

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

На правах рукописи

Сиротенко Виктор Сергеевич

АНТИАГРЕГАНТНЫЙ И АНТИТРОМБОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
НОВЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

диссертация на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:

академик РАН, Заслуженный деятель науки
РФ, доктор медицинских наук, профессор

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Кучерявенко Аида Фатиховна

Волгоград, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. КОНДЕНСИРОВАННЫЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИАГРЕГАНТНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Представление о функциональной активности тромбоцитов и фармакологической коррекции повышенного тромбогенного потенциала крови.	13
1.2. Направления поиска и создания новых антагистических средств.	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	30
ГЛАВА 3. АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ СТРУКТУР.....	43
3.1. Антиагрегантная активность гетероциклических соединений <i>in vitro</i>	43
3.1.1. Влияние на агрегацию тромбоцитов моноциклических соединений с гетероатомом азота.	43
3.1.2. Действие на агрегацию тромбоцитов конденсированных азотсодержащих гетероциклических соединений.	44
3.1.3. Антиагрегантная активность серосодержащих гетероциклических соединений.	46
3.1.4. Влияние на агрегацию тромбоцитов кислородсодержащих гетероциклических конденсированных соединений.	48
3.1.5. Анализ перспективности скафолдов для поиска и создания наиболее активных соединений <i>in silico</i>	49
3.1.6. Заключение.	52
3.2. Влияние на процессы агрегации тромбоцитов новых гетероциклических структур <i>in vivo</i> . ..	53
3.2.1. Антиагрегантная активность и острая токсичность производного ксантина соединения Ф- 168.	53
3.2.2. Действие на агрегацию тромбоцитов и острая токсичность производного N9-имидазо[3,2- а]бензимидазола соединения RU-891.....	56
3.2.3. Антиагрегантная активность и острая токсичность производных 6H-1,3,4-тиадиазина соединения L-36.	60
3.2.4. Заключение.	63
3.3. Заключение.	63
ГЛАВА 4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО КСАНТИНА СОЕДИНЕНИЯ Ф-168	66
4.1. Влияние соединения Ф-168 на стадии функциональной активности тромбоцитов.	66
4.1.1. Действие на процессы адгезии тромбоцитов.	67

4.1.2. Влияние на активацию тромбоцитов.	68
4.1.3. Ингибирование секреции АТФ из гранул хранения тромбоцитов.....	69
4.1.4. Влияние на тромбоксан-простаглицлиновую систему.	70
4.1.5. Снижение уровня кальция в тромбоцитах.....	72
4.1.6. Заключение.	75
4.2. Действие соединения Ф-168 на рецепторный ландшафт тромбоцитов.....	75
4.2.1. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ.	76
4.2.2. Ингибирование функциональной активности тромбоцитов на модели адреналин-индуцированной агрегации.	78
4.2.3. Действие на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой.....	79
4.2.4. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную коллагеном.	80
4.2.5. Действие на повышение агрегации тромбоцитов, индуцированное агонистом тромбоксановых рецепторов.	80
4.2.6. Действие на процессы агрегации тромбоцитов, индуцированные селективным агонистом PAR-1 рецепторов.	82
4.2.7. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную селективным агонистом гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов.....	83
4.2.8. P2Y ₁₂ -антагонистическая активность рецепторы тромбоцитов	85
4.2.9. Заключение.	86
4.3. Антитромбогенные свойства соединения Ф-168.....	86
4.3.1. Антитромботическая активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III)	86
4.3.2. Антитромботическая активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного электрическим током.	88
4.3.3. Влияние на выживаемость мышей в условиях генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза.	90
4.3.4. Антитромбогенное действие на модели тромбоза нижней полой вены.	93
4.3.5. Антитромботическая активность в условиях экспериментального инфаркта миокарда.	95
4.3.6. Заключение.	96
4.4. Влияние соединения Ф-168 на удлинение времени кровотечения	97
4.5. Оценка влияния соединения Ф-168 на систему гемостаза методом тромбоэластографии.	98
4.6. Фармакокинетические свойства нового производного ксантина соединения Ф-168.	100
4.6.1. Фармакокинетические свойства активной фармацевтической субстанции.	101
4.6.2. Биоэквивалентность инъекционной лекарственной формы.	117

