных в группе

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

#### 4.8. Заключение.

На основании исследований влияния РУ-1144 на процессы тромбообразования, вызванные повреждением стенки артерий факторами различного генеза и введением тромботических агентов (поверхностная

аппликация раствора хлорида железа и электрического тока на сонную артерию, системный адреналин-коллагеновый тромбоз) установлена его высокая антитромботическая активность при однократном внутрижелудочном способе введения интактным животным.

Модель тромбоза, индуцированного 50% хлоридом железа, активирует несколько составляющих тромботического процесса, а именно агрегацию тромбоцитов, образование фибрина и эритроциты [Dogne J.M., 2004]. Кроме того, хлорид железа вызывает развитие в очаге поражения реакции Хабера-Вейса (взаимодействие железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы), что приводит оксидативному стрессу. Рекомендуемая стратегия лечения тромбозов, помимо антиагрегантной терапии, опирается, в том числе, на необходимость защиты эндотелия от радикальных поражений сосудистой стенки. Проведенный сравнительный анализ выявил преимущество антитромботического действия соединения РУ-1144 перед препаратами сравнения. Так,  $ED_{50}$  данного вещества была в 3,5 раза меньше  $ED_{50}$  ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Проявленная высокая антитромботическая активность соединения РУ-1144, по всей вероятности, связана с наличием антиагрегантного действия. Кроме того, в связи с важнейшей ролью перекисного окисления липидов в патогенезе повышения тромбогенного потенциала крови можно предположить, что в антитромботическую активность соединения РУ-1144 вносит вклад наличие у него антиоксидантного действия.

Модель артериального тромбоза, при которой артерия подвергается действию электрической травмы, по механизму процесса тромбообразования в основном связана с накоплением тромбоцитов на субэндотелиальном матриксе [Marcinczyk N., 2017]. На данной модели соединение РУ-1144 также продемонстрировало высокую антитромботическую активность, превосходя по значению  $ED_{50}$  ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,5 и 7,4 раза, соответственно.

На фоне действия соединения РУ-1144 смертность мышей была ниже при системном тромбозе, вызванном совместным введением тромботических агентов

адреналина и коллагена в хвостовую вену животных. Согласно литературным данным [DiMinno G., 1983] известно, что в воспроизводимой модели непосредственной причиной гибели животных является массивная окклюзия микрососудов легких тромбоцитарными агрегатами. Выживаемость животных при однократном внутривенном введении соединения РУ-1144 составила 80%, что в 1,3 и 1,6 раза превышает эффект препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Выявленные изменения морфометрических параметров в целом соответствуют качественным структурным изменениям в сосудах легких, что свидетельствует о более выраженной антитромботической активности соединения РУ-1144 по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом на модели адреналин-коллагенового артериального тромбоза у мышей. Так, по показателям средней и относительной площади тромбов на срезе легкого соединение РУ-1144 превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,2 и 1,3 раза соответственно.

Кроме исследования антитромботической активности соединения РУ-1144 на основных моделях тромбозов, его исследование также было выполнено в тест-системе Горога, где важным фактором влияния являются условия повышенной турбулентности тока крови. Тестируемый образец РУ-1144 увеличивал время образования тромба 1,4 раза по сравнению с контрольной группой. Кроме этого, изученное соединение не влияло на лизис сгустка.

Выявлена высокая антитромботическая активность соединения РУ-1144 в условиях экспериментальной патологии, а именно у крыс с некоронарогенным инфарктом миокарда. В результате было показано, что у животных с инфарктом миокарда на модели артериального тромбоза, индуцированного раствором  $FeCl_3$  (III), время образования тромба достоверно уменьшается по сравнению с группой интактных крыс, что свидетельствует о повышенном тромбогенном потенциале крови у крыс с экспериментальной патологией. При этом соединение РУ-1144 достоверно пролонгировало время образования тромба на 47,7 % по сравнению со

значениями, полученными в контрольной группе животных с экспериментальной патологией.

Выраженные антитромботические свойства у изученного соединения подтверждают, что в основе его антитромботического механизма действия лежит угнетение процессов агрегации тромбоцитов. И воспроизведенные в эксперименте модели артериальных тромбозов являются тромбоцит-зависимыми, так как в их инициации ключевую роль играют именно тромбоциты.

Также установлена высокая антитромботическая активность соединения РУ-1144 при однократном внутривенном введении. Тестируемое соединение уменьшает среднюю массу венозных тромбов в 5,3 раза по сравнению со значениями, полученными в контроле и при этом, превосходит по антитромботической активности препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 3,4 и 1,9 раза соответственно.

В связи с тем, что все известные антиагрегантные средства блокируют не только активированные тромбоциты, одним из главных побочных эффектов остается высокий риск кровотечения. Именно поэтому было исследовано влияние соединения РУ-1144 на время кровотечения из хвостовой вены мышей. Тестируемый образец удлинял время кровотечения, однако данный показатель был статистически достоверно ниже значений препаратов сравнения клопидогрела и ацетилсалициловой кислоты, что является благоприятным прогнозом, учитывая побочные эффекты антиагрегантной терапии.

Полученные данные о проявлении выраженной специфической фармакологической активности соединения РУ-1144 позволяют провести углубленное изучение механизма его антиагрегантного действия.

## ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1144.

Изучение ключевой роли тромбоцитов в процессе образования тромбов позволяет исследовать новые антиагрегантные средства по основным механизмам действия в различных точках приложения, что способствует прекращению тромбообразования на стадии формирования тромбоцитарных агрегатов [Van der Meijden P., 2019].

Основной процесс изучения механизма действия соединений включает исследование взаимодействия вещества с рецептором или белком-мишенью. На мембране тромбоцитов расположено большое количество рецепторов к различным агонистам, взаимодействие с которыми приводит к потенцированию активационного сигнала и его передачи внутрь клетки [Jamalbi J., 2017]. Именно поэтому, велико разнообразие физиологических агонистов агрегации тромбоцитов. Основными физиологическими активаторами считаются коллаген (главный белок внеклеточного матрикса), тромбин, которые относятся к сильным эффекторам, а также АДФ, активирующая  $P2Y_1$  и  $P2Y_{12}$ , протеазо-активируемые рецепторы тромбоцитов (PAR1 и PAR4) и  $TxA_2$  (вторичные активаторы, секретируемые тромбоцитами) [Gamariel R. R., 2018; Koupenova M., 2018; Kügelgen I.V., 2019]. Кроме данных мишеней, важная роль в активности тромбоцитов отводится рецепторам семейства интегринов, которые представлены рецепторами адгезии GPVI и GPIa/IIa (адгезия к коллагену), GPIb-IX-V (адгезия к фактору Виллебранда), а также рецепторами заключительного пути агрегации тромбоцитов подтипа IIb/IIIa [Samantha J., 2018].

После взаимодействия агонистов с рецепторами поверхности тромбоцита, дальнейшее распространения сигнала внутри происходит с помощью так называемых вторичных мессенджеров – G-белков, внутриклеточного кальция, циклических нуклеотидов, фосфолипазы C и протеинкиназ [Maswan A.S., 2019]. Эти соединения передают сигнал на различные структуры и метаболические

системы тромбоцитов – белки цитоскелета, молекулы клеточной адгезии, ферменты метаболизма арахидоновой кислоты и др. Активация этих систем полностью изменяет состояние тромбоцита и обеспечивает функциональные проявления их активации – изменение формы, адгезию, агрегацию, секрецию из гранул биологически активных веществ, образование тромбоксана  $A_2$  ( $TxA_2$ ), стимуляцию прокоагулянтных реакций.

Исследуя различные пути воздействия на мишени тромбоцитов специфическими агонистами представилось целесообразным более детально изучить механизм действия соединения РУ-1144.

## **5.1. Влияние соединения РУ-1144 на рецепторные пути активации тромбоцитов.**

### **5.1.1. Изучение влияния соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ.**

Проведенные эксперименты позволили установить наличие антиагрегантного действия у соединения РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты в отношении агрегации тромбоцитов крови кроликов, индуцированной АДФ в концентрации 5 мкМ. Значение, полученное в группе контрольных животных, показателя агрегации тромбоцитов плазмы кроликов составило 24,6 отн. ед. В концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М РУ-1144 снижало амплитуду агрегации тромбоцитов до 2,0 отн. ед. При дальнейшем снижении концентрации исследуемого вещества до  $1 \times 10^{-5}$  М и  $1 \times 10^{-6}$  М величина показателя агрегации тромбоцитов составила 11,65 и 17,32 отн. ед. Таким образом, соединение РУ-1144 статистически достоверно блокировало функциональную активность тромбоцитов в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-4}$  –  $1 \times 10^{-6}$  М на 91; 52,8 и 29,9 % соответственно (табл. 5.1). Значение  $IC_{50}$  для соединения РУ-1144 при этом составила 5,5 мкМ. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также проявила дозозависимую антиагрегантную активность в диапазоне изученных концентраций и  $IC_{50}$  для препарата сравнения составила -  $1,2 \times 10^{-4}$  (табл. 5.1).

**Таблица 5.1. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на АДФ (5 мкМ) индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	РУ-1144	91,0±3,43 <sup>*#</sup>	52,8±7,41 <sup>*#</sup>	29,9±4,89 <sup>*#</sup>	5,5
2.	Ацетилсалициловая кислота	53,1±3,2 <sup>*</sup>	26,8±3,0 <sup>*</sup>	5,6±2,3	120,0

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

#-изменения достоверны по отношению к ацетилсалициловой кислоте, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

### **5.1.2. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на модели адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов.**

Ввиду наличия на поверхности тромбоцитов адренорецепторов  $\alpha_2$ -подтипа, было интересным исследовать влияние соединения под лабораторным шифром РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты при использовании такого агониста агрегации тромбоцитов как адреналин. Проведенные исследования позволили установить дозозависимое ингибирующее влияние соединения РУ-1144 на функциональную активность тромбоцитов, индуцированную адреналином. Относительное значение амплитуды агрегации тромбоцитов под действием индуктора адреналина в концентрации 5 мкМ составило 57,70 отн. ед.

Соединение РУ-1144 в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М снижало агрегацию тромбоцитов, вызванную адреналином на 97,8 % относительно значений контрольной группы. Далее в более низких концентрациях  $5 \times 10^{-5}$  М,  $1 \times 10^{-5}$  М и  $1 \times 10^{-6}$  М вещество ингибировало функциональную активность тромбоцитов на 37,76; 21,91 и 4,92 % соответственно. IC<sub>50</sub> соединения РУ-1144 составила 51 мкМ (табл. 5.2). При исследовании препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты также было показано дозозависимое антиагрегантное действие. Препарат сравнения был изучен в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-4}$  М -  $1 \times 10^{-6}$  М. Так, в концентрации 100 мкМ ацетилсалициловая кислота блокировала агрегацию

тромбоцитов на 96,13 %, а концентрациях 10 и 1 мкМ процент агрегации тромбоцитов относительно значений, полученных в группе контроля, составили 37,37 и 5,26 % соответственно. Показатель  $IC_{50}$  для ацетилсалициловой кислоты при этом составил 42 мкМ (табл. 5.2).

**Таблица 5.2. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на адреналин (5 мкМ) индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов				$IC_{50}$ , мкМ
		Концентрация, мкМ				
		100	50	10	1	
1.	РУ-1144	97,79±0,65*	37,76±1,56*	21,91±1,30*#	4,92±0,77	51,0
2.	Ацетилсалициловая кислота	96,13±0,58*	-	37,37±1,23*	5,26±0,70	42,0

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

#-изменения достоверны по отношению к ацетилсалициловой кислоте, критерий Манна-

Уитни ( $p < 0,05$ )

### **5.1.3. Исследование антиагрегантной активности РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на модели агрегации тромбоцитов плазмы кроликов, индуцированной арахидоновой кислотой.**

Влияние РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, изучали в сравнении с ацетилсалициловой кислотой, являющейся ингибитром циклооксигеназы. При исследовании соединений показатель агрегации в образцах плазмы крови кроликов группы контроля составил 38,45 отн. ед. Соединение РУ-1144 дозозависимо статистически значимо ингибировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой, блокируя данный процесс в изученных концентрациях на 80,17; 60,78 и 45,82 % соответственно. Показатель  $IC_{50}$  тестируемого образца РУ-1144 при этом составил 1,93 мкМ (табл.5.3). Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также было исследован в диапазоне концентраций, при этом проценты ингибирования агрегации тромбоцитов составили 94,6, 25,1 и 13,4% соответственно.  $IC_{50}$  препарата сравнения была равна 53 мкМ (табл.5.3).

**Таблица 5.3. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную арахидоновой кислотой (50 мкМ) *in vitro* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	РУ-1144	80,17±1,55*	60,78±1,50*#	45,82±2,46*#	1,93
2.	Ацетилсалициловая кислота	78,79±0,77*	24,78±1,88	10,58±2,13	53,0

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

#-изменения достоверны по отношению к ацетилсалициловой кислоте, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

#### **5.1.4. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов плазмы кроликов.**

Как было описано ранее, коллаген выполняет одну из ключевых ролей в процессах агрегации и адгезии тромбоцитов, а именно при помощи гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов (GPVI, GP I/IIa и GP Ib с фактором Вилебранда). Во многом выраженность процессов агрегации и адгезии зависит от концентрации самого индуктора [Lindkvist M., 2019].

По влиянию на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов соединение РУ-1144 было изучено в сравнении с ацетилсалициловой кислотой. В контрольных образцах плазмы крови при исследовании РУ-1144 амплитуда агрегации тромбоцитов составила 58,11 отн. ед. В изученных концентрациях соединение блокировало агрегацию тромбоцитов на 95,64%, 57,05%, 38,62% и 17,78% соответственно. Показатель IC<sub>50</sub> соединения РУ-1144 при этом составил 9,2 мкМ (табл.5.4). Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию, индуцированную коллагеном, но в более низких концентрациях. При этом IC<sub>50</sub> ацетилсалициловой кислоты составила 26 мкМ (табл.5.4).

**Таблица 5.4. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на коллаген индуцированную (4 мкг/мл) агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов				IC <sub>50</sub> , мкМ
		Концентрация, мкМ				
		100	50	10	1	
1.	РУ-1144	95,64±0,58 <sup>*#</sup>	57,05±1,69 <sup>*</sup>	38,62±2,02 <sup>*#</sup>	17,78±1,09 <sup>*</sup>	9,2
2.	Ацетилсалициловая кислота	87,55±0,93 <sup>*</sup>	-	55,86±1,32 <sup>*</sup>	23,60±3,13 <sup>*</sup>	26

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

#-изменения достоверны по отношению к ацетилсалициловой кислоте, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

### **5.1.5. Исследование антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной фактором активации тромбоцитов (ФАТ).**

Проведенные исследования позволили установить дозозависимое ингибирующее влияние РУ-1144 на функциональную активность тромбоцитов, индуцированную фактором активации тромбоцитов. Относительное значение амплитуды агрегации тромбоцитов под действием данного индуктора, в концентрации 10 мкМ составило 44,22 отн. ед.

Соединение РУ-1144 в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М снижало агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором на 97,92 % относительно значений группы контроля. Далее, в более низких концентрациях  $1 \times 10^{-5}$  М и  $1 \times 10^{-6}$  М соединение ингибировало функциональную активность тромбоцитов на 74,08% и 50,35 % соответственно. IC<sub>50</sub> соединения РУ-1144 при этом составила 1,08 мкМ (табл.5.5).

Соединением сравнения в данном эксперименте был выбран циклический антагонист фактора активации тромбоцитов, под шифром SRI 63-441, селективно ингибирующее ФАТ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, данные, приведённые в таблице были взяты из источников литературы [Braquet Pierre, 2019].

**Таблица 5.5. Влияние соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную фактором активации тромбоцитов (10 мкМ) *in vitro* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	РУ-1144	97,92±0,25*	74,08±3,59*	50,35±2,10*	1,08
2.	SRI 63-441	-	-	-	0,0003**

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

\*\*-данные согласно литературному источнику [Braquet Pierre, 2019].

### **5.1.6. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной ристоцетином.**

Влияние соединения РУ-1144 на процесс агрегации тромбоцитов, вызванный ристоцетином, изучали в связи с тем, что данный агонист инициирует связывание фактора Виллебранда с мембранным гликопротеином Ib-IX, вызывая их агрегацию без активации рецептора GP IIb-IIIa. В образцах плазмы крови группы контроля амплитуда агрегации тромбоцитов составила 24,13 отн. ед. В изученных концентрациях соединение РУ-1144 ингибировало агрегацию тромбоцитов, вызванную данным агонистом, блокируя процесс на 3,85%, что может свидетельствовать об отсутствии побочных эффектов связанных с дисфункцией фактора фон Виллебранда (табл.5.6).

**Таблица 5.6. Влияние соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную ристоцетином (1,25 мг/мл) *in vitro* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов		
		Концентрация, мкМ		
		100	10	1
1.	РУ-1144	3,85±1,22*	-	-

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

### 5.1.7. Исследование антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином.

Тромбин является наиболее сильным физиологическим индуктором агрегации тромбоцитов. Влияние тромбина на тромбоцит происходит посредством воздействия на GPIIb/IIIa. Стимуляция тромбинового рецептора сопровождается активацией тромбоцитов через G-белок, фосфолипазы C и включение фосфоинозитольного механизма активации. Этот путь сопровождается быстрым увеличением концентрации цитозольного  $Ca^{2+}$  и секрецией  $\alpha$ -гранул и электронноплотных  $\delta$ -гранул. Секретируемый из этих гранул АДФ, существенен для образования агрегатов, а выделяемые  $\alpha$ -гранулами фибриноген, vWF, тромбоспондин - для их стабилизации. Оккупация молекулами тромбина высокоаффинных рецепторов GPIIb/IIIa приводит к перестройке фосфолипидной мембраны, стимуляции ее прокоагулянтной активности и повышению аффинности GPIIb-IIIa [Scharf R.E.,2018].

При изучении влияния соединения РУ-1144 на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов в концентрациях 100, 50 и 10 мкМ соединение-лидер блокировало процессы агрегации тромбоцитов на 79,25; 57,13 и 19,51% (табл. 5.7). В качестве препарата сравнения был выбран – дабигатран, блокатор тромбиновых рецепторов, обладающий антикоагулянтным и антиагрегантным действием. Данные, внесенные в таблицу, были получены из литературных данных [Shimizu M. 2019]

**Таблица 5.7. Влияние соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную тромбином (0,5 ед./мл) *in vitro* ( $M \pm m$ , n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов					IC <sub>50</sub> , мкМ
		Концентрация, мкМ					
		100	50	10	0,001	0,0005	
1.	РУ-1144	79,25±4,73*	57,13±3,30*	19,51±2,80*	-	-	330
2.	Дабигатран	-	-	-	92,7±3,1**	82,4±3,9**	0,04

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

\*\* -согласно данным литературы

### 5.1.8. Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, вызванную агонистом PAR1 (протеазо-активированные рецепторы тромбоцитов).

При исследовании контрольных образцов плазмы здоровых доноров амплитуда агрегации тромбоцитов составила 35,75 отн. ед. Соединение под шифром РУ-1144 было изучено в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ, в которых оно блокировало агрегацию тромбоцитов на 74,27%, 54,13% и 35,10 % соответственно. Показатель IC<sub>50</sub> соединения РУ-1144 при этом составил 17,8 мкМ (табл.5.8). Препаратом сравнения был выбран селективный антагонист PAR1 рецепторов тромбоцитов под названием ворапаксар, данные, которые приведены в таблице были взяты из литературных источников [Huan Z.,2012]. Препарат сравнения показал более выраженное влияние на PAR1 подтип рецепторов тромбоцитов при его сравнении с изучаемым соединением согласно показателю IC<sub>50</sub> (табл.5.8).

**Таблица 5.8. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на PAR1 (30 мкМ) индуцированную агрегацию тромбоцитов доноров – мужчин *in vitro* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC <sub>50</sub> , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	РУ-1144	74,27±1,33*	54,13±1,16*	35,10±2,54*	17,8
2.	Ворапаксар	-	-	-	0,08**

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

\*\*-согласно литературным данным

### 5.1.9. Исследование антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов U 46619.

В контрольных образцах суспензии тромбоцитов крови при исследовании антиагрегантной активности соединения под лабораторным шифром РУ-1144 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов, амплитуда составила 31,03 отн. ед. В исследованных концентрациях

– 100, 10 и 1 мкМ соединение-лидер ингибировало агрегацию тромбоцитов на 85,26%, 58,32% и 30,36% соответственно. Показатель  $IC_{50}$  исследования аниагрегантной активности соединения РУ-1144 при этом составил 19,3 мкМ (табл.5.9). Согласно литературным данным существует большое количество соединений, проявляющих антагонистическую активность по отношению к тромбоксановым рецептам тромбоцитов, которые проявили выраженное действие на этапе доклинических исследований, но при дальнейшем исследовании на клинической фазе изучения, показавшие свою неэффективность. Приведенное в таблице 5.9 значение соединения сравнения терутробана показывает более выраженную ингибирующую активность в отношении данной мишени.

**Таблица 5.9. Влияние соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную агонистом тромбоксановых рецепторов U 46619 (3 мкМ) *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			$IC_{50}$ , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	РУ-1144	85,26 $\pm$ 2,09*	58,32 $\pm$ 3,93*	30,36 $\pm$ 2,51*	19,3
2.	Терутробан	-	-	-	0,0164**

Примечание:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

\*\* - данные, полученные согласно литературным источникам.

#### **5.1.10. Влияние соединения РУ-1144 на пуриновые $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ рецепторы тромбоцитов.**

В результате проведенных исследований было показано, что соединение-лидер под шифром РУ-1144 в концентрации 1 мкМ недостоверно по отношению к контролю ингибировало активацию  $P2Y_1$  тромбоцитов в безкальциевой среде на 27,6% (табл.5.10). Вещество сравнения MRS 2179, проявляющее свойства селективного агониста по отношению к  $P2Y_1$ -рецепторам тромбоцитов, в концентрации 1 мкМ ингибировало активацию тромбоцитов на 80,1%.

Таким образом, соединение РУ-1144 практически не обладает антагонистической активностью на P2Y<sub>1</sub> рецепторы тромбоцитов, уступая веществу MRS 2179 сравнения в 2,9 раза.

**Таблица 5.10. Влияние соединения РУ-1144 и вещества сравнения MRS-1279 на степень активации P2Y<sub>1</sub>-рецепторов тромбоцитов кролика в безкальциевой среде, индуцированную 70 нМ АДФ *in vitro* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация тестируемых образцов, мкМ	Уровень активации тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования активации тромбоцитов
1.	Контроль		1,16±0,22	
2.	РУ-1144	1	0,84±0,06	27,6±2,5
3.	MRS-2179	1	0,157±0,12*	80,1±2,4*

Примечания:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони

На следующем этапе исследования соединение РУ-1144 и препарат сравнения клопидогрел при пероральном введении крысам проявили различную ингибирующую активность в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ в концентрации 200 нМ, приводящей к активации P2Y<sub>12</sub> рецепторов. При этом соединение РУ-1144 в терапевтической дозе 18,8 мг/кг блокировало функциональную активность тромбоцитов на 46,8%, тогда, как препарат сравнения клопидогрел в дозе 32 мг/кг ингибировал этот процесс на 100,7% (табл.5.11). Для изучения показателя ED<sub>50</sub> оба соединения были дополнительно исследованы в дозах больше или меньше терапевтической дозы. Таким образом, соединение РУ-1144 также было изучено в дозах 9,4 и 37,6 мг/кг, в которых ингибировало активацию P2Y<sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов на 39,9 и 93,6% соответственно. ED<sub>50</sub> соединения-лидера составило 16,9 мг/кг.

Исследуемые дозы препарата сравнения клопидогрела были уменьшены до 16, 8 и 4 мг/кг, был рассчитан показатель ED<sub>50</sub>, который составил 6,1 мг/кг (табл. 5.11). При этом по показателю ED<sub>50</sub> соединение РУ-1144 уступало препарату сравнения клопидогрелу в 2,7 раза.

**Таблица 5.11 Влияние соединения РУ-1144 и препарата сравнения клопидогрела на активацию P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тромбоцитов крыс при пероральном введении в кальциевой среде, индуцированную 200 нМ АДФ *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень активации P2Y <sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования активации P2Y <sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов	ED <sub>50</sub> , мг/кг
1.	Контроль		11,54±0,42		
2.	РУ-1144	9,4	8,06±0,64	39,9±5,54	16,9
		18,8	7,26±0,30	46,8±2,7	
		37,6	1,88±0,20	93,6±1,75	
3.	Клопидогрел	4	7,28±0,51	46,6±4,41	6,1
		8	6,70±0,68	51,7±5,94	
		16	3,92±0,32	75,9±2,78	
		32	1,06±0,14	100,7±1,19	

Примечания:

n-число животных в группе

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

## **5.2. Влияние соединения РУ-1144 на тромбоксан-простаглицлиновый баланс в тромбоцитах крыс.**

### **5.2.1. Исследование влияния соединения РУ-1144 на продукцию тромбоксана В<sub>2</sub> в тромбоцитах интактных крыс.**

Исходный уровень тромбоксана В<sub>2</sub> в интактных тромбоцитах крыс составил 854,2 пкг/мл (табл.5.12). При этом соединение РУ-1144 не изменяло уровень тромбоксана В<sub>2</sub> по сравнению со значением группы контроля. В тромбоцитах крыс, не стимулированных арахидоновой кислотой, получавших соединение РУ-1144, уровень данного показателя составил 765,1 пкг/мл (табл. 5.12).

При введении препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты происходило более выраженное ингибирование уровня тромбоксана В<sub>2</sub> в тромбоцитах крыс. Уровень данного показателя при этом составил 616,6 пкг/мл (табл. 5.12).

**Таблица 5.12. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на уровень тромбоксана В<sub>2</sub> в интактных тромбоцитах крыс, *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ТхВ <sub>2</sub> , пкг/мл
1.	Контроль		854,2±53,1
2.	РУ-1144	18,8	765,1±133,2
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	616,6±42,3

Примечания: n-число животных в группе

На втором этапе исследования было изучено влияние соединений при стимуляции тромбоцитов арахидоновой кислотой (группа контроля), при этом было показано увеличение уровня тромбоксана В<sub>2</sub> в 11,6 раз по сравнению с исходом (табл. 5.13).

При изучении влияния соединения-лидера под шифром РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты при внутрижелудочном введении крысам на уровень продукта метаболизма арахидоновой кислоты – ТхВ<sub>2</sub> (стабильный метаболит ТхА<sub>2</sub>) в тромбоцитах, значения контрольной группы составили 9934,08 пкг/мл. Соединение РУ-1144 в терапевтической дозе снижало количество измеряемого показателя до 4399,88 пкг/мл, что в 2,3 раза ниже уровня значений группы контроля (табл. 5.13). Препарат сравнения также уменьшал уровень ТхВ<sub>2</sub> в тромбоцитах крыс до 7681 пкг/мл, снижая тем самым количество ТхВ<sub>2</sub> по сравнению с контролем в 1,3 раза.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что соединение РУ-1144 оказывает влияние на уровень тромбоксана А<sub>2</sub>.

**Таблица 5.13. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на продукцию тромбосана В<sub>2</sub> в тромбоцитах крыс, стимулированных арахидоновой кислотой, в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ТхВ <sub>2</sub> , пкг/мл
1.	Контроль		9934,08±615,34
2.	РУ-1144	18,8	4399,88±519,59*
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	7681,00±386,70*

Примечания:

n-число животных в группе

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

### 5.2.2. Влияние соединения РУ-1144 на продукцию 6-кето-простагландина F<sub>1α</sub>.

В ходе проведения исследования влияния соединений на уровень 6-кето-простагландина F<sub>1α</sub> было определено значение, полученное в группе контроля, его исходного уровня в плазме интактных крыс, который составил 22093,67 пкг/мл (табл. 5.14).

При введении тестируемого образца РУ-1144 внутрижелудочно крысам в дозе 18,8 мг/кг, уровень 6-кето-простагландина F<sub>1α</sub> статистически достоверно по отношению к препарату сравнения повышался до 25534,21 пкг/мл (табл. 5.14). При однократном внутрижелудочном введении препарат сравнения ацетилсалициловая кислота снижала выработку 6-кето-простагландина F<sub>1α</sub> в 1,8 раза, при этом уровень препарата сравнения при этом составлял 12377,43 пкг/мл (табл. 5.14).

**Таблица 5.14. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на продукцию 6-кето-простагландина F<sub>1α</sub> в тромбоцитах крыс, в дозах ED<sub>50</sub> антиагрегантной активности *in vivo* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень PGF <sub>1α</sub> , пкг/мл
1.	Контроль		22093,67±988,10
2.	РУ-1144	18,8	25534,21±1643,29#
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	12377,43±2799,76*

Примечания:

n-число животных в группе

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

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

### **5.3. Влияние соединения РУ-1144 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах.**

Биохимические процессы, происходящие при активации, а в последствии и при агрегации тромбоцитов, что опосредовано различными физиологическими стимуляторами, протекают по различным механизмам действия. Однако, в конечном счете действие всех этих стимуляторов сводится к повышению уровня кальция в цитоплазме тромбоцитов [Canobbio I., 2015]. Поэтому можно смело говорить о том, что ионам кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) принадлежит важная роль в регуляции функциональной активности тромбоцитов. Существует большое количество внутри- и внеклеточных источников  $\text{Ca}^{2+}$ , при влиянии которых происходят изменение концентрации внутриклеточного кальция тромбоцитов, что в свою очередь является сигналом для активации или ингибирования ферментов, которые регулируют метаболизм, сократительную и секреторную активность, адгезию и клеточный рост [Annie-Jeyachristy S., 2010].

#### **5.3.1. Действие соединения РУ-1144 на общий уровень кальция в тромбоцитах.**

С целью изучения влияния действия соединения РУ-1144 на увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, эксперименты были выполнены в два этапа как в присутствии, так и в отсутствие физиологических концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ . Увеличение флуоресценции зонда Fura-2/AM, при предварительной индукции тромбином, в присутствии внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  отражает общий прирост внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  за счет входа в клетку и мобилизации из внутренних источников. С другой стороны, прирост флуоресценции Fura-2/AM, при добавлении тромбина в отсутствие внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , отражает высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. В начале исследования была изучена способность соединения РУ-1144 к хелации по отношению к ионам кальция. На рисунке 5.1, показано, что тестируемый образец в отличие от ЭГТА не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах.

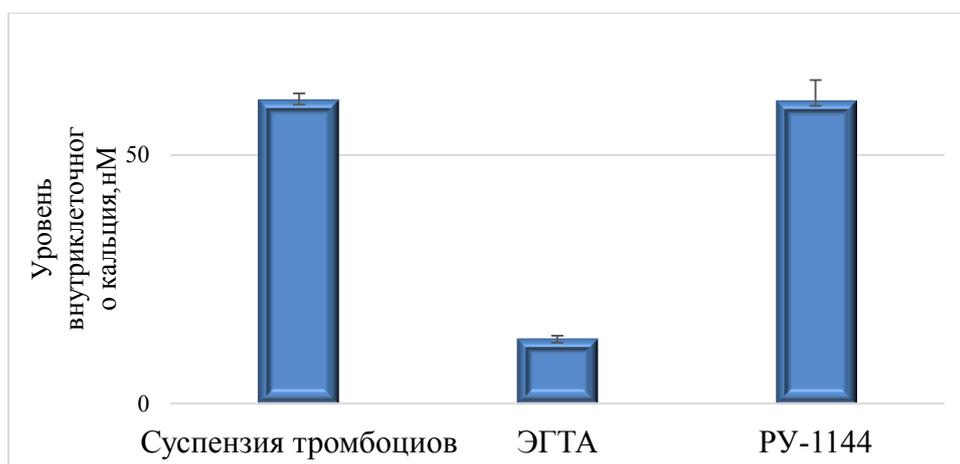


Рис. 5.1 Влияние соединения РУ-1144 и ЭГТА на связывание интрацеллюлярного кальция в интактных тромбоцитах

Таким образом, на первом этапе, индуцированный тромбином выход  $\text{Ca}^{2+}$  из клеточных депо в присутствии физиологических концентраций, сопровождался увеличением содержания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , начиная с исходного уровня равного 61,1 нМ до 390,8 нМ (табл.5.15). Данный показатель был принят за контроль.

Соединение под шифром РУ-1144 дозозависимо ингибировало увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах, при добавлении индуктора тромбина. В концентрации 100 мкМ соединение практически полностью блокировало выход внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , уровень которого в исследуемой пробе составил 89,2 нМ, что было соответственно 76,5 % ингибирования данного процесса (табл.5.15). В последующих дозах 10 мкМ и 1 мкМ соединение РУ-1144 ингибировало индуцированное тромбином увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах на 63,6 % и 20,7 % соответственно (табл.5.15). Таким образом, показатель  $\text{IC}_{50}$  для соединения РУ-1144 составила 27,8 мкМ. Изученный тестируемый образец проявил выраженную активность в отношении уменьшения прироста внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином. В качестве препарата сравнения был использован верапамил, который является антагонистом ионов кальция. В концентрации равной 100 мкМ данный препарат ингибировал уровень кальция до 199,7 нМ, уступая при этом соединению РУ-1144 (табл. 5.15).

На следующем этапе исследования проводилось изучение влияния соединения РУ-1144 на уровень внутриклеточного кальция в отсутствие внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . В данном случае индуцированный тромбином выход  $\text{Ca}^{2+}$  из клеточных депо в среде без кальция, сопровождался ростом внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  начиная с исходного уровня 36,6 нМ до 139,6 нМ (табл. 5.16)

Соединение РУ-1144 в дозе 100 мкМ практически до базального уровня блокировало прирост внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с исходными значениями. Его количество в пробе составило 45,1 нМ (табл. 5.16). Процент ингибирования уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  при этом соответствовал 67,7 %. При дальнейшем уменьшении концентраций соединения РУ-1144 до 10 мкМ и 1 мкМ % ингибирования уровня внутриклеточного кальция составил 40,5 % и 17,8 % соответственно (табл. 5.16).  $\text{IC}_{50}$  тестируемого образца РУ-1144 была равна 55,4 мкМ.

**Таблица 5.15. Влияние соединения РУ-1144 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином (0,5 ед./мл) в кальциевой среде *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ	$\Delta\%$ ингибирования уровня внутриклеточного кальция	$\text{IC}_{50}$ , мкМ
1.	Суспензия тромбоцитов		61,1 $\pm$ 13,3		
2.	Суспензия Тромбоцитов +тромбин	Контроль	390,8 $\pm$ 39,2		
3.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + РУ-1144	100	89,2 $\pm$ 7,7*	76,5 $\pm$ 2,0*	27,8
		10	138,1 $\pm$ 18,3*	63,6 $\pm$ 4,7*	
		1	251,9 $\pm$ 18,0	20,7 $\pm$ 4,6	
4.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + Верапамил	100	199,7 $\pm$ 46,5	48,4 $\pm$ 12,8	

Примечания:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

**Таблица 5.16. Влияние соединения РУ-1144 на уровень кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином (0,5 ед./мл) в безкальциевой среде *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ	$\Delta\%$ ингибирования уровня внутриклеточного кальция	IC <sub>50</sub> , мкМ
1.	Суспензия тромбоцитов		36,6±1,2		
2.	Суспензия тромбоцитов + тромбин	Контроль	139,6±12,1		
3.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + РУ-1144	100	45,1±8,4*	67,7±4,1*	55,4
		10	83,0±1,5*	40,5±3,2*	
		1	113,3±9,7	17,8±3,1	

Примечания:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

#### 5.4. Заключение.

В результате проведенного исследования по изучению влиянию соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами, были получены результаты, показывающие способность данного соединения оказывать антиагрегационное действие на широкий спектр индукторов агрегации тромбоцитов в тестах *in vitro*. Антиагрегантная активность препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты была изучена в отношении индукторов, которые способствуют образованию продуктов циклооксигеназной реакции.

Так, индуктор АДФ вызывает агрегацию путем связывания с гликопротеиновыми рецепторами на плазматической мембране тромбоцита, снижая активность аденилатциклазы и тем самым ингибируя уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), стимулируя высвобождение арахидоновой кислоты и образование  $TxA_2$  [Мазуров А.В., 2011]. Действие АДФ на агрегацию тромбоцитов во многом определяется уровнем внеклеточного кальция.

**Таблица 5.17. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на различные индукторы агрегации тромбоцитов *in vitro* (M±m, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Индуктор	Концентрация индуктора	Δ% ингибирования			IC <sub>50</sub> , мкМ
				10 <sup>-4</sup> М	10 <sup>-5</sup> М	10 <sup>-6</sup> М	
1.	РУ-1144	АДФ	5 мкМ	91,0±3,43*	52,8±7,41*	29,9±4,89*	5,5
		Адреналин	5 мкМ	97,79±0,65*	21,91±1,30*	4,92±0,77*	51
		Арахидоновая кислота	50 мкМ	80,17±1,55*	60,78±1,50*	45,82±2,46*	1,9
		Коллаген	4 мкг/мл	95,64±0,58	38,62±2,02	17,78±1,09*	9,2
		ФАТ	10 мкМ	97,92±0,25*	74,08±3,59*	50,35±2,10*	1,1
		Тромбин	0,5 ед./мл	79,25±4,73*	57,13±3,30*	19,51±2,80*	330
		PAR1	30 мкМ	74,27±1,33*	54,13±1,16*	35,10±2,54*	17,8
		Ристоцетин	1,25 мг/мл	3,85±1,22*	-	-	
		U46619	3 мкМ	85,26±2,09*	58,32±3,93*	30,36±2,51*	19,3
2.	Ацетилсалициловая кислота	АДФ	5 мкМ	53,06±3,2*	26,8±3,0*	5,6±2,3	120
		Адреналин	5 мкМ	96,13±0,58*	37,37±1,23*	5,26±0,70	42
		Арахидоновая кислота	50 мкМ	78,79±0,77*	24,78±1,88*	10,58±2,13*	53
		Коллаген	4 мкг/мл	87,55±0,93*	55,86±1,32*	23,60±3,13*	26

Примечания:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

При исследовании соединения РУ-1144, на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами, были получены данные, свидетельствующие о выраженной способности вещества РУ-1144 в тестах *in vitro* оказывать антиагрегантное действие на широкий спектр индукторов агрегации тромбоцитов. Наибольшую активность соединение РУ-1144 проявило в отношении таких индукторов, как АДФ, арахидоновая кислота, коллаген и ФАТ, показатель IC<sub>50</sub> антиагрегантной активности данного соединения составил 5,5; 1,9; 9,2 и 1,1 мкМ. При этом соединение РУ-1144 во многом превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. Менее выражено данное вещество блокировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную PAR1, U46619, адреналином и тромбином (табл. 5.17).

Хорошо известно, что арахидоновая кислота способна вызывать агрегацию тромбоцитов в результате образования продуктов ее естественного метаболизма и, в первую очередь,  $\text{TxA}_2$ . Ингибирование соединением РУ-1144 функциональной активности тромбоцитов, вызванной данным индуктором, свидетельствует во многом о способности данного соединения ингибировать синтез продуктов циклооксигеназного каскада, а именно  $\text{TxA}_2$  [Chen H., 2018].

При воздействии индуктора агрегации коллагена на тромбоциты происходит их активация, при которой из тромбоцитов высвобождаются различные биологически активные вещества, которые находятся внутри альфа-гранул и плотных гранул. Последние, в свою очередь, являются хранилищем веществ, стимулирующих агрегацию тромбоцитов - АДФ и серотонина, что происходит в результате повышения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при действии на тромбоциты коллагена, тромбина и других индукторов агрегаций, в том числе и самого АДФ. При активации тромбоцитов повышается активность фосфолипазы  $\text{A}_2$  тромбоцитарных мембран - фермента, который участвует в образовании арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов. В итоге под влиянием циклооксигеназы из арахидоновой кислоты сначала синтезируются циклические эндопероксиды (простагландины  $\text{G}_2/\text{H}_2$ ), а из них при участии тромбоксансинтетазы образуется тромбоксан  $\text{A}_2$  - активный стимулятор агрегации тромбоцитов. В результате данного процесса активируется фосфолипаза  $\text{C}$  и увеличивается образование инозитол-1,4,5-трифосфата ( $\text{IP}_3$ ), который также способствует высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из кальциевого депо тромбоцитов.

Являясь одним из наиболее сильных индукторов активации тромбоцитов, ФАТ влияет на изменение формы тромбоцитов, высвобождение вазоактивных аминов, выделение тромбоцитами агрегационного фактора 4 и b-тромбоглобулина, стимулирует синтез  $\text{TxA}_2$  и повышает агрегацию тромбоцитов.

Важно отметить, что при исследовании соединения РУ-1144 на агрегацию тромбоцитов, вызванную ристоцетином, не происходило ингибирования данного процесса, что доказывает отсутствие влияния на фактор фон Виллебранда.

При изучении влияния соединения РУ-1144 на пуриновые P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов не было показано выраженной антагонистической активности в отношении ингибирования процессов агрегации, соединение сравнения MRS-2179 и препарат сравнения клопидогрел в большей степени блокировали данные процессы.

При исследовании тестируемого образца в методе иммуноферментного анализа на баланс тромбоксана В<sub>2</sub> и 6-кето - простагландина, было показано, что исследуемое соединение приводит к ингибированию выработки тромбоксана В<sub>2</sub>, превосходя при этом препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2,3 раза, а также незначительно повышая уровень 6-кето - простагландина.