4.6.3. Заключение.	118
4.7. Изучение хронической токсичности соединения Ф-168.	118
4.8. Заключение.	123
ГЛАВА 5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО N9-ИМИДАЗО[3,2-а]БЕНЗИМИДАЗОЛА СОЕДИНЕНИЯ RU-891	128
5.1. Изучение влияния соединения RU-891 на стадии функциональной активности тромбоцитов.	128
5.1.1. Действие на процессы адгезии тромбоцитов.	129
5.1.2. Влияние на активацию тромбоцитов.	130
5.1.3. Ингибирование секреции АТФ из гранул хранения тромбоцитов.	131
5.1.4. Снижение уровня Р-селектина в организме крыс.	132
5.1.5. Влияние на уровень циклооксигеназы-1 в организме крыс.	134
5.1.5. Заключение.	137
5.2. Фармакокинетические свойства нового производного бензимидазола RU-891.	137
5.2.1. Фармакокинетические свойства активной фармацевтической субстанции соединения RU-891.	137
5.2.2. Биоэквивалентность лекарственной формы для приема внутрь.	152
5.2.3. Заключение.	154
5.3. Антитромбогенные свойства соединения RU-891.	154
5.3.1. Антитромботическая активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) и электрическим током.	154
5.3.2. Влияние на выживаемость мышей в условиях генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза.	160
5.3.3. Антитромбогенное действие на модели тромбоза нижней полой вены.	165
5.3.4. Антитромботическая активность в условиях экспериментального инфаркта миокарда.	166
5.4. Оценка влияния соединения RU-891 на систему гемостаза методом тромбоэластографии.	169
5.5. Влияние соединения RU-891 на время кровотечения.	171
5.6. Хроническая токсичность соединения RU-891.	173
5.7. Расчет и обоснование дозы для проведения I фазы клинических исследований.	178
5.8. Заключение.	179
ГЛАВА 6. АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ТИАДИАЗИНА СОЕДИНЕНИЯ L-36.	185
6.1. Влияние соединения L-36 на стадии функциональной активности тромбоцитов.	185

6.1.1. Действие на адгезивные свойства тромбоцитов.	186
6.1.2. Влияние на процессы активации тромбоцитов.	187
6.1.3. Ингибирование секреции АТФ из гранул хранения тромбоцитов.	188
6.1.4. Заключение.	191
6.2. Механизм антиагрегантного действия соединения L-36.	191
6.2.1. Действие на P2Y ₁₂ рецепторы тромбоцитов.	192
6.2.2. Антиагрегантная активность на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов.	193
6.2.3. Влияние на уровень тромбоксана В2.	194
6.2.4. Влияние на уровень эндотелина-1.	195
6.2.5. Влияние на фактор фон Виллебранда.	198
6.2.6. Действие на уровень внутриклеточного кальция.	201
6.2.7. Заключение.	203
6.3. Анализ <i>in silico</i> механизма антиагрегантного действия соединения L-36.	204
6.4. Антитромбогенные свойства соединения L-36.	210
6.4.1. Антитромбогенная активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) и воздействием элетрического тока.	211
6.4.2. Выживаемость мышей при моделировании адреналин-коллагенового тромбоза легких.	213
6.4.3. Антитромбогенное действие на модели тромбоза нижней полой вены.	217
6.4.4. Заключение.	218
6.5. Влияние соединения L-36 на время кровотечения.	218
6.6. Консесусная оценка <i>in silico</i> ADMET характеристик соединения L-36.	219
6.6.1. ADMET-характеристики токсикологического профиля.	221
6.6.2. ADMET-прогноз фармакокинетических параметров.	223
6.6.3. Заключение.	225
6.7. Заключение.	225
ГЛАВА 7. АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ Ф-168, RU-891 и L-36 В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЦИТОКИНЕМИИ.	230
7.1. Молекулярные основы увеличения тромбогенного потенциала крови в условиях гиперцитокинемии.	230