Активация тромбоцитов осуществляется при высвобождении Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо тромбоцитов. При этом повышается концентрация кальция в цитозольном пространстве клетки, активируются протеинкиназы и, в конечном итоге, происходит фосфорилирование регуляторных белков внутри тромбоцитов. Повышение уровня кальция в цитозоле клетки стимулирует фосфолипазу А<sub>2</sub>, что приводит к высвобождению арахидоновой кислоты. Высвобождение кальция регулируется следующими факторами: при связывании тромбина и других агонистов с рецепторами на мембране тромбоцитов, при котором образуются метаболиты, стимулирующие высвобождение кальция из внутриклеточного депо. Также происходит повышение уровня внутриклеточного кальция, при связывании на поверхности тромбоцитов специфическими рецепторами, которые подавляют активность аденилатциклазы, снижая, тем самым, продукцию цАМФ и увеличивая выход Ca<sup>2+</sup> из депо. В отличие от этого, продуцируемый эндотелиальными клетками простаглицлин (PGI<sub>2</sub>), стимулирует активность аденилатциклазы, повышает концентрацию цАМФ в тромбоцитах и тормозит секрецию кальция из внутриклеточных депо [Benimana O., 2017; Munzer P., 2017]. Принимая во внимание данный факт важным этапом является исследование влияния соединения РУ-1144 на ингибирование выхода ионов кальция. Также было изучено, что соединение РУ-1144 дозо-зависимо снижает уровень общего кальция в эксперименте с физиологическим содержанием кальция и также в тест-

системе без содержания кальция при стимуляции тромбоцитов тромбином. Данное исследование помогло сделать выводы об ингибирующем влиянии тестируемого образца на секрецию внутриклеточного кальция.

Исходя из полученных данных об исследовании механизма действия соединения РУ-1144 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной различными индукторами, можно предположить, что наиболее вероятной мишенью его антиагрегантного действия является ингибирование синтеза продуктов циклооксигеназного каскада.

Таким образом, наличие специфической фармакологической активности у соединения РУ-1144 делает необходимым изучение его токсикологического действия, что также является важным этапом фармакологического исследования новых соединений.

## **ГЛАВА 6. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1144.**

Ранее проведенные исследования острой токсичности исследуемого соединения РУ-1144 позволили отнести его к 4 классу умеренно-токсичных веществ согласно классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 (И.В.Березовская, 2003; И.В. Саноцкий и И.П. Уланова, 1975). Показатель LD<sub>50</sub> при однократном внутрибрюшинном пути введения составил 749,2 мг/кг. Но для того, чтобы оценить степень выраженности токсикологического воздействия на организм показателя острой токсичности недостаточно, потому как возможные токсические реакции могут проявляться и в дозах, не приводящих к гибели животных.

Влияние на ЦНС, эмоциональный статус животных, поведенческие реакции, нервно-мышечную возбудимость, параметры вегетативной нервной системы, а также определение доз соединения РУ-1144, при которых начинают проявляться его неблагоприятные эффекты возможно с использованием метода С. Ирвина [Irwin S., 1964] в модификации Бугаевой Л.И. [Бугаева Л.И., 2012].

Исходя из этого, явилось целесообразным изучить возможные токсические проявления соединения РУ-1144.

### **6.1. Исследование влияния соединения РУ-1144 на поведенческий статус мышей (тест «открытое поле»).**

Для оценки влияния соединения РУ-1144 на поведенческие реакции (спонтанная двигательная активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования) в тесте «открытое поле» использовался метод [Воронина Т.А., 2005]. Метод исследования описан в главе 2.

При проведении исследований наблюдали уменьшение всех регистрируемых параметров (горизонтальная активность, вертикальная активность, поисковая активность, груминг, выход в центр, болюсы, урикации,

время выхода из центра) с постепенным увеличением вводимой дозы соединения РУ-1144. При исследовании данных показателей соединение было изучено в дозе 18,8 мг/кг ( $ED_{50}$ ), а также в дозах в 50, 100, 200, 400 и 600 мг/кг. Так как при дальнейшем повышении дозы до 800 мг/кг наблюдалась гибель животных, дальнейших исследований в данной дозе не проводилось (табл.6.1.).

При анализе полученных данных по изучению горизонтальной активности при внутрибрюшинном введении соединения РУ-1144 и дозах 18,8; 50; 100 и 200 мг/кг, а также в контрольной группе происходило снижение исследуемого показателя примерно на 50% через 120 мин, после введения соединения. При назначении вещества РУ-1144 в максимальных дозах равных 400 и 600 мг/кг снижение данного показателя начиналось раньше, а именно через 1 час. Впоследствии, происходило постепенное уменьшение горизонтальной активности. Однако все эти изменения в изученных дозах не были статистически значимы относительно группы контроля (табл.6.1).

В ходе исследования вертикальной активности, как в группе контроля, так и в группах животных, которым вводили соединение РУ-1144 в дозах 18,8; 50; 100 и 200 мг/кг, происходило недостоверное снижение данного показателя. У животных, получавших исследуемое вещество в дозах 400 и 600 мг/кг, также происходило снижение изучаемого показателя, однако, с полной потерей неблагоприятного действия. Так в дозе 400 мг/кг потеря данного вида активности наступала на 180 минуте наблюдения, а в дозе 600 мг/кг – на 90-й минуте (табл.6.1).

Соединение РУ-1144 доза-зависимо повышало поисковую активность у животных в исследуемых дозах. Однако через 90 минут происходило недостоверное уменьшение данного показателя, что характерно для всех исследуемых групп, включая группу контроля, что возможно связано с привыканием животных к установке «открытое поле».

В группах животных, получавших соединение РУ-1144 в исследуемых дозах, также наблюдалось недостоверное снижение показателей груминга (табл. 6.2). Так, было показано, что во всех дозах во временной точке 30 минут после

введения соединения РУ-1144 происходило уменьшение актов груминга на 50%. При достижении 60 минут происходило уменьшение еще на 30%, а с 90-й минуты наблюдалось сохранение показателя до конечной точки исследования.

При введении соединения РУ-1144 в исследуемых дозах ни в одной группе не наблюдалось достоверных различий в показателях болюсы и уринации по сравнению с группой контроля.

Основываясь на полученных данных, на основании теста «открытое поле» было показано, что соединение РУ-1144 в больших дозах (400 и 600 мг/кг) приводит к угнетению двигательной активности животных и не оказывает влияния на эмоциональный статус.

На всем протяжении тестирования статистически значимого изменения со стороны эмоционального поведения животных (проявления признаков вокализации, пугливости, агрессивности) не наблюдалось.

**Таблица 6.1 Влияние соединения РУ-1144 на поведенческую активность животных в тесте «открытое поле» (M±m, n=6)**

Показатель	Доза, мг/кг	Интервалы регистрации показаний								
		1 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин
Горизонтальная активность	0 <sup>#</sup>	55,8±5,5	47,3±7,8	40,7±5,9	39,5±4,9	31,8±2,8	31,5±2,6	27,0±2,0	26,6±2,0	25,0±1,7
	18,8	43,3±3,3*	40,7±2,6	36,5±2,4	33,7±2,3	29,8±3,1	29,5±2,5	25,5±1,5	25,3±0,8	25,0±1,0
	50	42,8±2,9*	39,8±4,3	32,3±3,1	31,0±2,8	25,8±1,7	23,8±0,6	23,8±1,4	21,2±1,2	20,1±1,3
	100	34,0±3,6*	29,0±3,3	28,7±2,4	28,3±1,8	26,7±1,2	23,3±1,2	21,7±0,8	19,7±0,8	19,5±0,7
	200	34,0±1,1*	29,7±1,4	28,3±1,4	28,0±1,8	26,5±1,8	25,8±1,3	19,5±1,3	16,3±1,1	12,5±1,2
	400	37,0±2,1*	27,5±1,4*	24,5±1,1	16,2±1,6	15,0±1,7	14,5±0,9	12,2±1,2	10,7±0,7	11,5±1,3*
	600	45,2±5,9*	29,2±9,2	17,8±3,5	14,8±2,2*	12,3±1,7	14,7±4,8	9,5±2,5	8,7±3,4	6,5±2,4*
Вертикальная активность	0 <sup>#</sup>	5,5±2,6	5,8±1,1	4,8±1,1	2,3±0,5	1,8±1,2	1,2±0,6	1,0±0,7	0,5±0,3	0,3±0,3
	18,8	5,3±0,3	4,3±0,2	3,2±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	1,2±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2
	50	4,7±0,6	3,8±0,3	2,5±1,0	1,7±0,5	1,7±1,3	1,5±1,1	2,0±1,2	1,2±0,9	0,2±0,2
	100	4,2±0,7	1,8±0,5	1,2±0,8	1,0±0,4	0,5±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2
	200	3,0±0,6*	1,3±0,3	0,3±0,2	0,3±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2
	400	2,5±0,4*	1,2±0,8	1,2±0,5	0,5±0,3	0,3±0,2	0,3±0,3	-	-	-
	600	2,3±0,2	1,2±0,5	0,6±0,3	-	-	-	-	-	-
Поисковая активность	0 <sup>#</sup>	4,3±1,0	3,0±0,7	1,7±0,8	0,3±0,3	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,2±0,2
	18,8	3,2±0,3	2,8±0,3	1,2±0,5	0,7±0,4	0,7±0,4	0,7±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,2±0,2
	50	3,3±0,6	2,3±0,3	1,7±0,3	0,8±0,4	0,7±0,2	0,5±0,5	0,3±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2
	100	4,0±0,3	2,1±0,7	1,0±0,4	0,8±0,2	0,7±0,3	0,3±0,2	0,3±0,2	0,2±0,2	0,2±0,2
	200	4,5±0,9	2,2±0,5	1,5±0,6	1,8±0,3	1,5±0,5	1,0±0,5	1,5±0,3	1,3±0,4	1,2±0,4
	400	4,7±0,2	2,0±0,3	1,3±0,6	1,3±0,3	1,3±0,3	1,3±0,3	0,8±0,2	1,0±0,4	1,2±0,5
	600	4,7±0,8	2,0±0,6	1,2±0,4	1,3±0,3	2,0±0,6	1,0±0,5	1,0±0,5	0,3±0,2	0,3±0,2

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA (p<0,05);

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

**Таблица 6.2 Влияние соединения РУ-1144 на поведенческую активность животных в тесте «открытое поле» (M±m, n=6)**

Показатель	Доза, мг/кг	Интервалы регистрации показаний								
		1 мин	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин
Груминг	0 <sup>#</sup>	2,0±0,6	1,0±0,2	0,5±0,2	0,3±0,2	0,3±0,3	0,3±0,2	0,2±0,2*	0,2±0,2*	0,2±0,2*
	18,8	1,3±0,2	0,6±0,2*	0,3±0,3	0,2±0,2*	0,2±0,2	0,2±0,2*	0,2±0,2*	0,2±0,2*	0,2±0,2*
	50	3,0±1,0	1,5±0,2	0,8±0,4	0,7±0,2	0,7±0,2	0,5±0,3	0,5±0,2	0,5±0,3	0,5±0,3
	100	2,2±0,5	1,2±0,3*	0,5±0,3	0,3±0,2	0,3±0,3	0,2±0,2	0,3±0,3	0,3±0,3	0,3±0,3
	200	4,5±0,6	2,3±0,7	2,0±0,6	1,8±0,8	1,8±1,1	1,7±0,3	1,7±0,4	1,7±0,6	1,7±0,3
	400	3,8±0,3	2,0±0,5	2,0±0,2	2,0±0,9	1,5±0,6	1,5±0,6	1,5±0,2	1,0±0,3	0,9±0,2
	600	2,8±0,6	1,3±0,5	1,3±0,8	1,0±0,5	1,2±0,6	0,7±0,3	0,7±0,3	0,7±0,2	0,2±0,2
Болюсы	0 <sup>#</sup>	0,5±0,2	-	0,2±0,2	-	0,2±0,2	-	-	-	-
	18,8	0,5±0,2	-	0,2±0,2	-	0,2±0,2	-	-	-	-
	50	0,5±0,2	0,2±0,2	-	0,2±0,2	-	0,2±0,2	-	-	-
	100	0,5±0,2	-	0,2±0,2	-	0,2±0,2	-	-	-	-
	200	0,6±0,2	-	0,5±0,2	-	0,2±0,2	0,2±0,2	-	-	-
	400	0,6±0,2	0,2±0,3	-	0,2±0,2	-	-	-	-	-
	600	0,6±0,2	0,2±0,2	-	0,3±0,2	-	-	-	-	-
Уринации	0 <sup>#</sup>	0,2±0,2	-	-	0,3±0,2	0,2±0,2	-	-	-	-
	18,8	-	0,2±0,2	-	0,3±0,2	-	-	0,2±0,2	-	-
	50	0,3±0,2	-	0,2±0,2	-	-	0,2±0,2	-	-	-
	100	0,3±0,2	0,3±0,2	-	0,3±0,2	-	-	-	-	0,2±0,2
	200	0,3±0,2	-	-	-	0,2±0,2	0,2±0,2	-	0,2±0,2	-
	400	0,3±0,2	-	-	0,5±0,2	-	-	0,3±0,2	-	-
	600	0,3±0,2	-	0,2±0,2	-	0,3±0,2	-	-	-	-

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA (p<0,05);

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

## **6.2. Влияние соединения РУ-1144 на эмоциональный статус, рефлексы и нервно-мышечную возбудимость.**

С целью оценки влияния соединения РУ-1144 на эмоциональный статус животных, нервно-мышечный тонус и рефлексы были проведены следующие исследования: наблюдение за наличием или отсутствием вокализации, пугливости во время касания, агрессии, проявление синдрома Штраубе, тремора, парезов, судорог. Также проводили оценку выраженности слухового, роговичного и ипселатерального, а также сгибательного рефлексов.

При изучении влияния соединения РУ-1144 на эмоциональный статус животных было установлено, что значительных изменений таких параметров, как вокализация, пугливость и агрессия не было выявлено. На протяжении всего исследования не наблюдалось влияния соединения РУ-1144 на слуховой, роговичный и ипселатеральный рефлексы. Также не наблюдался рефлекс Штраубе (табл. 6.3).

При изучении нервно-мышечной возбудимости на фоне действия соединения РУ-1144 было отмечено отсутствие тремора у животных, даже при введении максимальных доз исследуемого образца (табл. 6.4).

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод об отсутствии влияния соединения РУ-1144 на параметры высшей нервной деятельности.

Таблица 6.3 Влияние соединения РУ-1144 на рефлексы мышей (M±m, n=6)

Доза, мг/кг	Роговичный, слуховой и ипсилатеральный рефлекс									Рефлекс Штраубе, °								
	Время регистрации показателей, мин									Время регистрации показателей, мин								
	1	30	60	90	120	150	180	210	240	1	30	60	90	120	150	180	210	240
0 <sup>#</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: «+» - наличие рефлексов в норме; «↓» - снижение рефлексов; «°» - градусы; n-число животных в группе

#-дистиллированная вода

Таблица 6.4 Влияние соединения РУ-1144 на нервно-мышечную возбудимость мышей (M±m, n=6)

Доза, мг/кг	Парез, судороги (в баллах)									Тремор (в баллах)								
	Время регистрации показателей, мин									Время регистрации показателей, мин								
	1	30	60	90	120	150	180	210	240	1	30	60	90	120	150	180	210	240
0 <sup>#</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA (p<0,05);

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

### 6.3. Влияние соединения РУ-1144 на реактивность, двигательную и мышечную координацию животных.

При однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-1144 в дозах 18,8; 50; 100 и 200 мг/кг наблюдалось недостоверное снижение двигательной активности животных в актометре, относительно группы контроля (табл. 6.5). Однако с увеличением дозы исследуемого вещества до 400 и 600 мг/кг данный параметр продолжал снижаться, что может быть результатом наличия миорелаксирующей активности.

**Таблица 6.5 Влияние соединения РУ-1144 на двигательную активность мышей в тесте актометр (M±m, n=6)**

Доза, мг/кг	Время регистрации показаний актометра, мин								
	1	30	60	90	120	150	180	210	240
Показатели актометра, сек									
0 <sup>#</sup>	135,0±20,1	127,0±17,0	125,3±12,8	109,7±20,5	91,5±18,2	81,0±16,0	74,0±9,9	72,7±9,4	71,7±11,7
18,8	215,2±20,1*	190,8±8,4	137,5±16,3	99,8±5,5	87,2±5,8	74,3±5,9	59,8±4,6	44,2±4,5	35,0±3,2
50	205±20,8	130,8±13,0	104,2±10,7	101,7±13,1	73,7±4,9	64,0±5,9	53,8±11,4	41,5±12,2	41,5±14,6
100	187,3±13,8	130,5±18,4	120,7±17,6	102,7±16,2	80,7±22,2	74,3±10,7	61,5±12,2	38,2±8,6	29,2±9,2
200	172,0±24,1	130,7±27,9	90,2±31,0	75,0±21,3	64,5±14,7	53,7±10,6	33,5±6,8	24,7±3,7	22,0±1,7
400	168,3±19,9	109,8±8,1	78,8±9,6	45,6±6,9	41,0±5,3	29,8±2,0*	23,3±2,3*	18,0±3,2*	14,7±1,1*
600	146,5±6,4	105,8±10,7	79,2±14,1*	42,5±3,6	47,3±3,8	47,0±11,5	31,8±8,1	28,3±11,1*	20,5±8,9*

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA (p<0,05);

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

При изучении влияния соединения РУ-1144 на мышечный тонус мышей с использованием установки «Ротарод теста», было установлено, что все животные контрольной группы удерживались на вращающемся стержне установки. Соединение РУ-1144 в дозах 18,8 и 50 мг/кг не оказывало влияния на изменение позы, тонус конечностей и нарушение равновесия. Также на протяжении всего исследования не наблюдалось развитие дискоординации.

В группе введения соединения РУ-1144 в дозе 100 мг/кг при регистрации данных, начиная от исходных значений и до 120-й минуты не происходило изменения показателей по сравнению с группой контроля. При увеличении времени (120; 150; 180; 210 и 240 минут) наблюдалось постепенное снижение двигательной активности. При дальнейшем увеличении доз соединения РУ-1144

до 200, 400 и 600 мг/кг, отмечалось достоверное снижение показателей данного теста с временного интервала равного 90 минут. Опираясь на эти данные, можно предположить наличие миорелаксирующего действия у соединения РУ-1144 в дозах, во много раз превышающих дозу основного фармакологического эффекта (18,8 мг/кг) (табл. 6.6).

**Таблица 6.6 Влияние соединения РУ-1144 на мышечный тонус мышей в тесте ротарод ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Доза, мг/кг	Время регистрации показаний, мин								
	1	30	60	90	120	150	180	210	240
	Показатели, сек								
0 <sup>#</sup>	30,0	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*
18,8	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*
50	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*
100	30,0*	30,0*	30,0*	30,0*	28,3±3,9	19,5±4,3	19,2±4,3	14,0±5,7	12,3±5,6
200	30,0*	27,5±1,3	25,0±2,9	20,8±2,4*	18,5±1,5*	18,3±1,4*	17,5±1,0*	16,5±0,5*	16,3±0,3*
400	30,0*	24,8±1,3	21,9±1,9	21,7±2,5*	19,6±0,8*	17,5±0,4*	17,2±1,9*	16,3±0,8*	15,0±1,4*
600	30,0*	23,5±1,3	22,0±2,9	20,8±2,4*	18,5±1,5*	15,3±1,4*	14,5±1,0*	12,5±0,5*	12,3±0,3*

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

При введении соединения РУ-1144 во всех исследуемых дозах у животных сохранялась мышечная координация, проявляющаяся в способности удерживаться всеми 4 лапами на проволоке и сетке (табл. 6.7 и 6.8).

**Таблица 6.7 Влияние вещества РУ-1144 на мышечную координацию животных на проволоке ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Доза, мг/кг	Время регистрации показаний, мин								
	1	30	60	90	120	150	180	210	240
	Показатели в баллах								
0 <sup>#</sup>	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
18,8	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
50	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
100	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
200	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
400	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
600	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

**Таблица 6.8 Влияние вещества РУ-1144 на мышечную координацию животных на сетке ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Доза, мг/кг	Время регистрации показаний, мин								
	1	30	60	90	120	150	180	210	240
	Показатели в баллах								
0 <sup>#</sup>	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
18,8	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
50	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
100	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
200	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
400	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
600	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

При исследовании реактивности животных отмечалось достоверное изменение данного показателя при введении соединения РУ-1144 в дозе 400 мг/кг, сохраняющееся до завершения тестирования. Исходные показатели при этом различались недостоверно во всех экспериментальных группах. В группе животных, получавших исследуемое соединение в максимальной исследуемой дозе равной 600 мг/кг, достоверное увеличение времени начала движения животного на ровной горизонтальной поверхности наблюдалось только к концу эксперимента, что может быть связано с адаптацией животных (табл. 6.9).

**Таблица 6.9 Влияние соединения РУ-1144 на реактивность мышей ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Время регистрации, мин	0 <sup>#</sup>	Доза, мг/кг					
		18,8	50	100	200	400	600
1	3,7±0,2	2,7±0,3	6,5±0,6	6,0±0,9	4,7±0,8	8,2±0,4	6,3±1,1
30	3,7±0,6	2,3±0,2	11,3±1,3	7,0±1,2	6,0±1,3	10,2±1,7	7,5±3,5
60	5,8±0,9	4,0±0,4	11,2±1,9	8,3±1,2	6,8±1,8	14,3±2,5	10,3±3,4
90	6,8±0,7	4,2±0,6	11,5±1,5	9,2±1,6	8,3±1,3	21,7±3,0*	12,2±1,9
120	6,3±1,0	5,5±0,7	10,8±1,1	7,5±0,9	9,7±2,2	19,0±3,0*	18,8±3,4*
150	6,8±0,7	7,3±0,8	9,8±0,8	9,7±0,8	11,7±1,4	16,5±1,7*	18,3±3,0*
180	8,0±0,7	8,2±0,5	12,2±0,6	8,2±0,5	11,7±0,7	16,2±1,1*	22,7±2,5*
210	8,0±0,9	8,7±1,1	11,2±0,7	12,0±1,4	11,3±0,7	17,5±1,1*	24,0±2,5*
240	9,2±0,7	11,3±1,1	15,7±0,6	11,0±1,7	12,5±1,3	16,3±1,2*	24,5±2,8*

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-Дистиллированная вода

n-число животных в группе

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных наблюдений было установлено, что соединение РУ-1144 достоверно проявляет незначительную миорелаксирующую активность в максимальных дозах при проведении «Ротарод-теста», однако не влияет на мышечную координацию животных на сетке и на проволоке. Значимое снижение двигательной активности мышц (реактивность) наблюдается во временном интервале 90-240 минут после введения вещества в диапазоне доз от 18,8 до 200 мг/кг. При изучении остальных доз соединения РУ-1144 статистически значимое миорелаксирующее действие регистрировалось, начиная со 120 минуты эксперимента и сохранялось до конца исследования.

#### **6.4. Действие соединения РУ-1144 на вегетативную нервную систему.**

При проведении исследований влияния соединения РУ-1144 на состояние функции вегетативной нервной системы наблюдали за изменением болевой чувствительности, динамикой ректальной температуры, изменением цвета кожи, наличием или отсутствием птоза, экзофтальма, частотой дыхательных движений.

Оценка болевой чувствительности животных проводилась путем сдавливания основания хвоста пинцетом. Степень выраженности болевой реакции оценивали по 4-бальной шкале (0-отсутствие болевой реакции; 1-слабовыраженная реакция; 2-отдергивание хвоста; 3-выраженная реакция с или без явлений вокализации; 4-отдергивание хвоста, вокализация, агрессия в отношении раздражителя).

При однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-1144 во всех исследуемых дозах степень выраженности реакции на болевое воздействие была сравнима со значениями, полученными в группе контрольных животных. Животные проявляли агрессию в отношении раздражителя, сопровождающуюся отдергиванием хвоста (табл. 6.10).

**Таблица 6.10 Влияние соединения РУ-1144 на болевой рефлекс ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Доза, мг/кг	Время регистрации показаний, мин									
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	
Показатели в баллах										
0 <sup>#</sup>	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
18,8	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
50	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
100	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
200	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
400	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
600	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

Далее в качестве показателя влияния соединения РУ-1144 на функциональную активность вегетативной нервной системы была исследована динамика ректальной температуры животных. Во всех исследуемых дозах не наблюдалось достоверных различий в изменении исследуемого показателя под воздействием соединения РУ-1144 (табл. 6.11).

Во всех изученных дозах соединение РУ-1144 не вызывало явлений птоза и экзофтальма.

При изучении соединения РУ-1144 в исследуемых дозах на частоту дыхания животных не отмечалось статистически значимых различий с группой контроля (табл. 6.12).

Таблица 6.11 Влияние соединения РУ-1144 на изменение показателя ректальной температуры мышей ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Интервалы регистрации показаний, мин								
		1	30	60	90	120	150	180	210	240
РУ-1144	0 <sup>#</sup>	37,8±0,1	37,7±0,1	37,8±0,1	37,8±0,1	37,6±0,2	37,7±0,1	37,6±0,2	37,9±0,1	37,8±0,1
	18,8	37,7±0,1	37,5±0,1	37,8±0,1	37,6±0,1	37,3±0,1	37,5±0,1	37,6±0,2	37,8±0,1	37,8±0,2
	50	37,8±0,1	37,7±0,1	37,8±0,1	37,8±0,1	37,6±0,1	37,7±0,3	37,6±0,3	37,9±0,3	37,8±0,1
	100	37,8±0,1	37,7±0,2	37,8±0,3	37,8±0,3	37,6±0,2	37,7±0,1	37,7±0,2	37,9±0,1	37,8±0,2
	200	37,7±0,4	37,8±0,2	37,7±0,1	37,7±0,1	37,7±0,2	37,8±0,1	37,6±0,2	37,9±0,1	37,6±0,2
	400	37,8±0,1	37,7±0,1	37,7±0,2	37,7±0,1	36,8±0,1	37,6±0,1	37,7±0,2	37,9±0,1	37,6±0,2
	600	37,5±0,1	37,5±0,2	37,6±0,2	37,5±0,1	37,5±0,1	37,5±0,1	37,5±0,1	37,7±0,2	37,5±0,1

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

Таблица 6.12 Влияние соединения РУ-1144 на изменение показателя частоты дыхательных движений ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Интервалы регистрации показаний, мин								
		1	30	60	90	120	150	180	210	240
РУ-1144	0 <sup>#</sup>	170,7±4,9	172,0±1,8	169,3±3,0	170,0±2,5	168,0±2,1	171,0±2,2	167,7±2,9	168,7±1,6	166,0±2,3
	18,8	156,2±4,4	155,2±5,7	156,2±6,4	155,8±6,8	156,3±5,7	153,3±5,1	151,5±5,1	150,5±4,7	148,3±4,5
	50	170,6±4,9	172,0±1,8	169,3±3,0	170,0±2,5	168,0±2,1	171,0±2,2	167,7±2,8	168,7±1,6	166,0±2,3
	100	146,7±8,5	149,3±7,4	154,0±6,5	151,8±4,9	155,3±5,6	157,3±6,4	158,7±5,8	156,0±4,1	155,3±3,5
	200	163,3±7,3	161,7±7,4	164,3±4,9	158,3±4,0	159,0±5,5	160,7±4,4	161,3±4,8	163,3±4,3	162,7±4,3
	400	166,7±5,6	168,7±2,8	162,7±2,0	162,0±2,9	160,0±5,1	160,7±5,7	161,3±6,4	160,7±4,4	161,3±4,6
	600	162,0±6,4	166,0±5,1	164,0±5,8	164,0±4,7	165,3±3,7	168,0±4,1	166,0±3,8	165,3±3,7	164,0±3,7

Примечание

\*-изменения достоверны относительно исходных значений, критерий ANOVA ( $p < 0,05$ );

#-дистиллированная вода

n-число животных в группе

Таким образом, в ходе изучения влияния соединения РУ-1144 на функциональное состояние вегетативной нервной системы не было отмечено достоверных изменений во всех исследуемых дозах.

### **6.5. Заключение.**

В результате исследования общетоксического действия соединения РУ-1144 при однократном внутрижелудочном введении мышам в дозах 18,8; 50; 100; 200; 400 и 600 мг/кг было показано, что данное вещество практически не оказывает влияния на эмоциональное поведение животных, не вызывает агрессивности, пугливости, вокализации, пассивности, беспокойства, стереотипии, тремора, судорог и рефлекса Штраубе, не приводит к развитию побочных вегетативных эффектов в виде экзофтальма, птоза. Однако в дозах 400 и 600 мг/кг наблюдалось достоверное снижение двигательной координации животных и заторможенные поведенческие реакции.

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

## ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Наиболее частой причиной таких заболеваний сердечно-сосудистой системы как ишемическая болезнь сердца и мозга является повышение тромбогенного потенциала крови, когда тромбоциты и коагуляционные протеазы, взаимодействуя с циркулирующими клетками в разных сосудистых руслах, активируют тромбообразование [Spronk H.M., 2018]. Ключевую роль в гемокоагуляции играют тромбоциты, на поверхности которых сосредоточено большое количество мишеней активации, а также данные процессы были бы невозможны без участия внутренних и внешних биохимических факторов [Scharf, R. 2012, Zhao S., 2019, Zhao B.W., 2019]. Агрегация тромбоцитов является многоступенчатым механизмом, при котором сам тромбоцит претерпевает процессы изменения для повышения способности к адгезии, агрегации и активации плазменных факторов. Однако, если процесс образования тромба протекает в патологически пораженном атеросклерозом участке сосуда, где скорость течения крови ускорена, то риск развития тромботических осложнений будет увеличен в несколько раз. Именно поэтому обязательной частью в профилактике и лечении тромботических состояний является использование группы антиагрегантных препаратов, главной ролью которых является угнетение функций тромбоцитов. В настоящее время, существует значимый арсенал средств, подавляющих агрегацию тромбоцитов.

На данный момент в клинической практике применяются препараты, влияющие на различные звенья агрегации тромбоцитов (рис.7.1), такие как ингибиторы циклооксигеназы - ацетилсалициловая кислота; антагонисты P2Y<sub>12</sub> рецептора тромбоцитов, обратимо ингибирующие его активность - клопидогрел, прасугрел и тиклопидин, а также блокирующие данный рецептор необратимо – тикагрелор и кангрелор; блокаторы гликопротеиновых (GP) рецепторов тромбоцитов IIb/IIIa для в/в введения - абциксимаб, эптифибатид и тирофибан; ингибитор фосфодиэстеразы -дипиридамола [Metharom P., 2015; Twomey L. 2019].

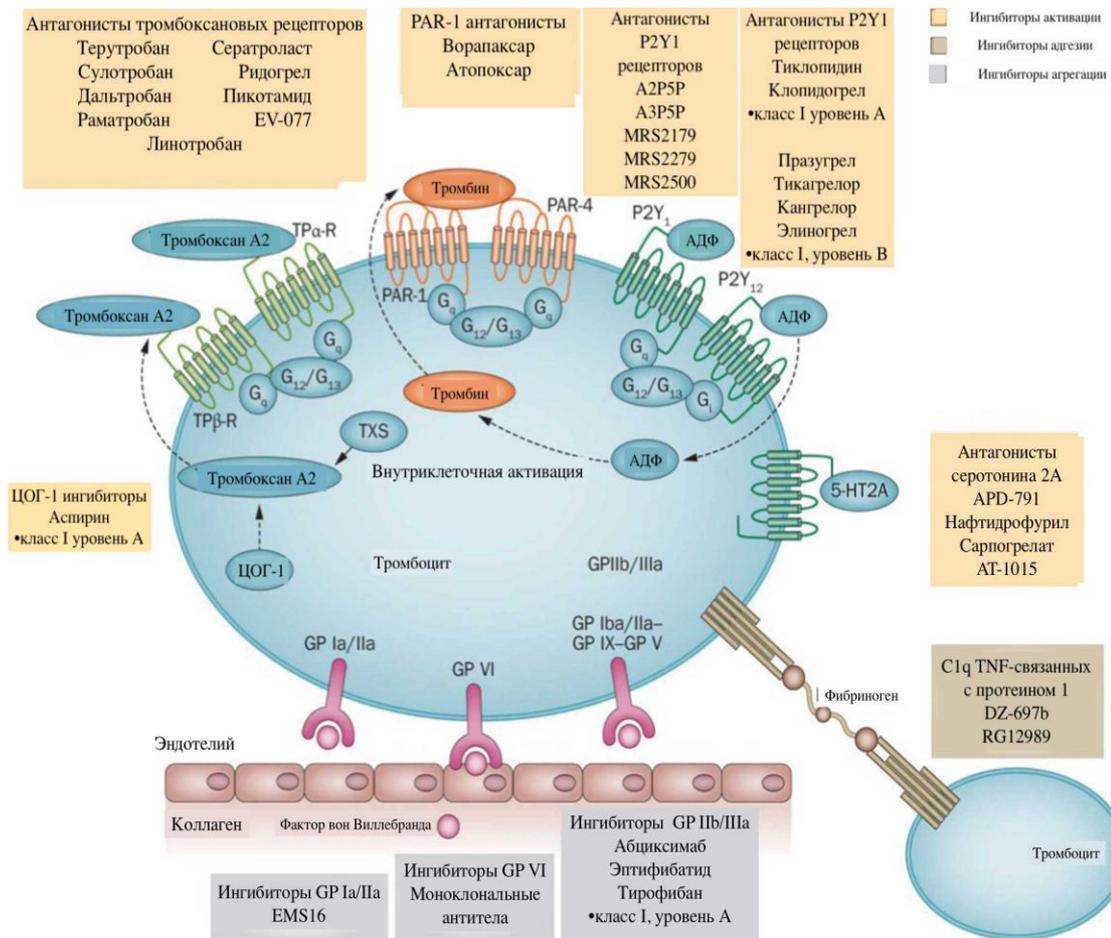


Рисунок 7.1 Основные мишени антиагрегантных препаратов [Franchi F., Angiolillo D.J., 2015 (рисунок, дополненный переводом)].

При использовании вышеупомянутых средств зачастую наблюдается большое количество нежелательных побочных эффектов, среди которых кровотечения, гастропатии, тромбоцитопения, брадикардия, АВ-блокада, гипотензия, спутанность сознания, нарушение зрения, анафилактический шок, анемия, лейкоцитоз и др. [Tantry U.S., 2014; McFadyen J.D., 2018]. Также, описана резистентность к ацетилсалициловой кислоте и клопидогрелу [Chiang J.Y., 2019].

Именно поэтому для снижения побочных эффектов используется комбинирование препаратов в более низких дозах, так называемая двойная антитромбоцитарная терапия [Miyazaki Y. 2017]. Поэтому поиск антиагрегантных средств, влияющих на новые мишени и звенья патогенеза агрегации тромбоцитов, является наиболее актуальным.

Также в настоящее время поиск новых антиоксидантных препаратов, обладающих свойством уменьшения избыточного образования свободных

радикалов, которые вовлечены в патогенез множества патологических состояний, таких как гипоксические, ишемические и реперфузионные повреждения органов, прежде всего мозга, миокарда, процессов старения, высоко актуален [Sies H., 2015; Bisht S., 2017; Kattoor A.J., 2017].

На основании данных полученных ранее на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского Государственного Медицинского университета, а также полученных при проведении обзора литературных данных [Кучерявенко А.Ф. 2014; Косолапов В.А., 2019; Baldisserotto A., 2019], была показана способность гетероциклических азотсодержащих соединений, блокировать агрегационную способность тромбоцитов и снижать перекисное окисление липидов.

Изучено, что окислительный стресс способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний [Houston S.A., 2017] и может играть важную роль в активации тромбоцитов. Это может быть ввиду прямого воздействия окислительного стресса на тромбоциты, так и при косвенном влиянии путем разрушения лабильных сосудорасширяющих средств, происходящих из эндотелия, таких как оксид азота [Jang J.Y. 2015]. Окислительный стресс, вызываемый либо самими тромбоцитами через несколько внутриклеточных источников, либо стенкой артерии, также могут модулировать тонус сосудов, что имеет значение для кровотока и образования тромба в кровеносных сосудах [Li H. 2014].

Учитывая важность окислительного стресса в модулировании взаимодействия тромбоцитов и сосудов [Fuentes, E., 2019], актуальным остается сочетанное действие антиагрегантных и антиоксидантных препаратов, действие которых могут быть опосредованы путем удаления свободных радикалов или защиты тромбоцитов от воздействия окислительного стресса а также снижения тромбогенного потенциала крови [Manasa K., 2016].

Известно, что при терапии патологических состояний сердечно-сосудистой системы используют комбинированную терапию не только при применении антиагрегантов различных групп, но также и в комбинации с антиоксидантными препаратами с целью предупреждения профилактики гипоксических состояний,

происходящих на фоне ишемической болезни сердца и мозга и др. [Houston S.A. 2017].

В связи с полученными данными, перспективным остается поиск и изучение новых высокоэффективных соединений, проявляющих одновременно антиагрегантную и антиоксидантную активности. В ранее проведенных исследованиях при использовании средств сочетанного действия, было показано уменьшение размеров зоны некроза и улучшение реоксигенации тканей и органов [Шахмарданова С.А. 2016].

На первом этапе исследования был выполнен скрининг данных соединений по способности блокировать функциональную активность тромбоцитов на модели АДФ-индуцированной (в концентрации 5 мкМ) агрегации тромбоцитов в тесте *in vitro* по методу G. Vorn, в модификации В.А. Габбасова (1989).

В качестве препарата сравнения была выбрана ацетилсалициловая кислота - лекарственное средство с высокой доказанной активностью [Hirsh J., 2019], которая была изучена в диапазоне концентраций, начиная с  $1 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  М. В результате изучения зависимости концентрация – эффект для ацетилсалициловой кислоты была рассчитана  $IC_{50}$ , которая составила - 100 мкМ.

Все 26 соединений были изучены в начальной дозе  $1 \cdot 10^{-4}$  М. В результате исследований было показано, что 9 соединений ингибировали агрегацию тромбоцитов более чем на 50 %. Эти вещества были исследованы с целью определения показателя  $IC_{50}$ . Таким образом, все 9 соединений были расставлены, согласно данного показателя, начиная с веществ, проявляющих наибольшую активность: РУ-1263>РУ-1144>РУ-1261>РУ-871>РУП-76>РУ-873>РУП-46>РУП-66>РУ-903. Согласно данной градации наибольшую антиагрегантную активность проявили соединения РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263.

Способность антиоксидантных средств ингибировать процессы перекисного окисления липидов имеет важное значение для стабилизации структуры и функций мембран, что необходимо для обеспечения процесса гомеостаза. Известно, что оксидативный стресс можно условно разделить на три этапа: инициация продукции активных форм кислорода; усиление образования свободных радикалов; и

конечный этап - перекисное окисление липидов [Sies H., 2015; Kattoor A.J. et al., 2017].

Известно, что в настоящее время атеросклероз считается хроническим воспалительным заболеванием. Окислительный стресс, вызванный образованием избыточного количества активных форм кислорода, является окончательным механизмом при атеросклерозе. Активные формы кислорода представляют собой группу небольших реактивных молекул, которые играют критическую роль в регуляции различных функций клеток и биологических процессов [Berger M., et al., 2019].

Синтез простагландинов из арахидоновой кислоты происходит по циклооксигеназному и липооксигеназному путям. Данный биосинтез на начальных этапах сопровождается образованием АФК, которые могут инициировать запуск реакций оксидативного стресса в тканях [Fuentes E., et al. 2019]. Поэтому, можно сделать вывод, что при терапии антиагрегантными средствами, подавляющими синтез продуктов арахидонового каскада, понижается синтез активных форм кислорода, что в свою очередь ведет к понижению оксидативного стресса.

Согласно литературным данным, описано наличие у соединений, имеющих в своей структуре, экранированный фенольный заместитель, антиоксидантных свойств [Алексеева А.А., 2007; Berrani A., 2018]. Именно поэтому, актуально изучить производные бензимидазола, имеющие в своей структуре экранированный фенольный заместитель на наличие антиоксидантных свойств.

При изучении антиоксидантной активности производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель на модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов в дозировке 100 мкМ было показано, что большинство веществ проявили данный антиоксидантный эффект. 12 веществ под шифрами РУ-873, РУ-1144, РУ-1263, РУС-193, РУ-871, РУ-1261, РУ-1249, РУ-903, РУ-1180, РУ-1265, РУП-2, РУ-1260 по антиоксидантной активности были сравнимы или превосходили препарат сравнения дибунол. 11 соединений под шифрами РУП-46, РУП-76, РУП-66, РУП-56, РУП-36, РУС-191, РУП-26, РУС-190, РУЧ-6, РУС-198, РУЧ-2 оказывали менее выраженный антиоксидантный эффект и

уступали по активности препарату сравнения. Оставшиеся 3 соединения под шифрами РУ-1250, РУ-1251 и РУ-887, хоть и содержали дитретбутильный радикал, не обладали антиоксидантным действием. Для трех соединений под шифрами РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263, проявивших наиболее выраженную антиагрегантную активность в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов, было дополнительно проведено исследование доза-зависимой антиоксидантной активности. Все соединения проявили антиоксидантное действие, однако по показателю  $IC_{50}$  они уступали препарату сравнения дибунолу.

При проведении исследования корреляционной зависимости антиагрегантной и антиоксидантной активности был найден коэффициент корреляции, который для группы веществ с высокой антиагрегантной активностью (более 50% - высокоактивные соединения) был положительным и составил 0,73. При сравнении других групп данный показатель не подтверждал корреляционную зависимость.

**Таблица 7.1. - Ранжирование исследуемых веществ по показателям корреляции между антиагрегантной и антиоксидантной активностями на моделях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов *in vitro*.**

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

Также, для выбора наиболее активного соединения (соединения-лидера) были проведены исследования в тесте *in vivo* среди веществ под шифрами РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263. В качестве препаратов сравнения, кроме ацетилсалициловой кислоты, было изучено антиагрегантное средство – клопидогрел. Данный препарат не использовался в тестах *in vitro*, так как является пролекарством и его действие проявляется, только после прохождения процесса биотрансформации в целостном организме [Вақі У., 2019]. В результате исследования дозозависимой активности

были рассчитаны величины  $ED_{50}$  исследованных соединений и препаратов сравнения. Для соединений РУ-1144, РУ-1261 и РУ-1263 они составили 18,8; 40,1 и 37,9 мг/кг соответственно, а для препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела - 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно. Как видно из полученных данных наибольшую активность проявило соединение РУ-1144, которое по показателю  $ED_{50}$  превосходило ацетилсалициловую кислоту в 1,5 раза и, было сравнимо с клопидогрелом. Данное соединение было выбрано для дальнейшего более углубленного изучения на предмет антитромбогенной активности и механизма антиагрегантного действия.