7.2. Влияние соединения Ф-168 на функциональную активность тромбоцитов в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации.	232
7.3. Влияние соединения RU-891 на функциональную активность тромбоцитов в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации.	234
7.4. Влияние соединения L-36 на функциональную активность тромбоцитов в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации.	235
7.5. Эффективность фавипиравира, триазавирина, нобазита, ингавирина, арбидола и ремантадина в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации.	236
7.6. Заключение.	241
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	245
ВЫВОДЫ.....	263
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	266
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	269
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	304

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущее место в ряду причин смертности во всем мире [Бойцов С.А., 2021; Li F., 2022; Voutilainen A., 2022]. Ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт являются основными причинами инвалидности населения [Бокерия Л.А., 2022; Мазуров А.В., 2014; Петров В.И., 2020; Ткачёва О.Н., 2021; Kjeldsen E.W., 2022]. Ведущим фактором в развитии ишемических нарушений являются процессы тромбообразования. Активное участие тромбоцитов в тромбообразовании и многогранность их функциональной активности обуславливает целесообразность фармакологического влияния на тромбоцитарный гемостаз у пациентов с ишемическими нарушениями, фибрилляцией предсердий как с лечебной, так и с профилактической целью [Бокерия О.Л., 2016; Гончаров М.Д., 2022; Кузьмина И.М., 2021; Шляхто Е.В., 2020; Gulati A., 2021; Savage P., 2022; Udut V.V., 2020]. Снижение риска возникновения ишемических осложнений возможно с применением антиагрегантных средств. Выделяют несколько групп антиагрегантных средств, реализующих свое действие через определенные мишени: ингибиторы синтеза тромбоксана A_2 ; антагонисты тромбоксановых рецепторов; блокаторы пуриновых P_2Y_{12} рецепторов тромбоцитов; блокаторы рецепторов тромбина (PAR1); блокаторы гликопротеиновых $IIb/IIIa$; блокаторы гликопротеиновых VI рецепторов; ингибиторы фосфодиэстеразы [Арутюнов А.Г., 2021; Решетько О.В., 2020; Sharma R., 2020; Mendelson S.J., 2021]. Однако, проблемы в лечении пациентов, получающих антиагрегантную терапию, связаны с развитием ряда осложнений: повторных ишемических событий, гастропатий, резистентности к терапии, кровотечений или вторичного тромбоза стента ввиду остаточной реактивности тромбоцитов [Пряхин И.С., 2020; Решетько О.В., 2020; Рудой А.С., 2019; Сулимов В.А., 2012]. Кровотечения из верхних отделов желудочно-кишечного тракта одно из самых частых осложнений антитромботической терапии, ассоциирующихся с высокой летальностью [Комаров А.Л., 2021].

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

необходимость в эффективной антиагрегантной терапии не только для коррекции нарушений тромбоцитарного гемостаза, но и при иммунотромботических состояниях.

Степень разработанности проблемы

Антиагрегантные средства являются ключевым звеном в терапии пациентов в острый период инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, а также в ходе эндоваскулярных вмешательств. На настоящий момент в клинической практике имеется большое количество антиагрегантных средств, относящихся к разным группам по механизму действия [Бойцов С.А., 2023; Домбровский М.М., 2018; Angiolillo D.J., 2021; Xiong Y., 2020]. Однако, применение этих средств существенно ограничивается рядом осложнений: развитие кровотечений, гастропатий, резистентности, тромбоцитопений и т.п. [Costa F., 2023; Smits P.C., 2022; Wang J., 2023] Кроме того, в ряде случаев недостаточно применения одного антитромботического средства и необходимо прибегать к назначению двойной антитромбоцитарной терапии. Поэтому поиск и создание новых антиагрегантных средств является актуальной задачей. На базе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ имеется отлаженный методический подход к поиску и созданию антиагрегантных средств. С 1997 года на кафедре было проведено и успешно защищено 16 диссертационных исследований, посвященных фармакологии системы гемостаза. Сотрудниками кафедры совместно с коллегами других структурных подразделений ВолгГМУ и ВУЗов проведены полные доклинические исследования нескольких оригинальных молекул.