Главным показателем безопасности лекарственных средств является исследование величины их токсичности и для соединения РУ-1144 была рассчитана величина  $LD_{50}$ , которая составила 749,2 мг/кг. На основании этого согласно классификации токсичности лекарственных веществ при внутрибрюшинном пути введения, оно относится к 4 классу умеренно-токсичных веществ [Саноцкий И.В., 1975; Березовская И.В., 2003].

С целью определения условной широты терапевтического действия соединения РУ-1144 был найден показатель равный 39,9. По показателю условного терапевтического индекса (УТИ) соединение РУ-1144 превосходило ацетилсалициловую кислоту в 3,7 раза.

В качестве объектов исследования было выбрано 26 соединений, производных бензимидазола. Были отобраны соединения в основе их базовой структуры находился экранированный фенольный заместитель-дитретбутил, для которого характерна антирадикальная активность [Berrani A., 2018].

Соединения, выбранные в данное исследование, были представителями различных групп имеющие следующие 6 скаффолдов – состоящих из двух компонентов – бензимидазола и дитретбутильного радикала: *1H*-бензимидазолы и соли *1H*-бензимидазолия-3, *N9*-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, 3,5-дигидротриазинобензимидазолы, 2,3,4,10-тетрагидропиримидо-бензимидазолы, 2,3-дигидротиадиазинобензимидазолы и *4H*-триазолобензимидазолы.

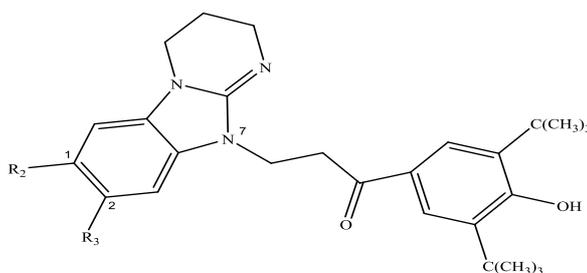


Рисунок 7.2. Общая формула производных *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-пиримидобензимидазолов (ПБИ).

Первая группа, исследованная в данной работе была представлена производными пиримидобензимидазола (рис. 7.2). Основные представители данной группы были описаны в главе 2 и 3. Важной характеристикой данной группы является наличие в их структуре дитретбутил-4-гидроксифенильного радикала в положении R1, который, возможно, влияет на увеличение антиагрегантной и антиоксидантной активности. В положении R2 и R3 у данных соединений находились такие заместители как водород или метильная группа. Таким образом, при изучении зависимости антиагрегантной активности от химического строения производных пиримидобензимидазола, было показано, что именно данная группа обладает наибольшей активностью, так как все соединения проявили выраженную антиагрегантную активность, которая по показателю  $\Delta\%$  ингибирования агрегации тромбоцитов в концентрации 100 мкМ составляла более 70% и, превосходили препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. При проведении исследований антиоксидантной активности данных соединений также была показана высокая активность в тесте перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vitro*, в отношении данной группы веществ, которая в среднем составляла -70%.

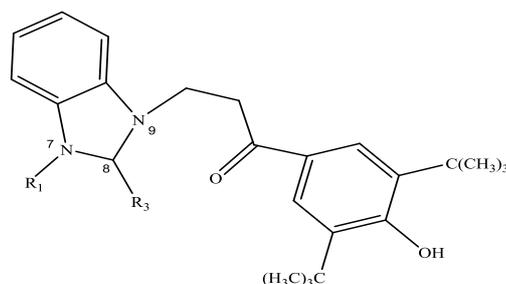


Рисунок 7.3. Общая формула производных *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов (БИ).

Наибольшей выборкой по количеству соединений оказалась группа производных *1H*-бензимидазолов (рис. 7.3.). Она представлена 15 соединениями, проявляющими различную по выраженности антиагрегантную активность. С шифрами соединений и их заместителями, входящими в данную группу можно ознакомиться в таблице в главе 3. Большинство соединений данной группы представлены производными, в структуре которых находится 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он в положении R 1 и 2, что в различной степени влияет как на антиагрегантную, так и на антиоксидантную активности. При перемещении данного радикала в положение из положения R2 в R1, была показана потеря данных двух видов активности, а при перемещении экранированного фенольного заместителя в положение R3, происходит увеличение антиоксидантной и уменьшение антиагрегантной активности. В положении R2 и R3 у некоторых из представленных соединений находились такие заместители как метильная или аминогруппы, также в качестве заместителей были представлены: 2-аминоэтанол, 3-аминопропанол, этилбензен, 4-этилморфолин, *N*-этилпиперидин, *N,N*-диэтиламиноэтил и пропен-1. Таким образом, только 6 соединений проявили выраженную антиагрегантную активность, которая оказалась больше 60%, превосходя препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. Все данные соединения объединяет наличие в положении R2 экранированного фенольного заместителя представленного 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-оном, а также солевого остатка -гидробромида или дигидробромида. Остальные 9 соединений в меньшей степени проявили антиагрегантный эффект.

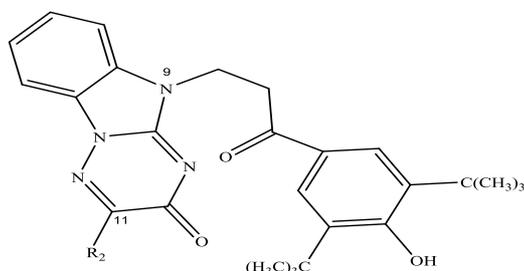


Рисунок 7.4. Общая формула производных *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолов (ТБИ).

В данной группе производных триазинобензимидазолов (рис. 7.4) представлены только 2 вещества. В их структуре 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-он находится в положении R1, при этом нет достоверных данных, свидетельствующих о внесении данным радикалом каких либо изменений в активности, ввиду относительно маленькой выборки веществ. В положении R2-находились такие заместители как метил или остаток пропановой кислоты. Данные соединения не проявили выраженной активности, и при этом показатель  $\Delta\%$  ингибирования антиагрегантной и антиоксидантной видов активности не превышал значения 40,5%.

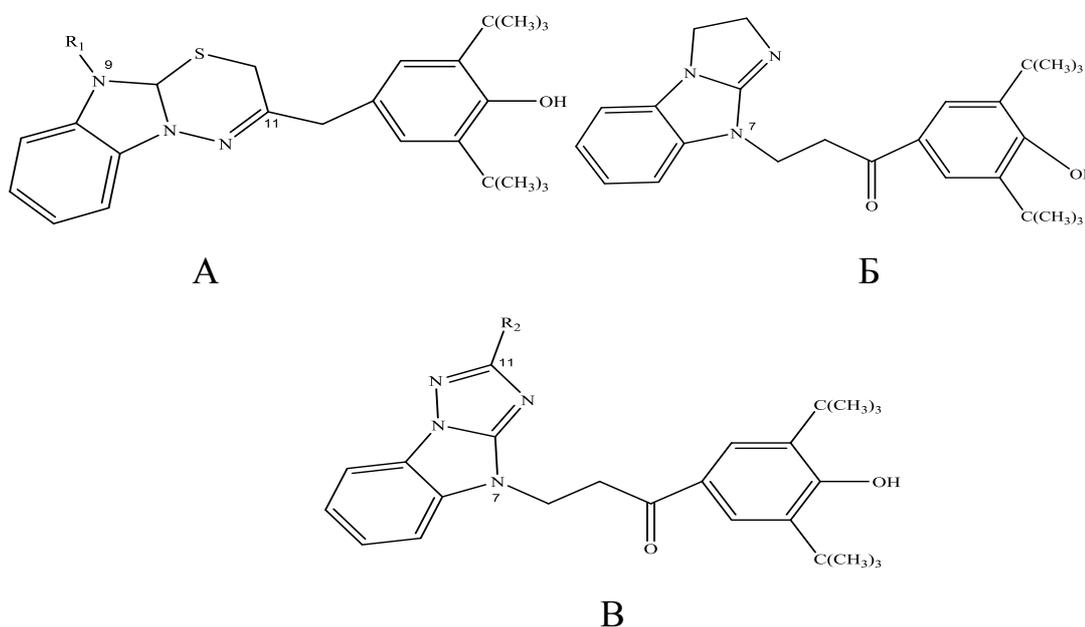


Рисунок 7.5 Общая формула производных (А) *N*11-2,6-дитретбутил-1-гидроксифенил-2,3-тиадиазинобензимидазолов (2,3-ТдБИ); (Б) *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-*N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолов (2,3-ДИБИ) и (В) *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-триазолобензимидазолов (ФТБИ).

В выборке представителей трех оставшихся групп было лишь 1-2 соединения, поэтому невозможно судить о влиянии экранированного фенольного заместителя на выраженность изучаемых видов активности. В качестве радикала R1 или R2 в структуре представленных соединений находился метил.

При исследовании группы производных 2,3-тиазинобензимидазолов, в структуре которых присутствует экранированный фенольный заместитель в

положении R2, был найден только один представитель (рис. 7.5). Поэтому, нет возможности судить о внесении радикалом изменений в исследуемых видах активности. Соединение данной группы в выраженной степени подавляло агрегацию тромбоцитов и перекисное окисление липидов, при этом значение  $\Delta\%$  составило 84,3 и 87,0 % соответственно.

Таким образом, можно расположить все группы соединений по возрастанию антиагрегантной активности: БИ (в которой 2 неактивных соединения) > ФТБИ (в данной группе 1 неактивное соединение) > 2,3-ДИБИ (группа представлена 2 соединениями: 1 активным и 1 неактивным) > ПБИ (самая большая группа представлена 15 соединениями: 6 из которых активные) > 2,3-ТдБИ (данная группа представлена 1 активным соединением) > последняя группа – ПБД, в которой все 5 соединений высокоактивны.

Так как тромбоциты, несомненно, играют главную роль в формировании таких патологических состояний как инфаркт миокарда, ишемический инсульт, ишемическая болезнь сердца, и др. на следующем этапе нашего исследования изучено действие соединения – лидера на наиболее значимых моделях патологий сердечно-сосудистой системы. Основные модели, применяемые в данной работе, были направлены на изучение процессов тромбообразования в системе сонных артерий и нижней полой вены [Frattani F.S., 2017; Brown I.E., 2018] (рис.7.6.).

Была исследована антитромботическая активность соединения РУ-1144 на моделях артериального тромбоза сонной артерии крыс при однократном пероральном введении. Модель артериального тромбоза, индуцированного 50% хлоридом железа (III) активирует сразу несколько составляющих тромботического процесса: агрегацию тромбоцитов и образование фибрина [Wang Y., 2019]. Также, по биологии сосудистого дефекта данная модель подразумевает развитие в очаге поражения реакции Хабера-Вейса (взаимодействие железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы), которая ведет к изменению фосфолипидного состава мембраны тромбоцитов и повышению их функциональной активности. При активации свободно-радикальных процессов окисленный фибриноген, являющийся индуктором агрегации тромбоцитов,

накапливается в крови и активирует тромбообразование [Vecatti M., 2014]. Таким образом, выявленная способность соединения РУ-1144 увеличивать время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного 50% хлоридом железа, превосходя препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел по показателю ED<sub>50</sub> в 3,5 раза, обусловлено его способностью ингибировать процессы агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов и, тем самым, препятствовать последующей активации гемостаза.

На второй модели артериального тромбоза, индуцированного анодным током, была также показана выраженная антитромботическая активность исследуемого соединения РУ-1144, которое по величине показателя ED<sub>50</sub> антитромботической активности превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,5 и 7,4 раза соответственно.

Метод «Global Thrombosis Test» позволяет посредством моделирования механическим способом изменения характера кровотока в кровяном русле проводить исследования не только антитромботической, но и тромболитической активности соединений. В условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога соединение РУ-1144 показало способность увеличивать время образования тромба по сравнению со значениями в группе контрольных животных и недостоверное превосходство активности по сравнению с ацетилсалициловой кислотой, при этом также недостоверно уступая клопидогрелу. Также у данного соединения не было обнаружено влияние на лизис тромба, что указывает на отсутствие у него тромболитической активности.

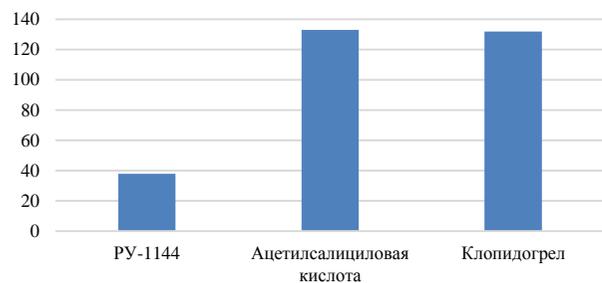
При исследовании влияния соединения-лидера и препаратов сравнения на выживаемость мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза, было показано уменьшение гибели животных в данных группах исследования при их однократном пероральном введении, при сравнении с группой контроля. Тромбоэмболия легочных артерий является наиболее частой причиной смертности среди сердечно-сосудистых заболеваний, именно поэтому с целью оценки морфометрических показателей были исследованы средняя площадь тромбов и

относительная площадь тромбов. При сравнении по данному показателю исследуемых групп, было показано уменьшение площади тромбов при введении соединения РУ-1144 со срезами легкого в группах контроля и препаратов сравнения. При сравнении соединения-лидера с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом по относительной площади тромбов, было выяснено, что соединение РУ-1144 превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,2 и 1,3 раза соответственно.

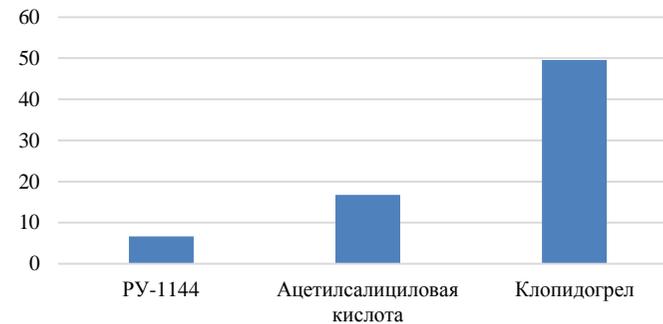
Многие средства современной антиагрегантной терапии используются для купирования серьезных осложнений острого коронарного синдрома. С этой целью при изучении потенциальных антиагрегантных препаратов, необходимо исследовать анитромботическую активность соединений при экспериментальной патологии. Именно с этой целью была изучена антитромботическая активность соединения РУ-1144 у крыс с экспериментальным некоронарогенным инфарктом миокарда. В результате данного исследования было показано, что соединение-лидер на 47,7% замедляет время образования тромба в сонной артерии крыс по сравнению с контрольной группой животных с экспериментальной патологией.

На модели венозного тромбоза, индуцированного перевязкой нижней полостью вены крыс, было показано, что соединение РУ-1144 уменьшает массу образовавшихся тромбов на 34,8% по сравнению с контролем и превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел по показателю массы извлеченных тромбов в 3,5 и 1,9 раза, соответственно.

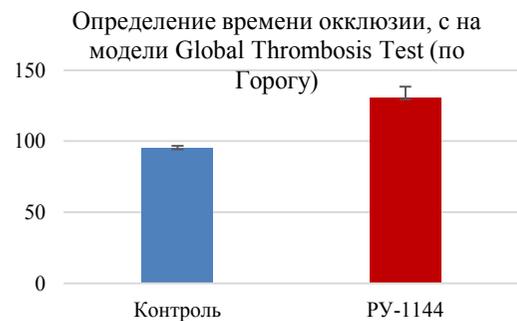
ED<sub>50</sub> антитромбогенной активности соединения РУ-1144 и препаратов сравнения на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа (III)



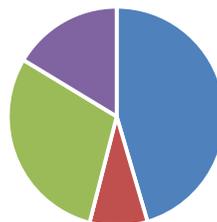
ED<sub>50</sub> антитромбогенной активности соединения РУ-1144 и препаратов сравнения на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током



Антитромботическая активность соединения РУ-1144



Масса тромба, полученная на модели тромбоза нижней полой вены крыс



■ Контроль ■ РУ-1144 ■ Ацетилсалициловая кислота ■ Клопидогрел

Количество погибших животных на модели коллаген - адренинового тромбоза

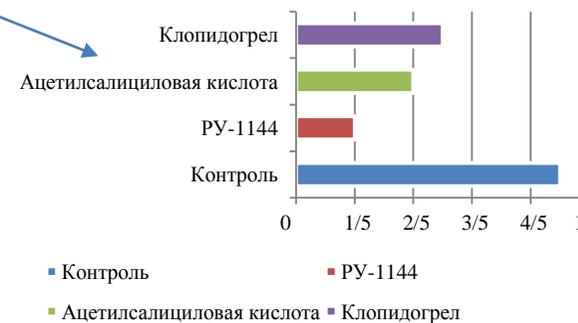


Рисунок 7.6. Антитромботическая активность соединения РУ-1144 на различных моделях тромбоза.

Наиболее опасным побочным эффектом приема антиагрегантных препаратов является увеличение риска кровотечений различного генеза [Cayla G., 2019]. С целью исследования влияния новых лекарственных средств на данный показатель использовали модель «время кровотечения». При исследовании нового производного бензимидазола на данной модели было показано уменьшение времени кровотечения по отношению к препаратам сравнения, что указывает на меньший риск развития данного нежелательного эффекта. Так соединение РУ-1144 приводило к недостоверному относительно контроля увеличению времени кровотечения на 27,5 %. Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел статистически значимо пролонгировали время кровотечения на 67,2 и 62,0% соответственно.

При изучении механизма действия новых антиагрегантных препаратов необходимо полное понимание роли тромбоцитов в процессе образования тромбов. Именно с этой целью было исследовано влияние соединения РУ-1144 на различные индукторы агрегации тромбоцитов [Swieringa F., 2014].

Агрегация тромбоцитов происходит посредством стимуляции различных эндогенных физиологических, механических и химических агонистов (рис. 7.1.). Основными физиологическими активаторами тромбоцитов, которые в норме образуются в области поврежденного сосуда являются АДФ, адреналин, серотонин, тромбин, тромбоксан  $A_2$ , а также коллаген и фактор фон Виллебранда [Xie Z., 2019; Xiang Q., 2019]. При взаимодействии основных индукторов со специфическими рецепторами на поверхности мембраны тромбоцита, происходит видоизменение его формы от дисковидной до сферической с образованием псевдоподий и переходу в активированное состояние, при котором наблюдаются процессы адгезии, агрегации, высвобождения содержимого гранул тромбоцита, а также активация сигнальной системы [Tomaiuolo M., 2017; Наубар Н., 2018]. Степень выраженности процесса агрегации зависит от природы и дозы индуктора агрегации. Именно с этой целью было проведено исследование механизма действия тестируемого образца РУ-1144 при использовании различных индукторов агрегации тромбоцитов.

Одним из наиболее активных агонистов агрегации тромбоцитов является АДФ, секретируемый из плотных дельта-гранул и направленный на угнетение

аденилатциклазы. В результате его взаимодействия со специфическими рецепторами происходит высвобождение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и дальнейший выброс содержимого гранул во внеклеточное пространство [Lever R.A., 2015]. Тестируемый образец РУ-1144, исследованный на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, достоверно подавлял данный процесс. При исследовании показателя  $\text{IC}_{50}$  соединения РУ-1144 было найдено значение равное 5,5 мкМ, а для препарата сравнения - ацетилсалициловой кислоты - 120 мкМ.

При дальнейшем изучении было проведено исследование влияния соединения РУ-1144 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, при которой происходит ингибирование аденилатциклазы и последующее угнетение синтеза цАМФ. Значение  $\text{IC}_{50}$  антиагрегантной активности в отношении данного индуктора для РУ-1144 составило 51,0 мкМ, а для препарата сравнения – 42 мкМ.

В процессе исследования антиагрегантного действия соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, значение показателя  $\text{IC}_{50}$ , составило 1,93, и 53,0 соответственно. Арахидоновая кислота является ключевым агентом в системе вторичных посредников, который в дальнейшем преобразуется в тромбоксан  $\text{A}_2$ , являющийся агонистом тромбоцитов, взаимодействующим с рецепторами поверхности тромбоцитов [Morel A., 2016], поэтому выраженное ингибирующее действие соединения РУ-1144 может указывать на снижение синтеза тромбоксана  $\text{A}_2$ .

Также при активации тромбоцитов происходит их связывание с молекулами адгезии, находящимися на поверхности тромбоцита. Одной из таких молекул является фактор фон Виллебранда [Мазуров А.В., 2011]. Агонист ристоцетин инициирует связывание фактора Виллебранда с мембранным гликопротеином Ib-IX тромбоцитов, вызывая их агрегацию без активации рецептора GPIIb-IIIa [Montgomery R.R., 2016]. Было показано, что соединение РУ-1144 практически не оказывает действия на функциональную активность тромбоцитов. Это может служить косвенным признаком влияния соединения РУ-1144 на конечные этапы агрегации тромбоцитов.