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

Задачи исследования

1. Провести *in vitro* поиск среди новых производных, принадлежащих к 12 новым скаффолдам, на предмет антиагрегантной активности.
2. Провести анализ перспективности 12 новых скаффолдов для поиска высоко эффективных антиагрегантных средств.
3. Изучить возможные механизмы антиагрегантного действия наиболее активных соединений.
4. Оценить антитромботическую активность соединений-лидеров и их лекарственных форм на моделях артериального и венозного тромбозов.

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

Научная новизна исследования

Впервые показано антитромботическое действие новых синтезированных веществ производных 6Н-1,3,4-тиадиазина (соединение L-36), 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-диона (соединение Ф-168), а также лекарственной формы для приема внутрь производного N9-имидазобензимидазола соединения RU-891 на моделях экспериментальной патологии. Впервые определена зависимость фармакодинамических и фармакокинетических свойств соединений, а также их токсикологический профиль. Установлены механизмы антиагрегантного действия наиболее активных соединений: Ф-168 (блокатор P₂Y₁₂ рецепторов тромбоцитов), RU-891 (блокатор P₂Y₁₂ рецепторов тромбоцитов, ингибитор синтеза тромбосана A₂), L-36 (ингибитор синтеза тромбосана A₂). Впервые проведено изучение антиагрегантного действия новых соединений в условиях гиперцитокинемии. Установлено, что антиагрегантное средство ацетилсалициловая кислота и противовирусные лекарственные средства (фавипиравир, умифеновир, триазавирин, ингавирин, римантадин, энисамия йодид) проявляют антиагрегантное действие в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации тромбоцитов.

Научно-практическая значимость

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

В ряду производных 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-диона выявлено наиболее активное соединение Ф-168, проявляющее выраженные антиагрегантные и антитромбогенные свойства. Установленный механизм действия и выраженная антиагрегантная активность соединения Ф-168 позволили провести в полном объеме весь цикл доклинических исследований с разработкой лекарственной формы и изучением токсикологического профиля. Результаты доклинических исследований легли в основу регистрационного досье.

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

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

Реализация результатов исследования

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

Исследования по изучению соединения Ф-168 и его лекарственной формы для внутривенного введения проводились по заказу ООО «Компания ЭЛТА». В настоящее время успешно завершена II фаза клинических исследований. Часть исследований в отношении соединения RU-891 были проведены в рамках государственного контракта № 14.N08.12.0160 от «02» июня 2017 г. В рамках гранта Минобрнауки РФ (Соглашение №075-15-2020-777 от «01» октября 2020 г. проведено изучение свойств системы гемостаза в условиях гиперцитокинемии, а также выполнено исследование ряда противовирусных соединений по влиянию на систему гемостаза в условиях цитокиновой гиперагрегации.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди изученных 12 скафолдов наиболее активные антиагрегантные соединения были выявлены в рядах N-содержащих гетероциклических соединений: производных 3,7-дигидро-1Н-

пурин-2,6-диона и N9-имидазобензимидазола, а также в ряду гетероциклов, содержащих атом серы – производные 6H-1,3,4-тиадиазина.

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

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

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

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

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XXII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2017, 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы

экспериментальной и клинической медицины», 2018, 4-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием, 2019, Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации», 2020, Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 11-й конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 2020, Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше!» и 60-й сессии, посвященных 75-летию ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 2020, 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием, 2021, Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2021» и 61-й сессии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 11-й конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 2022, 80-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 2023, Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2023» и 63-й сессии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, 2023, VI Съезде фармакологов России, 2023, 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 2023, IX Всероссийской конференции с международным участием «Кардиоваскулярная фармакотерапия» совместно с VII Научно-практической конференцией с международным участием «Желудочковые нарушения ритма сердца: диагностика, лечение, профилактика», 2023.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, 14 в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Получено 3 положительных решения на патенты на изобретение.

Объем и структура диссертации

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

ГЛАВА 1. КОНДЕНСИРОВАННЫЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИАГРЕГАНТНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Активация тромбоцитов приводит к экспонированию анионных фосфолипидов клеточной поверхности, которые служат очагом сборки прокоагулянтных белков. В последующей активации каскада коагуляции, последовательной серии событий расщепления, опосредованных сериновой протеазой, тромбин активируется из своего зимогена протромбина. Активный тромбин может катализировать полимеризацию фибрина, который останавливает кровоток, тем самым обеспечивая «гемостаз», предотвращая большую кровопотерю. По мере образования сгустка или «тромба» циркулирующие эритроциты, лейкоциты и тромбоциты включаются в его структуру [Мазуров А.В., 2011; Chapin J.C., 2015]. Инфаркт миокарда чаще всего вызывается вследствие острого тромбоза, блокирующего коронарную артерию, и современные стратегии лечения сосредоточены на максимально быстром восстановлении кровоснабжения тканей миокарда [Slikkerveer J., 2019]. Применение антитромбоцитарных средств позволяет существенно снизить ишемизацию органов и тканей, тем самым предотвратить развитие острого инфаркта миокарда, а также тромботические осложнения в острый период.

1.1. Представление о функциональной активности тромбоцитов и фармакологической коррекции повышенного тромбогенного потенциала крови

Артериальные тромбозы относятся к спектру сердечно-сосудистых заболеваний с высокой степенью тяжести и составляют одну из ведущих причин смерти, связанную с возникновением ишемического инсульта и острого ишемического инфаркта миокарда [Silva-Luis C.C., 2022].

Ацетилсалициловая кислота является наиболее широко используемым антитромбоцитарным средством во всем мире. Применение низких доз ацетилсалициловой кислоты не всегда оказывается достаточным для адекватной профилактики процессов тромбообразования, что обуславливается высокой остаточной функциональной активностью тромбоцитов. Было доказано, что на фоне терапии низкими дозами ацетилсалициловой кислоты в крови пациентов наблюдается повышенное содержание тромбоксана. В свою очередь с целью выраженного снижения синтеза тромбоксана возможно применение ацетилсалициловой кислоты многократно в сутки или в более высоких дозах. Однако, это будет приводить к увеличению частоты

кровотечений и гастротоксических эффектов [de Veer A.J.W.M., 2022; Tosetto A., 2022]. Также, у пациентов, принимающих ацетилсалициловую кислоту, могут наблюдаться различные реакции в тестах *in vitro* на агрегацию тромбоцитов и могут возникать рецидивы тромбоэмболических осложнений, что указывает на наличие резистентности к препарату [Aksu H.U., 2015].

При активации тромбоцитов происходит высвобождение арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов, которая метаболизируется ферментом циклооксигеназой и тромбоксансинтетазой, что приводит к образованию тромбоксана А₂. Последний является лабильным липидным медиатором, который действует посредством связывания с рецептором, сопряженным с G-белком. Это взаимодействие вызывает широкий спектр биологических эффектов, включая агрегацию тромбоцитов. Поэтому вопрос применения блокаторов тромбоксановых рецепторов является обоснованным [Alshbool F.Z., 2018]. Ридогрел является двойным ингибитором тромбоксансинтазы и блокатором рецепторов [Carty E., 2000]. Он используется для профилактики системной тромбоэмболии при остром инфаркте миокарда. Однако, ридогрел все чаще подвергается замене на ацетилсалициловую кислоту в терапии, так как последняя обладает клиническими преимуществами. Наряду с этим показано, что ридогрел обладает ингибирующим влиянием на РНК-зависимую РНК-полимеразу SARS-CoV-2 – ключевой фермент в комплексе неструктурированных белков вируса. Это послужило основанием для дальнейшего углубленного изучения ридогрела в отношении новых открытых свойств [Baby K., 2020].