Коллаген играет важную роль в процессе агрегации тромбоцитов, осуществляя данный его с помощью гликопротеиновых рецепторов, расположенных на поверхности тромбоцитов (GPVI, GP I/IIa и GP Ib) [Induruwa I, 2018]. Именно поэтому на следующем этапе исследования соединений было проведено изучение коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов. В данном исследовании были изучены соединение-лидер РУ-1144 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота. В результате было показано, что тестируемый образец РУ-1144 в дозе 100 мкМ подавлял данный процесс на 95,6%, при дальнейшем уменьшении дозы индуктора происходило дозозависимое уменьшение агрегации тромбоцитов. Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал процесс агрегации тромбоцитов.  $IC_{50}$  соединения-лидера составил 9,2, что в 2,8 раз превосходило значение данного показателя препарата сравнения ацетилсалициловую кислоту.

Фактор активации тромбоцитов (ФАТ, PAF), образующийся в результате выработки  $PLA_2$  (фосфолипазы A2), что индуцирует клеточную активацию путем связывания с рецептором, сопряженным с G-белком, вызывая доза-зависимую агрегацию. Кроме того, ФАТ влияет на секрецию из плотных гранул и  $\alpha$ -гранул, что стимулирует активность GTP-азы в клеточных мембранах тромбоцитов человека, а также оборот полифосфоинозитидов, увеличивая внутриклеточный уровень свободного кальция [Braquet Pierre, 2019]. Предполагается, что ФАТ не работает через сигнальные пути, транслирующие эффекты АДФ, адреналина и коллагена, а его способность вызывать вторую волну агрегации и секрецию реализуется, главным образом, с помощью циклооксигеназного пути. Известно также, что ФАТ является паракринным фактором, обеспечивающим взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов при воспалительном процессе атеросклеротически поврежденного сосуда [Papakonstantinou V.D., 2017]. При исследовании антиагрегантной активности соединения РУ-1144 на модели ФАТ-индуцированной агрегации тромбоцитов была показана его дозозависимая ингибирующая активность. При этом,  $IC_{50}$  соединения РУ-1144 в данном исследовании составила 1,08 мкМ.

Следующим этапом изучения механизма действия соединения РУ-1144 было проведено исследование его влияния на агрегацию тромбоцитов, вызванную тромбином, который является одним из основных активаторов данного процесса и главным

ферментом системы свертывания крови. Тромбин катализирует биохимическую реакцию превращения фибриногена в фибрин, а также действует на тромбоциты за счет необратимого связывания с мембранными PAR-рецепторами тромбоцитов [Шатурный В.И., 2014]. При инициации воздействия тканевого фактора с факторами свертывания в плазме после нарушения сосудистого эндотелия и происходит образование тромбина на поверхности активированного тромбоцита. В качестве препарата сравнения был выбран дабигатран, являющийся по механизму действия ингибитором тромбина. При исследовании влияния соединения РУ-1144 на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов не было показано выраженной активности на данной модели изучения механизма действия соединения.

Также, было проведено изучение влияния соединения РУ-1144 на PAR1 рецепторы тромбоцитов. При исследовании данных литературы было выявлено, что активация PAR1 рецепторов происходит в условиях низких концентраций тромбина [Schoergenhofer C., 2018]. Считается, что именно опосредованная PAR1 активация тромбоцитов обеспечивает патологическое тромбообразование [Duvermay M., 2013]. При исследовании соединения РУ-1144 на модели агрегации тромбоцитов, вызванной агонистом PAR1 рецепторов было показано статистически значимое доза-зависимое ингибирование агрегации тромбоцитов. Показатель  $IC_{50}$  соединения РУ-1144 при этом составил 17,8 мкМ. Согласно литературным данным у ингибитора PAR1 рецепторов тромбоцитов ворапаксара  $IC_{50}$  антиагрегантной активности составляет 0,08 мкМ. Поэтому, можно сделать вывод о слабом действии соединения-лидера на PAR1-рецепторы тромбоцитов.

В последние годы было исследовано большое количество антагонистов рецепторов к тромбоксану: BMS-180291 (ифетробан), BM 13177 (сулотробан), и др. и блокаторов TP-рецепторов, дополнительно ингибирующих  $TxA_2$ -синтазу (пикотамид, ридогрел и EV-077), но ни один из данных соединений не проявил выраженной активности при их изучении в ходе клинических исследований [Kolandaivelu K. 2019]. Поэтому, соединение РУ-1144 было изучено на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов-U46619. В результате был найден показатель  $IC_{50}$ , который составил 19,3 мкМ.

Пуриновые P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов являются G-белок-сопряженными рецепторами (Gp(q)- и Gi-белками) при этом, P2Y<sub>1</sub> связан с активацией фосфолипазы C и фосфоинозитольным обменом, в свою очередь P2Y<sub>12</sub> связан с ингибированием аденилатциклазы [Nishimura A., 2017].

Мощной стимуляцией функциональной активности тромбоцитов является активация P2Y<sub>1</sub> рецепторов с помощью АДФ, которые вызывают начальное повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция и приводят к активации тромбоцитов [Сакаев М.Р., 2000]. При изучении методом малоуглового светорассеяния влияния на данный подтип пуриновых рецепторов тромбоцитов было показано, что соединение РУ-1144 в концентрации 1 мкМ ингибирует активацию тромбоцитов на 27,6% и уступает селективному антагонисту P2Y<sub>1</sub> рецепторов тромбоцитов MRS-2179 в 2,9 раза, что свидетельствует о слабом действии исследуемого вещества в отношении данного подтипа рецептора.

На следующем этапе исследования было проведено изучение действия соединения РУ-1144 на P2Y<sub>12</sub> рецепторы тромбоцитов при однократном внутривенном введении крысам. В качестве препарата сравнения был выбран блокатор данного подтипа рецепторов – клопидогрел. Оба соединения были изучены в диапазоне доз с целью дальнейшего поиска эффективной дозы ED<sub>50</sub>. В результате, было показано высокое ингибирующее действие тестируемого образца РУ-1144 в отношении P2Y<sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов, однако по показателю ED<sub>50</sub> оно уступало клопидогрелу в 2,7 раза.

При изучении воздействия соединения РУ-1144 в дозе 18,8 мг/кг на продукт метаболизма арахидоновой кислоты – ТxB<sub>2</sub> (стабильный метаболит ТxA<sub>2</sub>) было показано, что тестируемая субстанция при однократном внутривенном введении снижает уровень ТxB<sub>2</sub> в 2,3 раза по сравнению со значениями группы контроля, что свидетельствует о наличии у соединения влияния на образование продуктов арахидонового каскада.

Хорошо известно, что ацетилсалициловая кислота снижает синтез эндотелием простаглицлина, что приводит к побочным эффектам в виде гастропатии и уменьшению антитромбогенных свойств эндотелия сосудов [García-Rayado G., 2017]. При проведении

исследований было показано, что соединение РУ-1144, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, при однократном внутривенном введении незначительно повышает уровень

6-кетопростагландина, что указывает на отсутствие у тестируемой субстанции возможного нежелательного воздействия на желудочно-кишечный тракт и антитромбогенные свойства эндотелия.

Последним этапом изучения механизма действия соединения-лидера было исследование влияния РУ-1144 на уровень ионов внутриклеточного кальция. Известно, что ионы кальция не только являются важными внеклеточными факторами для активации гликопротеинов, но и важным внутриклеточным регулятором необходимым для процессов активации и агрегации тромбоцитов [Lin C.S., 2017]. При повышении тромбогенного потенциала крови происходит существенное увеличение концентрации внутриклеточного кальция за счет его секреции из плотных гранул тромбоцитов, а также входа ионов кальция внутрь клетки. Существует несколько путей входа ионов кальция в цитоплазму: при их высвобождении из внеклеточного пространства и из внутриклеточных депо, представленных рецептор-опосредованными ионными каналами и обратными  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменниками [Abiko L.A., 2016].

Поступление внеклеточного кальция в цитоплазму активирует фосфолипазу А2. Фосфолипаза А2 (PLA2) относится к надсемейству ферментов, которые катализируют гидролиз мембранных фосфолипидов, с образованием свободных жирных кислот и лизофосфолипидов, что в дальнейшем приводит к образованию продуктов арахидонового каскада [Leslie, C. C., 2015].

Исходя из вышесказанного, исследование общего уровня кальция в тромбоцитах было проведено в два этапа: в условиях кальциевой среды, а также при отсутствии кальция. В качестве препарата сравнения был выбран антагонист ионов кальция-верапамил.

На первом этапе исследования соединение под шифром РУ-1144 дозозависимо ингибировало увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах при добавлении индуктора тромбина, относительно данных полученных в контрольной группе животных, превосходя препарат сравнения. На втором этапе исследование

выполнялось в отсутствии внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . На всех этапах исследования соединение РУ-1144 изучалось в диапазоне концентраций для поиска показателя  $\text{IC}_{50}$ . Таким образом, данный показатель в присутствии кальция составил 27,8 мкМ, а в безкальциевой среде - 55,4 мкМ. Так, в результате данного исследования были получены данные свидетельствующие о том, что соединение РУ-1144 доза-зависимо снижает уровень общего кальция в тромбоцитах, стимулированных тромбином, как в кальциевой, так и в бескальциевой среде.

В результате изучения механизма антиагрегантного действия соединения РУ-1144 по влиянию на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами, продемонстрировало высокую способность в экспериментах *in vitro* оказывать защитное антиагрегационное действие на широкий спектр индукторов агрегации тромбоцитов. Наиболее выразительно тестируемое соединение блокировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную такими агонистами, как АДФ, арахидоновая кислота, коллаген и ФАТ (табл.7.2).

**Таблица 7.2. Влияние соединения РУ-1144 и ацетилсалициловой кислоты на различные индукторы агрегации тромбоцитов *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

№ п/п	Индукторы агрегации тромбоцитов	Концентрация индуктора	$\text{IC}_{50}$ , мкМ	
			РУ-1144	АСК
1.	РАФ (фактор активации тромбоцитов)	0,08 мкМ	1,1	-
2.	Арахидоновая кислота	50 мкМ	1,9	53
3.	АДФ	20 мкМ	5,5	120
4.	Коллаген	4 мкг/мл	9,2	26
6.	TFLLR-NH2 Trifluoroacetate salt (Агонист PAR1-рецепторов)	1 мкМ	17,8	-
7.	U 46619 (агонист тромбоксановых рецепторов)	3 мкМ	19,3	-
8.	Адреналин	5 мкМ	51	42
9.	Тромбин	0,5 ед/мл	330	-
10.	Ристоцетин	0,5 мг/мл	0	-

Примечания:

n-число проб в группе

\*-изменения достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ )

АСК- ацетилсалициловая кислота

Также соединение РУ-1144 при однократном внутрижелудочном введении блокирует  $P2Y_{12}$  рецепторы тромбоцитов, снижает уровень продукта арахидонового каскада - тромбоксана  $A_2$  в тромбоцитах. Кроме того, тестируемое соединение снижает уровень общего и внутриклеточного кальция в тромбоцитах.

В итоге данного исследования была найдена группа соединений- производных пиримидобензимидазола, важным сходством которых стало наличие в положении R1 1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-пропан-1-она, все представители данной группы проявляли как выраженную антиагрегантную, так и антиоксидантную активности.

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

## Выводы

1. Скаффолды на основе *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил пиримидобензимидазолов и *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил бензимидазолов проявили выраженные антиагрегантную и антиоксидантную активности, превосходя скаффолды: *N*-9-дитретбутил-4-гидроксифенил триазинобензимидазолы, *C*-11-2,6-дитретбутил-1-гидроксифенил-2,3-тиадиазинобензимидазолы, *N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-*N*9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы и *N*-7-дитретбутил-4-гидроксифенил-триазолобензимидазолы. При смещении дитретбутильного радикала из положения *N*-7; *N*-9 и *C*-11 в представленных группах происходило снижение антиагрегантной и антиоксидантной активности.
2. Соединение под шифром РУ-1144 (1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил)-фенил-пиримидобензимидазола гидрохлорид), в опытах *in vitro* оказывало выраженную антиагрегантную активность, превосходя препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 21,8 раз; при исследовании антиоксидантной активности, соединение-лидер уступало препарату сравнения дибунолу в 1,7 раз. По ингибированию внутрисосудистой агрегации тромбоцитов *in vivo* данное соединение превосходя ацетилсалициловую кислоту в 1,5 раза и незначительно уступая клопидогрелу на 30 %.
3. Соединение РУ-1144 оказывает выраженное антитромботическое действие на моделях артериальных тромбозов, индуцированных аппликацией хлорида железа(III) и электрического тока на сонную артерию крыс, превосходя в 3,5 и 2,5 раза соответственно по активности ацетилсалициловую кислоту и в 3,5 и 7,4 раза соответственно - препарат сравнения клопидогрел; а также предотвращает гибель 80% животных на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза на мышцах, на модели венозного тромбоза, индуцированного полной перевязкой нижней полой вены уменьшает массу образовавшихся тромбов в 3,4 и 1,9 раза по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом.
4. В условиях экспериментального некоронарогенного инфаркта миокарда, вызванного изопротеренолом на модели артериального тромбоза, индуцированного

апликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс, соединение РУ-1144 проявляет более выраженное антитромботическое действие, в сравнении с группой животных с экспериментальной патологией, замедляя образование тромба на 47,7 %.

5. Соединение РУ-1144 (по показателю  $IC_{50}$ ) блокирует агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами: фактором активации тромбоцитов (ФАТ) - 1,1 мкМ, арахидоновой кислотой - 1,9 мкМ, АДФ-5,5 мкМ, коллагеном - 9,2 мкМ, PAR1 - 17,8 мкМ, агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 - 19,3 мкМ, адреналином - 51 мкМ и тромбином - 330 мкМ.

6. Соединение РУ-1144 на модели тромбоза по методу Горога (Global Thrombosis Test) в 1,4 раза увеличивает время образования тромба по сравнению с группой контрольных животных и не оказывает влияние на лизис образовавшегося сгустка.

7. Величина  $ED_{50}$  в отношении блокирования  $P2Y_{12}$  рецепторов тромбоцитов соединения РУ-1144 и клопидогрела составили 16,9 и 6,1 мг/кг соответственно; при исследовании влияния соединения-лидера на уровень  $TxB_2$  в тромбоцитах, стимулированных арахидоновой кислотой установлено, что соединение превосходило ацетилсалициловую кислоту в 1,8 раз; исследуемое вещество повышало уровень 6-кето-простагландина  $F_{1\alpha}$  в отличие от ацетилсалициловой кислоты, которая напротив снижала данный показатель; а также уменьшало уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, активированных тромбином.

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

9. По величине показателя  $LD_{50}$  (749,2 мг/кг) соединение РУ-1144 при внутрибрюшинном введении можно отнести к 4 классу малотоксичных веществ, которое не оказывает нейротоксического действия в дозах 18,8 мг/кг ( $ED_{50}$ ), а также при ее увеличении в 2,7; 5,3 и 10,6 раз.

### **Практические рекомендации**

1. Синтез и поиск антиагрегантных и антитромботических соединений среди гибридных структур бензимидазола, имеющих дитретбутильный радикал в молекулярном остове, является перспективным направлением.
2. Соединение РУ-1144 (1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-1-гидроксипропил)-фенил-пиримидобензимидазола гидрохлорид) является перспективным соединением для детального доклинического изучения.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АСК - ацетилсалициловая кислота

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

АФК - активные формы кислорода

ДМСО - диметилсульфоксида

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ПГ - простагландины

ПГ<sub>2</sub> – простаглицлин

ПКА-протеинкиназа А

ПОЛ - перекисное окисление липидов

ССС – сердечно-сосудистая система

ТР-рецепторов - рецепторы тромбосана

ТхА<sub>2</sub> - тромбосан А<sub>2</sub>

ТхВ<sub>2</sub> - тромбосан В<sub>2</sub>

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

ЦОГ – циклооксигеназа

УТИ - условного терапевтического индекса

ФАТ (РАF) - фактор активации тромбоцитов

ФДЭ - фосфодиэстераза

ЭГТА - этиленгликольтетраацетат натрия

AV-блокада - атриовернтрикулярная блокада

BSA - бычий сывороточный альбумин

ED<sub>50</sub> - эффективная доза, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов (продолжает время окклюзии сонной артерии) на 50%

GP – гликопротеины

IC<sub>50</sub> - ингибирующая концентрация, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов на 50%

LD<sub>50</sub> - средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы

MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа

P2Y – пуриновые рецепторы тромбоцитов

PAR - протеазо-активированные рецепторы

PLA<sub>2</sub> - фосфолипаза A<sub>2</sub>

PI<sub>3</sub>K - фосфатидилинозитол-3-киназа

Syk (Spleen tyrosine kinase) - тирозинкиназа

TRAP - активатор рецепторов тромбина

U 46619 - агонист тромбоксановых рецепторов

vWF - фактора фон Виллебранда

## Список литературы

1. Алексеева А.А. Фармакологическая активность производимых бензимидазола, содержащих пространственно-затрудненные фенольные заместители, и их аналогов, проявляющих антиоксидантные и антирадикальные свойства. Авт.реф. дисс. канд. фарм. наук. – Волгоград: ВолгГМУ, 2007. – 48 с.
2. Белозерцева И.В., Драволина О.А., Тур М.А., Куварзин С.Р., Звартау Э.Э. Вызванная морфином реакция Штрауба, как модель спастичности у мышей: эффекты серотонинергических соединений//Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.-2015.-115(2).-С.73-79.
3. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения// Хим.-фарм. журн. - 2003. - Т. 37. - № 3. - С. 32–34.
4. Бокерия Л.А., Никитина Т.Г. и др. Этапное лечение пациента с ишемической болезнью сердца и онкопатологией//Клиническая физиология кровообращения.-2014.-4.-С.30-32
5. Бугаева Л.И., Кузубова Е.А., Букатин М.В., Спасов А.А. Нейротоксикологические свойства препарата «Бендазол»// Вестник ВолгГМУ. - 2012. -№ 2. - С. 83-86.
6. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Т.Л. Неробкова //Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ – 2-изд., перераб и доп. Под общ. ред. Р.У. Хабриева.– М.: Медицина – 2005. – С.277-295.
7. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.- 2012.- Т. 112.- № 12.- С. 86-90.
8. Габбасов З.А Попов Е.Г., Гаврилова И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов //Лабораторное дело. - 1989. - №10. - С.15-18.

9. Говорова Н.В. Лекционное пособие по изучению сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.-2014.-С. 48-50.

10. Гороховская Г.Н., Юн В.Л. Антитромбоцитарная терапия: современное представление и комплексный подход к проблеме атеротромбоза//Российский медицинский журнал.-2013.-34.- С. 1737-1741.

11. Жуковская О.Н., Спасов А.А., Кузьменко Т.А., Морковник А.С. и др. Синтез и фармакологическая активность трифторметилсодержащих имидазо[1,2-а]бензимидазолов// Химико-фармацевтический журнал.- 2018.- Т. 52.- № 5.- С. 3-9.

12. Жуковская О.Н., Спасов А.А., Гурова Н.А., Косолапов В.А., Кучерявенко А.Ф. и др. Фармакологическая активность производных 1,3-дигидро-2h-бензимидазол-2-тиона// Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2019.- Т. 82.- № 7.- С.- 3-9.

13. Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Цитопротекторное действие афобазола и его основного метаболита М-11 [Электронный ресурс] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины .- 2015 .- №1 .- С. 53-56

14. Калашников В.Ю., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А., Бондаренко И.З., Шестакова М.В., Дедов И.И. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний у больных сахарным диабетом, по данным федерального регистра российской федерации (2013-2016 гг.)// Сахарный Диабет.- 2019.- Т. 22.- № 2.- С. 105-114.

15. Калинина О.С., Зиганшин А.У. Агонисты и антагонисты P2Y-рецепторов в современной клинической практике// Вестник современной клинической медицины.- 2017.- Т. 10.- № 1.- С.- 22-28.

16. Косолапов В.А., Ельцова Л.В., Спасов А.А., Анисимова В.А. Антиоксидантные свойства производного пирролобензимидазола - соединения РУ-792 - в эксперименте//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2013.-155(4).-С. 453-456.

17. Косолапов В.А., Сороцкий Д.В., Васильев П.М., Жуковская О.Н. Направленный поиск новых антиоксидантных соединений методами in silico и in

vitro //Вестник Волгоградского Государственного Медицинского Университета .- 3 (67).- 2018.- С. 24-27

18. Корокина Л.В., Покровский М.В., Кудрявцев К.В., Корокин М.В., и др. Пути поиска новых мишеней для фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции//Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2019.- Т. 82.- № 9.- С.- 36-44.

19. Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г. и др. Тромбоциты: современный взгляд на структуру и функции//Патогенез.-2016.-14(1).-С.4-13.

20. Кутафина, Н. В., Завалишина, С. Ю. Механизмы функционирования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. - 2012.- (1).- С. 30-37.

21. Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Петров В.И., Анисимова В.А. Антиагрегантная активность нового производного бензимидазола// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2013.- Т. 156.- № 12.- С. 760-762.

22. Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Анисимова В.А. Влияние нового антиоксидантного вещества эноксифол на агрегацию тромбоцитов и реологические свойства крови лабораторных крыс при экспериментальном диабете// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2015.- Т. 160.- № 12.- С. 721-724.

23. Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Анисимова В.А. Методологические подходы к изучению механизма антиагрегантного действия нового производного бензимидазола//Тромбоз, гемостаз и реология.-2016.-67(3).-С. 238-239.

24. Лазуко С.С., Скринаус С.С. Дибазол модулирует эндотелийзависимое расслабление и функциональную активность АТФ-чувствительных калиевых каналов//Вестник фармации.-2014.-С.82-89.

25. Ланкин В.З. Изучение аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов тканей при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой // Труды московского общества испытателей природы. – 1975. – Т. 52. – С. 73-78

26. Люсов В.А. Метод графической регистрации агрегации тромбоцитов

и изменения ее при ишемической болезни сердца //Кардиология. – 1971. - №8. – С. 459-461.

27. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов//М.-Литтерра.- 2011.- С. 248.

28. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б., Белозерская Г.Г., и др. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз// В книге: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России. Москва.- 2012.- С. 453-479.

29. Мандель И. Д. Кластерный анализ / И. Д. Мандель. – М.: Финансы и статистика, 1988. – 176 с.

30. Миронов А.Н. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств /Под ред. А.Н. Миронова.–Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

31. Михайлова И. Е. Антитромбоцитарные препараты в профилактике и лечении коронарного атеротромбоза. Обзор литературы //Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2014. С. 55-66

32. Петров В.И., Шаталова О.В., Герасименко А.С., Горбатенко В.С. Сравнительный анализ антитромботической терапии у пациентов с фибрилляцией предсердий // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии.-2019.-15(1).-С. 49-53.

33. Попова Л.В., Бокарев И.Н. Применение антиагрегантов в клинической практике // Практическая медицина.- №. 6 (82).- 2014.- С. 22-28.

34. Попова Л.В., Аксенова М.Б., Хлевчук Т.В. Антиагрегантная терапия в кардиологии // Клиническая медицина.- 2016.- 94(10).-С. 729-735

35. Пульков В.Н. Патент на изобретение №976955//1982.

36. Сакаев М.Р. Изучение влияния некоторых синаптотропных веществ на тромбоцитарную активность: дис. канд. биол. наук: 14.00.25 /Сакаев Марат Рустамович. – СПб., 2000. – 115с.

37. Саноцкий И.В., Уланова И.П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. - М.: «Медицина», 1975. -С. 327
38. Соколовская А.А., Вирюс Э. Д., Александрин В. В., Роткина А. С., и др. Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс// Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal.-2018. - 62(1).-С.- 25-35
39. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Косолапов В.А., Анисимова В.А. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2013.- Т. 155.- № 6.- С. 740-742.
40. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А. Кальций-зависимый механизм антиагрегантного действия соединения РУ-891// Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2014.- Т. 77.- № 3.- С. 16-19.
41. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Сиротенко В.С., Анисимова В.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А., Морковник А.С. Антитромботическая активность нового производного diazepino[1,2-a]benzimidazole на модели артериального тромбоза крыс без сопутствующей патологии и в условиях экспериментального инфаркта миокарда// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2018.- Т. 166.- № 12.- С. 710-713.
42. Танашян М.М., Шабалина А.А., Антонова К.В., Максимова М.Ю. и др. Изменение показателей гемостаза при ишемическом инсульте: роль хронической гипергликемии// Научно-практический журнал «Тромбоз, гемостаз и реология». -2017. -№1. -С. 21-26.
43. Трегубова И.А., Косолапов В.А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы// Успехи физиологических наук.- 2012.- Т. 43.- № 1.- С.- 75-94.
44. Чазов Е.И., Староверов И.И. Инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST на ЭКГ//В книге: Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний Москва.- 2015.- С. 340-367.

45. Шатурный В.И. Шахиджанов С.С. Свешникова А.Н. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови// Биомед. химия.- 2014.-Т. 60.- №2.-С. 182-200.
46. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Селецкая В.В., Зеленская А.В., и др. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине// Журнал фундаментальной медицины и биологии.-2016.- № 3.- С.-4-12.
47. Шляхто Е.В., Звартау Н.Э., Виллевалде С.В., Яковлев А.Н., Соловьева А.Е. и др. Система управления сердечно-сосудистыми рисками: предпосылки к созданию, принципы организации, таргетные группы// Российский кардиологический журнал. - 2019.- Т. 24.- № 11.- С.- 69-82.
48. Abiko L.A., Vitale P.M., Favaro D.C., Nauk P., Model for the allosteric regulation of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX // Proteins. -2016.-84(5).-P. 580-90.
49. Annie-Jeyachristy S., Geetha A., Surendran R. Changes in the level of cytosolic calcium, nitric oxide and nitric oxide synthase activity during platelet aggregation: an in vitro study in platelets from normal subjects and those with cirrhosis// J Biosci. -2010.-33(1).-P.45-53
50. Anjum I., Kashif T., Ahmed M.M., Sohail W., Sarwar M., Khokhar I. Dual or Mono Antiplatelet Therapy for the Prevention of Ischemic Stroke: A Literature Review// Cureus. - 2018.- 10(6).- P.-2847.
51. Bala M.M., Celinska-Lowenhoff M., Szot W., Padjas A. et al. Antiplatelet and anticoagulant agents for secondary prevention of stroke and other thromboembolic events in people with antiphospholipid syndrome // Cochrane Database Syst Rev.- 2017.-P. 2- 10.
52. Baldisserotto A., Demurtas M., Lampronti I., Tacchini M. et al. Synthesis and evaluation of antioxidant and antiproliferative activity of 2-arylbenzimidazoles // Bioorg Chem.- 2019.- P. 1-12.
53. Barbarawi M., Kheiri B., Zayed Y., Gakhal I. et al. Aspirin Efficacy in Primary Prevention: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials // High Blood Press Cardiovasc Prev.- 2019.- 26(4).-P.-283-291.

54. Bath P.M., May J., Heptinstall S. Clinical utility of remote platelet function measurement using P-selectin: assessment of aspirin, clopidogrel, and prasugrel and bleeding disorders// *Platelets*.- 2018.-29(5).- P.-425-430.
55. Baqi Y., Müller C.E. Antithrombotic P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists: recent developments in drug discovery// *Drug Discov Today*.- 2019.- 24(1).-P. 325-333.
56. Becatti M., Marcucci R., Bruschi G., Taddei N. et al. Oxidative Modification of Fibrinogen Is Associated With Altered Function and Structure in the Subacute Phase of Myocardial Infarction// *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.-2014.-34.-P.1355–1361.
57. Bedenis R., Lethaby A., Maxwell H., Acosta S., Prins M.H. Antiplatelet agents for preventing thrombosis after peripheral arterial bypass surgery//*Cochrane Database Syst Rev*.- 2015.-P.13-19
58. Belova L.A. Dipyridamole in the treatment and prevention of cerebral venous thrombosis in women using hormonal contraceptives // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova*.- 2017.-117(12).- P.- 116-123.
59. Benimana O., Zhao L., Kong Y., Li Z., Xie Z. The progress in the research of antiplatelet agents (1995-2017)// *Future Med Chem*.-2017.-9(10).-P.1087-1110.
60. Berger J.S. Oral Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of Acute Coronary Syndrome // *Am J Cardiovasc Drugs*.- 2018.- 18(6).-P. 457-472.
61. Berger M., Raslan Z., Aburima A., Magwenzi S. et al. Atherogenic lipid stress induces platelet hyperactivity through CD36-mediated hyposensitivity to prostacyclin-; the role of phosphodiesterase 3A // *Haematologica*. 2019.- 9. P. 1-45.
62. Bergmeier W., Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.*- 2009.- Vol. 7.- P. 187–190.
63. Berrani A., Marmouzi I., Kharbach M., Bouyahya A. et al. Anabasis aretioides Coss. & Moq. phenolic compounds exhibit in vitro hypoglycemic, antioxidant and antipathogenic properties // *J Basic Clin Physiol Pharmacol*.- 2018.- 20;30(2).-P. 251-257.

64. Berwanger O., Nicolau J.C., Carvalho A.C., Jiang L. et al. Ticagrelor vs Clopidogrel After Fibrinolytic Therapy in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial // *JAMA Cardiol.*- 2018.-1;3(5)P.- 391-399.
65. Bisht S., Faiq M., Tolahunase M., Dada R. Oxidative stress and male infertility// *Nat Rev Urol.*- 2017.-14(8).-P. 470-485.
66. Borem L.M.A., Neto J.F.R. et al. The role of the angiotensin II type I receptor blocker telmisartan in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a brief review//*Hypertens. Res.*-2018.-41(6).-P.394-405.
67. Born, G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962; 9;194: 927-929.
68. Braquet Pierre. *Handbook of PAF and PAF Antagonists*// CRC Press.- 2019.-P. 1-282.
69. Brown I.E., Rigor R.R., Schutzman L.M., Khosravi N., et al. Pulmonary Arterial Thrombosis in a Murine Model of Blunt Thoracic Trauma // *Shock.*- 2018.-50(6).-P. 696-705.
70. Buccheri S., Capodanno D., James S., Angiolillo D.J. Bleeding after antiplatelet therapy for the treatment of acute coronary syndromes: a review of the evidence and evolving paradigms // *Expert Opin Drug Saf.*- 2019.-18(12).-P.-1171-1189.
71. Burke J. E., Dennis E.A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 2009. Vol. 50. P. 237– 242.
72. Canobbio I., Cipolla L., Guidetti G.F. et al. The focal adhesion kinase Pyk2 links Ca<sup>2+</sup> signalling to Src family kinase activation and protein tyrosine phosphorylation in thrombin-stimulated platelets// *Biochem J.*-2015.-469(2).P.199-210.
73. Capodanno D., Alberts M., Angiolillo D. J. Antithrombotic therapy for secondary prevention of atherothrombotic events in cerebrovascular disease //*Nature Reviews Cardiology.* - 2016. - 6. - P.1-12.
74. Cayla G., Cornillet L., Ledermann B., Schmutz L., Lonjon C., Lattuca B. Severe bleeding with antiplatelet therapy: What to do?// *Presse Med.*- 2019.- 48(12).-P.- 1416-1421.

75. Chang Y., Hsu W.H. Structure-activity relationship of three synthesized benzimidazole-based oligosaccharides in human platelet activation //Int. J. Mol. Med.-2017.-40(5).-P.1520-1528.
76. Chen H. Role of thromboxane A<sub>2</sub> signaling in endothelium-dependent contractions of arteries //Prostaglandins Other Lipid. Mediat.-2018.-134.-P.32-37.
77. Chiang J.Y., Lee S.H., Chen Y.C., Wu C.K. et al. Metabolomic Analysis of Platelets of Patients With Aspirin Non-Response //Front Pharmacol.-2019.- 10:1107.-P. 1-8.
78. Crea F., Libby P. Acute coronary syndromes: the way forward from mechanisms to precision treatment //Circulation.-2017.-136.-P.1155–1166.
79. Dadjou Y., Safavi S., Javad K. Risks and Benefits of Dual Antiplatelet Therapy Beyond 12 Months After Coronary Stenting // Medicine (Baltimore).- 2016.- 95(22).- P. 1-7.
80. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history // Thromb. Res.- 2012.- Vol.- 129.- No. 3.- P. 250–256.
81. de Queiroz M.R., de Sousa B.B., da Cunha Pereira D.F., Mamede C.C.N. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function //Toxicon.- 2017.-133.-P.-33-47.
82. Depta J. P., Bhatt D. L. New approaches to inhibiting platelets and coagulation //Annual review of pharmacology and toxicology. – 2015.-P. 26-32
83. Di Minno G. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol//J. Pharmacol. Exp. Ther. -1983.- 225(1).- P.57-60.
84. Di Nisio M., van Es N., Büller H.R. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism// Lancet.- 2016.- 17.-388(10063).-P.-3060-3073.
85. Dobesh P.P., Varnado S., Doyle M. Antiplatelet Agents in Cardiology: A Report on Aspirin, Clopidogrel, Prasugrel, and Ticagrelor // Curr Pharm Des.- 2016.- 22(13).-P.- 1918-1932.
86. Dogné J.M., Hanson J., de Leval X., Masereel B. et al. New developments on thromboxane modulators // Mini Rev Med Chem.- 2004.- 4(6).-P. 649-657.

87. Duvernay M., Young S., Gailani D., Schoenecker J. Protease-Activated Receptor (PAR) 1 and PAR4 Differentially Regulate Factor V Expression from Human Platelets// *Mol Pharmacol.*- 2013.- 83(4).- P. 781–792.
88. El-Menyar A., Asim M., Al-Thani H. Obesity Paradox in Patients With Deep Venous Thrombosis // *Clin Appl Thromb Hemost.*- 2018.- 24(6).-P.- 986-992.
89. Eichinger S. Cancer associated thrombosis: risk factors and outcomes // *Thromb Res.*- 2016.- 140 Suppl 1.-P. 12-17.
90. Florescu C., Mustafa E.R., Târtea E.A., Florescu D.R., Albu V.C. Antiplatelet therapy in secondary ischemic stroke prevention - a short review // *Rom J Morphol Embryol.*- 2019.-60(2).-P.- 383-387.
91. Franchi F., Angiolillo D. J. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome // *Nature Reviews Cardiology.* – 2015.- 12(1).- P.30-47.
92. Frattani F.S., Lima L.M., Barreiro E.J., Zingali R.B. The antithrombotic and haemostatic effects of LASSBio-752: a synthetic, orally active compound in an arterial and venous thrombosis model in rats // *J. Pharm. Pharmacol.*- 2017.-69(10).- P. 1374-1380.
93. Fredman G, Spite M. Specialized pro-resolving mediators in cardiovascular diseases// *Mol Aspects Med.*- 2017.- 58.-P.- 65-71.
94. Fuentes E., Badimon L., Caballero J. et al. Protective mechanisms of adenosine 5'-monophosphate in platelet activation and thrombus formation//*Thromb. Haemost.*-2014.-111(3).-P.491-507.
95. Fuentes E., Palomo I. Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging // *Life Sci.* -2016.- 148.-P. 17-23.
96. Fuentes E., Moore-Carrasco R., de Andrade Paes A.M., Trostchansky A. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction// *J Cardiovasc Pharmacol Ther.*- 2019.- 24(6).-P.509-520.
97. Gaba K., Ringleb P.A., Halliday A. Asymptomatic Carotid Stenosis: Intervention or Best Medical Therapy? // *Curr Neurol Neurosci Rep.*- 2018.- 18(11).-P. 80.

98. Gao Y., Yu C., Pi S., Mao L., et al. The role of P2Y<sub>12</sub> receptor in ischemic stroke of atherosclerotic origin // *Cell Mol Life Sci.*- 2019.-76(2).-P. 341-354.
99. García-Rayado G., Sostres C., Lanás A. Aspirin and omeprazole for secondary prevention of cardiovascular disease in patients at risk for aspirin-associated gastric ulcers// *Expert. Rev. Clin.Pharmacol.*- 2017.-10(8).-P. 875-888.
100. Ghoshal K., Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis// *Sci. World J.*- 2014.- P. 1–16.
101. Godo S., Shimokawa H. Endothelial Functions// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2017.-37(9).- P.108-114.
102. Gorog, D. A., Farag, M., Patel, H. Adjunctive therapies to reduce thrombotic events in patients with a history of myocardial infarction: role of vorapaxar // *Drug Design, Development and Therapy.*- 2015.- Vol. 2015.-9.- P. 3801-3809
103. Gratacap M.P. Martin V. Valéra M.C. et al. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo// *Blood.*-2009.-114(9).-P. 1884-1892
104. Greene T.K., Schiviz A. et al. Towards a standardization of the murine tail bleeding model//*J.Thromb. Haemost.*-2010.-8(12).-P. 2820-2822.
105. Guglielmi G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience//*J. Neurosurg.* -1991.- 75(1).- P.8-14.
106. Guthrie R. Review and management of side effects associated with antiplatelet therapy for prevention of recurrent cerebrovascular events // *Adv Ther.*- 2011.- 28(6).-P.- 473-82.
107. Hammer Y., Iakobishvili Z., Hasdai D., Goldenberg I., et al. Guideline-Recommended Therapies and Clinical Outcomes According to the Risk for Recurrent Cardiovascular Events After an Acute Coronary Syndrome// *J. Am. Heart. Assoc.*-2018.- 18;7.-P.-18.
108. Haybar H., Khodadi E., Zibara K., Saki N. Platelet Activation Polymorphisms in Ischemia // *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.*- 2018.-18(2).- P. 153-161.

109. Hess C. N., Norgren L., Ansel G. M., Capell W. H. A Structured Review of Antithrombotic Therapy in Peripheral Artery Disease With a Focus on Revascularization// *Circulation*.- 2017.-135.-P. 2534–2555.

110. Heifetz-Li J.J., Abdelsamie S., Campbell C.B., Roth S., Fielding A.F., Mulligan J.P. Systematic review of the use of pentoxifylline and tocopherol for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*.- 2019.-128(5).-P. 491-497.

111. Henke P.K., Varma M.R. Fibrotic injury after experimental deep vein thrombosis is determined by the mechanism of thrombogenesis//*Thrombosis and Haemostasis*.-2007.-98.-P. 1045-1055.

112. Hirsh J., Eikelboom J.W., Chan N.C. Fifty years of research on antithrombotic therapy: Achievements and disappointments // *Eur J Intern Med*.-2019.-P. 70.-P. 1-7.

113. Houston S.A., Ugusman A., Gnanadesikan S., Kennedy S. An investigation of the antiplatelet effects of succinobucol (AGI-1067) // *Platelets*.- 2017.-28(3).- P. 295-300.

102. Huan Z., Morrow D. A. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events //*New England Journal of Medicine*. – 2012. – T. 366. – No. 15. – C. 1404-1413.

103. Induruwa I., Moroi M., Bonna A., Malcor J.D., et al. Platelet collagen receptor Glycoprotein VI-dimer recognizes fibrinogen and fibrin through their D-domains, contributing to platelet adhesion and activation during thrombus formation// *J Thromb Haemost*.- 2018.- 16(2).-P. 389-404.

104. Irwin S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // *Psychosomatics*. – 1964. – V.5. – P. 174 -179.

105. Jacobson K.A., Müller C.E. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors// *Neuropharmacology*.- 2016.-104.-P. 31-49.

106. Jamasbi J., Aysbe K., Goto S. et al. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future//*Thromb. Haemost*.-2017.-117(7).-P.1249-1257.

107. Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants// *J. Am. Chem. Soc.*- 2001.- 123. P. - 1173-1183
108. Jang J.Y., Min J.H., Wang S.B., Chae Y.H. et al. Resveratrol inhibits collagen-induced platelet stimulation through suppressing NADPH oxidase and oxidative inactivation of SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2. *Free Radical Biol Med.*- 2015.-89.-P. 842–851.
109. Jneid H. Ticagrelor or Prasugrel in Acute Coronary Syndromes - The Winner Takes It All?// *N Engl J Med.*- 2019.- 17.-381(16).-P.-1582-1585.
110. Kalathottukaren M.T., Kizhakkedathu J.N. Mechanisms of blood coagulation in response to biomaterials: Extrinsic factors// *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications.*- 2018.-6.-P.1-12
111. Kattoor A.J., Pothineni N.V.K., Palagiri D., Mehta J.L. Oxidative Stress in Atherosclerosis // *Curr Atheroscler Rep.*- 2017.- 19(11).-P. 42-46.
112. Keri R.S., Rajappa C.K., Patil S.A., Nagaraja B.M. Benzimidazole-core as an antimycobacterial agent // *Pharmacol Rep.*- 2016.- 68(6).-P.-1254-1265.
113. Kim J.H., Lee J., Kang S., Moon H., Chung K.H., Kim K.R. Antiplatelet and Antithrombotic Effects of the Extract of *Lindera obtusiloba* Leaves//*Biomol. Ther. (Seoul).*-2016.-24(6).-P.659-664.
114. Kseneva S.I., Borodulina E.V., Trifonova O.Y., Udut V.V. Cardiac Autonomic Drive during Arterial Hypertension and Metabolic Disturbances//*Bull Exp Biol Med.*- 2016.- 161(2).-P. 237-240.
115. Knights K. M., Mangoni A. A., Miners J. O. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity //*Expert Rev. Clin. Pharmacol.*- 2010.- Vol. 3.- No. 6.- P. 769–776.
116. Kolandaivelu K., Bhatt D. L. Novel Antiplatelet Therapies// *Platelets.*- 2019.№55.- P. 991–1015.