Рецептор P2Y₁₂ тромбоцитов остается ключевой терапевтической мишенью в сердечно-сосудистой медицине с момента открытия антитромбоцитарного действия тиклопидина [Fernando H., 2022]. С целью повышения эффективности нередко прибегают к применению двойной антитромбоцитарной терапии (ДАТТ): сочетание ацетилсалициловой кислоты и антагонистов рецепторов P2Y₁₂ тромбоцитов. Воздействием на различные мишени достигается наибольшая эффективность в отношении ингибирования функции тромбоцитов, а также снижается вероятность высокой остаточной реактивности тромбоцитов [Meng S., 2022; Zhang S., 2022]. ДАТТ в настоящее время рекомендуется для лечения пациентов с острым коронарным синдромом во всем мире. Проведенный ряд клинических исследований позволил выявить также, что ДАТТ с аспирином и тикагрелором или прасугрелем превосходит ДАТТ с клопидогрелом в снижении частоты тромботических и ишемических событий и в настоящее время рекомендуется для пациентов с острым коронарным синдромом. Однако широко признано, что защитный эффект ДАТТ с более новыми антагонистами P2Y₁₂ против тромбоза достигается за счет увеличения риска геморрагических осложнений [Almas T., 2022; Costa T.G.R., 2022]. Существует ряд проблем относительно клинического применения антагонистов рецептора P2Y₁₂. Высокая

остаточная реактивность тромбоцитов при лечении остается постоянной проблемой с момента первого применения этих препаратов. Кроме того, продолжается поиск оптимального режима, позволяющего сбалансировать риск кровотечения с ишемической пользой. Имеются данные, свидетельствующие о том, что лекарственные взаимодействия, генетические полиморфизмы, влияющие на фармакокинетику ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов, могут привести к неблагоприятным исходам [Fernando H., 2022].

Использование блокаторов Пб/Ша рецепторов тромбоцитов для внутривенного применения позволяет значительно восстановить кровоснабжение в коронарном русле и предупредить развитие вторичных тромботических осложнений в остром периоде инфаркта миокарда [Matsumaru Y., 2022].

Антагонист PAR1 рецепторов ворапаксар в клинических исследованиях соответствовал первичным данным со значительным снижением неблагоприятных коронарных событий, при вторичной профилактике у пациентов без инсульта с предшествующим инфарктом миокарда и периферическими заболеваниями артерий. Однако, на данный момент применение ворапаксара не нашло широкого распространения, что обусловлено высоким риском геморагических инсультов [Spronk H.M.H., 2018].

Оптимальный антитромботический агент должен избирательно ингибировать функцию патологически активированных тромбоцитов, не влияя на системный гемостаз. Это требует нацеливания на пути активации тромбоцитов, которые различаются между физиологическими и происходящими в месте атеросклероза. Коллагеновые волокна представляют собой наиболее тромбогенные макромолекулярные компоненты внеклеточного матрикса атеросклеротических бляшек. Когда коллаген обнажается во время разрыва атеросклеротической бляшки, он связывается с гликопротеином VI тромбоцитов (GPVI), основным рецептором коллагена тромбоцитов. GPVI, в свою очередь, опосредует локальное рекрутирование, активацию и агрегацию тромбоцитов. Ревасепт представляет собой димерный растворимый слитый белок, состоящий из внеклеточного домена рецептора GPVI и Fc-фрагмента человека. Он конкурирует с эндогенным GPVI тромбоцитов за связывание с обнаженными коллагеновыми волокнами и избирательно ингибирует опосредованную коллагеном адгезию и агрегацию тромбоцитов в месте разрыва атеросклеротической бляшки. Кроме того, ревасепт блокирует связывание фактора фон Виллебранда с коллагеном и ингибирует опосредованную фактором фон Виллебранда активацию тромбоцитов. Таким образом, было показано, что для препарата ревасепт характерно минимальное влияние на физиологический гемостаз. В исследованиях I фазы не было зафиксировано клинически значимых кровотечений на фоне приема ревасепта. Однако, исследования II фазы сопровождались развитием кровотечений, а также удлинением

интервала QT. Также, был сделан вывод об эффективности ревасепта только в случае наличия атеросклеротического повреждения, что существенно ограничивает его применение. Недостатком данного средства является и то, что по своей природе он является моноклональным антителом, что делает его потенциально дорогостоящим [Alberti S., 2020; Gröschel K., 2020; Mayer K., 2021].

Тромбоз внутрисосудистого стента, вторичные ишемические нарушения, смертность после чрескожного коронарного вмешательства могут быть вызваны резистентностью к имеющимся в клинической практике антиагрегантным препаратам [Yaseen I.F., 2019].

Основная описанная функция тромбоцитов заключается в гемостазе; в этом процессе тромбоциты обнаруживают повреждение сосудов, распознавая компоненты субэндотелия, такие как коллаген, фактор фон Виллебранда и белки внеклеточного матрикса, через гликопротеины, присутствующие на их поверхности. Тромбоциты также участвуют в воспалительных процессах посредством секреции медиаторов воспаления или путем прямого взаимодействия с лейкоцитами [Mariscal A., 2022]. В рамках своего участия во врожденном иммунном ответе тромбоциты содержат молекулы с антимикробной активностью, такие как киноцидины; CXCL4, CXCL7 и CCL5 и катионные защитные пептиды хозяина (CHDP); пептид нейтрофилов человека (HNP) 1, бета-дефенсины человека (HBD) 1–3 и кателицидин LL-37 [Aquino-Domínguez A.S., 2022]. Тромботические нарушения, в особенности микроциркуляторного русла, являются важнейшим патофизиологическим фактором органной дисфункции и смерти больных с септическим шоком. Было установлено, что лечение, направленное на восстановление микроциркуляции, улучшает прогноз исхода для пациента [Legrand M., 2020].

Показано, что тромбоциты могут фагоцитировать *S. aureus*, а также секретировать антибактериальные пептиды из альфа-гранул, которые убивают *S. aureus* вне зависимости от антител. Помимо прямой активности против *S. aureus*, тромбоциты также могут активироваться внутрисосудистыми патогенами благодаря семейству Toll-like рецепторов (TLRs), вызывая секрецию хемокинов для рекрутирования и усиления лимфоцитарного звена иммунитета, а также для связи с эндотелиальными клетками, тем самым усиливая иммунный ответ [Tatara A.M., 2022]. Взаимодействие между коагуляционным звеном гемостаза, тромбоцитами и врожденной иммунной системой называют иммунотромбозом. Иммунотромбоз считается самостоятельным процессом врожденного иммунитета, специально направленным на снижение распространения возбудителей в кровотоке и завершающимся образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) - нетозом. NETs представляют собой решетки внеклеточной ДНК, образующиеся при чрезмерной активации нейтрофилов, предназначенные для захвата патогенов и борьбы с инфекциями [Denorme F., 2022]. Чрезмерная активация NETs в кровотоке приводит к

развитию гиперкоагуляции и тромбозу. Показано повышение высвобождения NETs нейтрофилами у пациентов с COVID-19. Инфекция SARS-CoV-2 может напрямую вызывать нетоз и высвобождение NETs из нейтрофилов. Кроме того, производство NETs считается предиктором тяжести заболевания и клинических исходов при COVID-19 (рисунок 1.1) [Zhu Y., 2022].