117. Kosolapov V.A., Spasov A.A., Anisimova V.A., Zhukovskaya O.N. Condensed Benzimidazoles Are a Novel Scaffold for Antioxidant Agents' Search and Development// *Antioxidants*.- 2019.- P.- 245-253.
118. Koupenova M., Ravid K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity//*Front. Pharmacol.*-2018.-9(37).-P.1-9.
119. Kügelgen I.V. Pharmacology of P2Y Receptors//*Brain Res Bull.*-2019.-18.- P.9161-9230.
120. Kuo H.L., Lien J.C., Chang C.H. et al. NP-184[2-(5-methyl-2-furyl benzimidazole)], a novel orally active antithrombotic agent with dual antiplatelet and anticoagulant activities//*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*-2010.- 6.- P.495-505.
121. Kurz K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride//*Thrombosis Research*. -1990. -15.- P.269-280.
122. Larsen J.B., Hojbjerg J.A., Hvas A.M. The Role of Platelets in Cancer-Related Bleeding Risk: A Systematic Review //*Semin Thromb Hemost.*- 2019.- 30.- 1-12
123. Leslie C.C. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease// *Journal of Lipid Research*.- 2015.- 56(8).-P. 1386–1402.
124. Lever R.A., Hussain A., Sun B.B., Sage S.O., Harper A.G. Conventional protein kinase C isoforms differentially regulate ADP- and thrombin-evoked Ca<sup>2+</sup> signalling in human platelets// *Cell Calcium*. 2015.- 58(6).-P. 577-588.
125. Lewis S.R., Pritchard M.W., Schofield-Robinson O.J., Alderson P., Smith A.F. Continuation versus discontinuation of antiplatelet therapy for bleeding and ischaemic events in adults undergoing non-cardiac surgery// *Cochrane Database Syst Rev*.- 2018.-18.-P.-7-15
126. Leung A., Heal C., Perera M., Pretorius C. A systematic review of patient-related risk factors for catheter-related thrombosis // *J Thromb Thrombolysis*.- 2015.- 40(3).-P. 363-373.
127. Li H., Horke S., Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis// *Atherosclerosis*.- 2014.-237(1).-P. 208–219.

128. Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* -2010.-30(12).-P.2341-2349.
129. Li R., Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib–IX–V complex// *J. Thromb. Haemost.* 2013. Vol. 11, No. 4. P. 605–614.
130. Lin C.S., Chen T.H., Lin I.H., Lee A.R. et al. The novel compound MP407 inhibits platelet aggregation through cyclic AMP-dependent processes// *Eur J Pharmacol.*-2017.- 15;815.-P. 324-331.
131. Lindkvist M., Fernberg U., Ljungberg L.U., et al. Individual variations in platelet reactivity towards ADP, epinephrine, collagen and nitric oxide, and the association to arterial function in young, healthy adults// *Thromb Res.*-2019.-174.-P.5-12.
132. Liu L.L., Li X. Sibelium in combination with dibazole in the treatment of angioneurotic headache//*J. Biol.Regul.Homeost. Agents.*-2017.-31(3).-P.653-657.
133. Liu M-Y., Ren Y-P., Wei W-L. et al. Changes of Serotonin (5-HT), 5-HT<sub>2A</sub> Receptor, and 5-HT Transporter in the Sprague-Dawley Rats of Depression, Myocardial Infarction and Myocardial Infarction Co-exist with Depression// *Chin. Med. J. (Engl.)*.- 2015.- Vol. 128.- No. 14.- P. 1905–1909.
134. Lu H., Daugherty A. Atherosclerosis// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*- 2015.- 35(3).- P.- 485-491.
135. Malekmohammad K., Sewell R.D.E., Rafieian-Kopaei M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects// *Biomolecules.* 2019.- 25;9(8).- P. 1-19.
136. Macwan A.S., Boknäs N., Ntzouni M.P. et al. Gradient-dependent inhibition of stimulatory signaling from platelet G protein-coupled receptors// *Haematologica.*-2019.-P.815
137. Manasa K., Vani R. Influence of Oxidative Stress on Stored Platelets//*Advances in Hematology.*-2016.-V.- 2016.-P.1- 6
138. Marcinczyk N., Jarmoc D., Leszczynska A., Zakrzeska A. et al. Antithrombotic Potential of Tormentil Extract in Animal Models//*Front. Pharmacol.*- 2017.-Vol.2.-P. 1-12

139. Margraf A., Zarbock A. Platelets in Inflammation and Resolution // *J Immunol.*- 2019.- 1;203(9).-P.-2357-2367.
140. McFadyen J.D., Schaff M., Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis//*Nat. Rev. Cardiol.*-2018.-15.-P.181–191.
141. Melkonian M., Jarzebowski W., Pautas E., Siguret V. Bleeding risk of antiplatelet drugs compared with oral anticoagulants in older patients with atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis // *J Thromb Haemost.*- 2017.-15(7).-P.-1500-1510.
142. Melnikov I.S., Kozlov S.G., Saburova O.S., Avtaeva Y.N., Prokofieva L.V. et al. Current position on the role of monomeric C-reactive protein in vascular pathology and atherothrombosis // *Curr Pharm Des.*- 2019.- 16.P.- 23-31
143. Metharom P., Berndt M. C., Baker R. I., Andrews R. K. Current State and Novel Approaches of Antiplatelet Therapy //*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*-2015.-35.-P. 1327–1338
144. Michelson A. D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease //*Nature Reviews Drug Discovery.* – 2010. -9(2).- P. 154-169.
145. Millionis H., Lontos A., Vemmos K., Spengos K. Antiplatelet Treatment in Stroke: New Insights // *Curr Pharm.*-2016.- 22(29).-P. 4617-4626.
146. Miyazaki Y., Suwannasom P., Sotomi Y., Abdelghani M. Single or dual antiplatelet therapy after PCI// *Nature Reviews Cardiology.*-2017.- Vol. 14.- P. 294–303.
147. Mohamed A.R., El-Hadidy W.F., Mannaa H.F. Assessment of the prophylactic role of aspirin and/or clopidogrel on experimentally induced acute myocardial infarction in hypercholesterolemic rats//*Drugs R. D.*-2014.-14(4).-P. 233-239.
148. Montgomery R.R., Flood V.H. What have we learned from large population studies of von Willebrand disease? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*- 2016.- 2(1).-P. 670-677.

149. Morel A., Miller E., Bijak M., Saluk J. The increased level of COX-dependent arachidonic acid metabolism in blood platelets from secondary progressive multiple sclerosis patients// *Mol. Cell. Biochem.*- 2016.- 420.-P. 85–94.
150. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J. et al. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association)//*Circulation.*-2016.-133.-P. 38–60.
151. Munzer P., Walker-Allgaier B., Geue S. et al. CK2 $\beta$  regulates thrombopoiesis and Ca<sup>2+</sup>-triggered platelet activation in arterial thrombosis//*Blood.*-2017.-130(25).-P.2774-2785.
152. Nalini S., Sampath P. Paradoxical Actions of Antioxidants in the Oxidation of Low Density Lipoprotein by Peroxidases//*J. Clin. Invest.* -Volume 95.- 1995.-P.-2594-2600.
153. Navarrete-Vazquez G., Hidalgo-Figueros S., Torres-Piedra L. et al. Synthesis, vasorelaxant activity and antihypertensive effect of benzo[d]imidazole derivatives// *Bioorg. Med. Chem.*-2010.-11.-P.3985-3991.
154. Neochoritis C.G., Zarganes-Tzitzikas T, Tsoleridis C.A. et al One-pot microwave assisted synthesis under green chemistry conditions, antioxidant screening, and cytotoxicity assessment of benzimidazole Schiff bases and pyrimido[1,2-a]benzimidazol-3(4H)-ones// *Eur. J. Med. Chem.*-2011.-46(1).-P.297-306.
155. Nieman M.T. Protease-activated receptors in hemostasis // *Blood.* 2016.-128(2).- P. 169-77.
156. Nishimura A., Sunggip C., Oda S., Numaga-Tomita T., et al. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular disease// *Pharmacology & Therapeutics.*-2017.-Volume 180.- P. 113-128.
157. Noma K., Higashi Y. Cilostazol for treatment of cerebral infarction // *Expert Opin Pharmacother.*- 2018.-19(15).- P.-1719-1726.
158. Ozaki Y., Asazuma N., Suzuki-Inoue K., Berndt M.C. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling // *J Thromb Haemost.*- 2005.- 3(8).-P. 1745-1751.
159. Paciaroni M., Ince B., Hu B., Jeng J.S., et al. // *Cardiovasc Ther.*- 2019.- 1-20.

160. Panova-Noeva M., Wagner B., Nagler M., Arnold N., et al. Relation between platelet coagulant and vascular function, sex-specific analysis in adult survivors of childhood cancer compared to a population-based sample // *Sci Rep.*-2019.- 27.-9(1).-P. 20-29.

161. Papakonstantinou V.D., Lagopati N., Tsilibary E.C. Demopoulos C.A. A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New Class of Potent Metal-Based Anti-Inflammatory Drugs Induce Anticancer Properties? // *Bioinorganic Chemistry and Applications.*-Volume 2017.- P. 1-19.

162. Papapanagiotou A., Daskalakis G., Siasos G., Gargalionis A., Papavassiliou A.G. et al. The Role of Platelets in Cardiovascular Disease: Molecular Mechanisms // *Curr Pharm Des.*- 2016.-22(29).-P.-4493-4505.

163. Patrignani P., Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs // *Biochim Biophys Acta.*- 2015.- 1851(4).-422-432.

164. Patrono C., Morais J., Baigent C., Collet J.P. et al. Antiplatelet Agents for the Treatment and Prevention of Coronary Atherothrombosis // *J Am Coll Cardiol.*- 2017.-70(14).-P. 1760-1776.

165. Patelis N., Kakavia K., Maltezos K., Damaskos C., et al. An Update on Novel Antiplatelets in Vascular Patients// *Curr Pharm Des.*- 2018.-24(38).-P. 4558-4563.

166. Plotnikov G.P., Gruzdeva O.V., Fanaskova E.V., Akbasheva O.E., Uchasova E.G. Evaluation of the hemostatic potential at coronary artery bypass surgery during long-term aspirin therapy// *Ter Arkh.*- 2016.-88(12).-P.-21-27.

167. Plow E.F., Wang Y., Simon D.I. The search for new antithrombotic mechanisms and therapies that may spare hemostasis // *Blood.*- 2018.- 26.-131(17).-P. 1899-1902.

168. Phillip Owens III A. , Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here// *Thromb Haemost.*- 2014.- 104(3).- P. 432–439.

169. Pircher J., Engelmann B., Massberg S., Schulz C. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis // *Thromb Haemost.*- 2019.- 119(8).-P.-1274-1282.

170. Poredos P., Jezovnik M.K. Do the Effects of Secondary Prevention of Cardiovascular Events in PAD Patients Differ from Other Atherosclerotic Disease?// *Int J Mol Sci.*- 2015.- 25;16(7). -P.- 14477-14489.
171. Poredoš P. Interrelationship between venous and arterial thrombosis // *Int Angiol.*- 2017.-36(4).-P.- 295-298.
172. Pultar J., Wadowski P.P., Panzer S., Gremmel T. Oral antiplatelet agents in cardiovascular disease // *Vasa.*- 2019.- 48(4).-P. 291-302.
173. Rakic M., Persic V., Kehler T., Bastiancic A.L., et al. Possible role of circulating endothelial cells in patients after acute myocardial infarction // *Med Hypotheses.*- 2018.-117.-P.-42-46.
174. Randriamboavonjy V., Fleming I. Platelet communication with the vascular wall: role of platelet-derived microparticles and non-coding RNAs // *Clin Sci (Lond).*- 2018.- 132(17).-P. 1875-1888.
175. Rajendran S., Chirkov Y.Y. Platelet hyperaggregability: impaired responsiveness to nitric oxide ("platelet NO resistance") as a therapeutic target // *Cardiovasc Drugs Ther.* -2008.- 22(3).- P. 193-203.
176. Rao M. L., Tang M. et al. Effects of paeoniflorin on cerebral blood flow and the balance of PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury// *Yao Xue Xue Bao.*- 2014.- 49(1).-P. 55-60.
177. Reed G.W., Rossi J.E., Cannon C.P. Acute myocardial infarction// *Lancet.*- 2017.-14.-389.-P. 197-210.
178. Richman I.B., Owens D.K. Aspirin for Primary Prevention// *Med Clin North Am.*- 2017.-101(4).-P. 713-724.
179. Roffman D.S. Developments in Oral Antiplatelet Agents for the Treatment of Acute Coronary Syndromes: Clopidogrel, Prasugrel, and Ticagrelor// *J Pharm Pract.*- 2016.-29(3).-P. 239-249.
180. Ryu S.K., Ahn D.S., Cho Y.E. et al. Augmented sphingosylphosphorylcholine-induced Ca<sup>2+</sup>-sensitization of mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive rat // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*-2006.-373(1).-P. 30-36.

181. Samantha J., Montague S.J., Andrews R.K., Gardiner E.E. Mechanisms of receptor shedding in platelets//Blood.-2018.- 132.-P. 2535-2545
182. Schaeffer J., Blaustein MP. Platelet free calcium concentrations measured with fura-2 are influenced by the transmembrane sodium gradient//Cell Calcium.-1989.- 10(2).-P.101-113.
183. Scharf R. Drugs that Affect Platelet Function// Seminars in Thrombosis and Hemostasis.-2012.- 38(08).-P. 865–883.
184. Scharf R.E. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 1// Hamostaseologie.-2018.-38(4).-P.203-210.
185. Scharf R.E. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 2 // Hamostaseologie.- 2018.- 38(4).-P. 211-222.
186. Schmutz M., Rand M. L., Freedman J. Platelets and von Willebrand factor // Transfus. Apher. Sci.- 2013.- Vol. 28.- No. 3.- P. 269–277.
187. Schoergenhofer C., Schwameis M., Gelbenegger G., Buchtele N., et al. Inhibition of Protease-Activated Receptor (PAR1) Reduces Activation of the Endothelium, Coagulation, Fibrinolysis and Inflammation during Human Endotoxemia //Thromb Haemost.- 2018.-118(7).-P. 1176-1184
188. Shaturnyĭ V.I., Shakhidzhanov S.S., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Activators, receptors and signal transduction pathways of blood platelets //Biomed Khim. -2014.-60(2).-P.182-200.
189. Shimizu M., Natori T., Tsuda K., Yoshida M. et al. Thrombin-induced platelet aggregation – effect of dabigatran using automated platelet aggregometry// Platelets.-2019.-P. 1–5.
190. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // Redox Biol.- 2015.-4.-P.180-183.
191. Smith S.A., Travers R.J., Morrissey J.H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade// Crit Rev Biochem Mol Biol. -2015.-50(4).- P.-326-336.
192. Spartalis M., Tzatzaki E., Spartalis E., Damaskos C. et al. The role of prasugrel in the management of acute coronary syndromes: a systematic review // Eur Rev Med Pharmacol Sci.- 2017.- 21(20).-P. 4733-4743.

193. Spronk H.M.H., Padro T., Siland J.E., Prochaska J.H. et al. Atherothrombosis and Thromboembolism: Position Paper from the Second Maastricht Consensus Conference on Thrombosis // *Thromb Haemost.*- 2018.- 118(2).-P.- 229-250.
194. Strutyns'kyi R.B., Kotsiuruba A.V., Rovenets' R.A., Strutyns'ka N.A. Biochemical mechanisms of the cardioprotective effect of the K(ATP) channels opener flocalin (medicinal form) in ischemia-reperfusion of myocardium// *Fiziol Zh.*- 2013.- 59(4).-P.- 16-27.
195. Swieringa F., Kuijpers M.J., Heemskerk J.W., van der Meijden P.E. Targeting platelet receptor function in thrombus formation: the risk of bleeding// *Blood Rev.*-2014.-28(1).- P. 9-21.
196. Suzuki-Inoue K., Tsukiji N. A role of platelets beyond hemostasis // *Rinsho Ketsueki.*- 2019.-60(9).-P.-1283-1291.
197. Szabó I.L., Mátics R., Hegyi P., Garami A., Illés A., Sarlós P., Bajor J., Szűcs A. et al. PPIs Prevent Aspirin-Induced Gastrointestinal Bleeding Better than H2RAs. A Systematic Review and Meta-analysis // *J Gastrointest Liver Dis.*-2017.- P.- 395-402.
198. Tantry U.S., Navarese E.P., Myat A., Chaudhary R., Gurbel P.A. Combination oral antithrombotic therapy for the treatment of myocardial infarction: recent developments // *Expert Opin Pharmacother.*- 2018.- 19(7).-P.- 653-665.
199. Thachil J. Deep vein thrombosis// *Hematology.*-2014.- 19(5).-P.-309-310.
200. Tomaiuolo M., Brass L. F., Stalker T. J. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis// *Interv Cardiol Clin.*- 2017.- 6(1).-P. 1–12.
201. Twomey L. G., Wallace R. M., Cummins P., Degryse B., et al. Platelets: From Formation to Function. Homeostasis// *An Integrated Vision.*-2019.-5.-P. 71-92
202. Van der Meijden P., Heemskerk J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives// *Nature Reviews Cardiology.*-2019.-16.-P.166–179
203. Vasquez A.M., Mouchlis V.D., Dennis E.A. Review of four major distinct types of human phospholipase A2 // *Adv Biol Regul.* -2018.- 67.-P. 212-218.

204. Venkatesan P., Rao M. N. A. Structure-Activity Relationships for the Inhibition of Lipid Peroxidation and the Scavenging of Free Radicals by Synthetic Symmetrical Curcumin Analogues// *J. Pharm. Pharmacol.*- 2000.- 52.-P.- 1123-1128
205. Verheugt F.W. Antithrombotic Therapy to Reduce Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention // *Interv Cardiol Clin.*- 2017.- 6(1).-P.- 131-140.
206. Veron-Esquivel D., Batiz-Armenta F., Cazares-Diazleal A.C., Oviedo-Moguel S., et al. Validation of DAPT Score for Prolonged Dual Antiplatelet Therapy in Acute Myocardial Infarction Patients//*Hellenic. J. Cardiol.*-2018.-P.1-32.
207. Vidula M.K., Secemsky E.A., Yeh R.W. Duration of Dual Antiplatelet Therapy for Stented Patients: An Update for the Clinician.*Prog// Cardiovasc Dis.*- 2018.- 60(4-5).-P. 491-499.
208. Vyas V.K., Ghatge M. Substituted benzimidazole derivatives as angiotensin II-AT1 receptor antagonist: a review // *Mini Rev Med Chem.* -2010.- 10(14).-P.- 1366-1384.
209. von Kügelgen I., Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors // *Neuropharmacology.*- 2016.- 104.-P. 50-61.
210. Wang Z.G., Wang D.Q., Jiao Y., Tian X., Sun M.Y. Stroke, platelet activating factor and receptor antagonists// *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*- 2017.- 42(24).-P. 4750-4755.
211. Watanabe Y. Cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange stimulators among cardioprotective drugs // *J Physiol Sci.*- 2019.- 69(6).-P. 837-849.
212. Wang Y., Wu Y.P., Han J.J., Zhang M.Q., et al. Inhibitory effects of hydrogen on in vitro platelet activation and in vivo prevention of thrombosis formation // *Life Sci.*- 2019.-P. 233-240.
213. Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants// *J Am Chem Soc.*- 2001.- 123(6).-P. 1173-1183.

214. Wu L.T., Jiang Z., Shen J.J., Yi H. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole-2-substituted phenyl or pyridine propyl ketene derivatives as antitumour agents // *Eur J Med Chem.*- 2016.- 114.- P. -328-336.
215. Xiang Q., Pang X., Liu Z., Yang G., Progress in the development of antiplatelet agents: Focus on the targeted molecular pathway from bench to clinic // *Pharmacol Ther.*- 2019.-26.-P. 1-6
216. Xie Z., Tian Y., Ma L., Lv X. Developments in inhibiting platelet aggregation based on different design strategies // *Future Med Chem.*- 2019.-11(14).-P. 1757-1775.
217. Yamamoto J., Inoue N. Global Thrombosis Test (GTT) can detect major determinants of haemostasis including platelet reactivity, endogenous fibrinolytic and thrombin generating potential//*Thrombosis Research.*-2014.-133.-P. 919-926
218. Yang P.S., Pak H.N., Park D.H., Yoo J. et al. Non-cardioembolic risk factors in atrial fibrillation-associated ischemic stroke // *PLoS One.*- 2018.- 20;13(7).-P. 10-22.
219. Ye T., Shi H., Phan-Thien N., Lim C.T. The key events of thrombus formation: platelet adhesion and aggregation// *Biomech Model Mechanobiol.*- 2019.-21.-P.1-12.
220. Yeo K.K., Armstrong E.J., López J.E., Chen D.C., et al. Aspirin and clopidogrel high on-treatment platelet reactivity and genetic predictors in peripheral arterial disease// *Catheter Cardiovasc Interv.*- 2018.-91(7).-P.-1308-1317.
221. Yusuf S., McKee M. Documenting the global burden of cardiovascular disease: a major achievement but still a work in progress//*Circulation.* -2014.-129(14).-P.1459-1462.
222. Zhao S., Li Z., Huang F., Wu J., et al. Nano-scaled MTCA-KKV: for targeting thrombus, releasing pharmacophores, inhibiting thrombosis and dissolving blood clots in vivo// *Int J Nanomedicine.*-2019.-14.-P. 4817-4831.
223. Zhao B.W., Zhang X.H., Gu Y., Zhao S., et al. Anti-platelet aggregation mechanism of Xixian Tongshuan Preparation based on molecular simulation methods// *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*-2019.- 44(9).-P. 1882-1888.