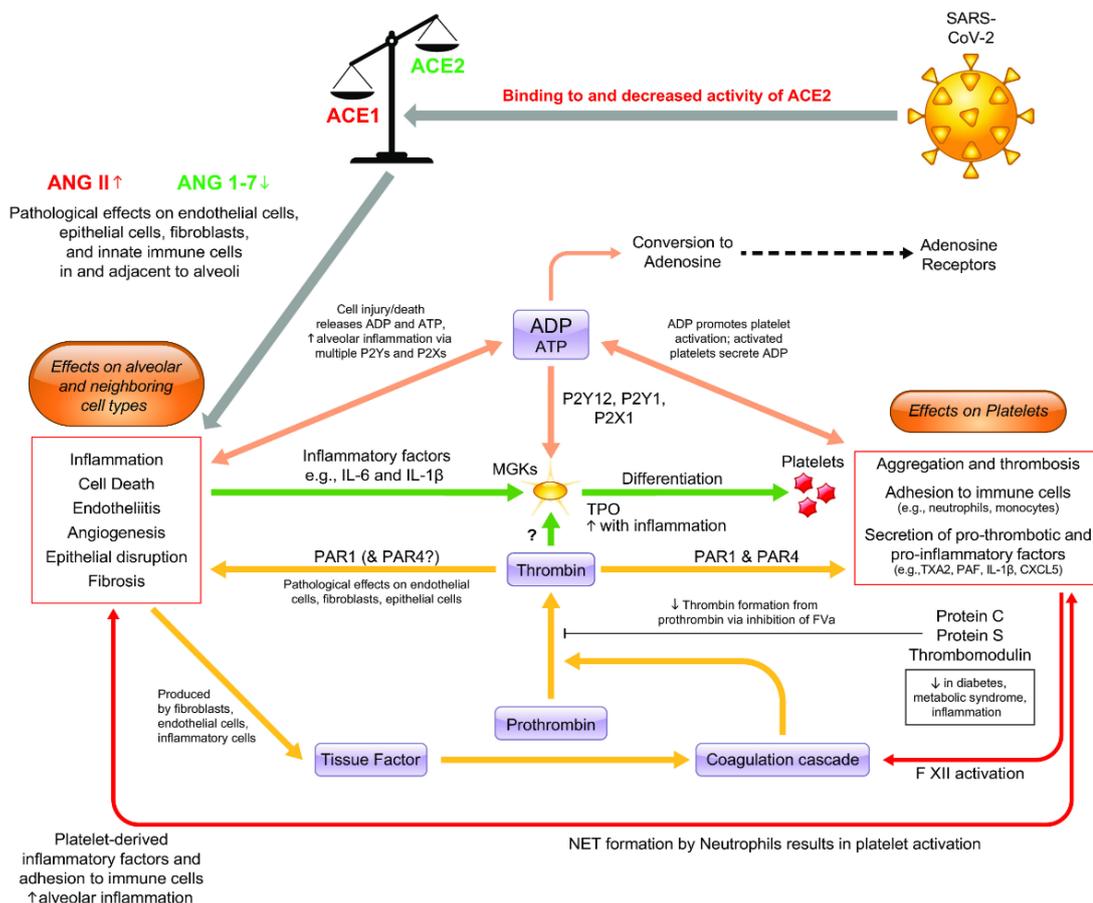


Рисунок 1.1. – тромбовоспаление при COVID-19 [Sriram K., 2021].

Учитывая новое понимание роли тромбоцитов терапия антиагрегантными средствами, а также антикоагулянтными препаратами является актуальной в случаях сепсис-ассоциированного иммунотромбоза [Sriram K., 2021; BMP. Версия 15, 2022].

1.2. Направления поиска и создания новых антиагрегантных средств

Адгезия и агрегация тромбоцитов являются ключевыми событиями гемостаза и тромбоза, которые вызывают разрушение атеросклеротических бляшек, что является инициатором большинства тромботических нарушений, включая сердечные приступы и инсульты.

Существует ряд серьезных ограничений в применении антиагрегантных средств, которые включают слабое ингибирование функции тромбоцитов (ацетилсалициловая кислота), медленное начало действия (клопидогрел), переменный ответ на лечение у пациентов и высокую частоту кровотечений, которая зависит от дозы и длительности курса терапии. Учитывая текущую ситуацию, поиск новых каркасов в виде препаратов против агрегации тромбоцитов, которые являются более эффективными и безопасными, с меньшим количеством побочных эффектов, очень важен [Mirfazli S.S., 2014].

Имеются данные об антиагрегантных свойствах производных N-ацилгидразонов, производных индола [Fraga A.G.M., 2000; Cunha A.C., 2003; Park M.K., 2008].

Фармакологическая блокада PAR1 рецепторов тромбоцитов по-прежнему является потенциально привлекательной мишенью для профилактики ряда сердечно-сосудистых патологий, включая острый коронарный синдром, хроническую вторичную профилактику ишемических событий и периферических тромбозов артериального русла [Spronk H.M.H., 2018].

Тромб неоднороден, а состоит из ядра из сильно активированных тромбоцитов и периферии из менее активированных тромбоцитов. Комбинированные взаимодействия коллагена и фибрина с тромбоцитами вызывают формирование ядра тромба, в то время как взаимодействие только фибрина с тромбоцитами играет роль в определении периферических свойств сгустка. Взаимодействия гликопротеина VI и фибрина проливают новый свет на понимание механизмов активации тромбоцитарного звена гемостаза при заболеваниях, связанных с повышенным тромбогенным потенциалом крови. Недавние данные показывают, что коллаген и фибрин связывают разные эпитопы гликопротеина VI, что указывает на возможность специфического воздействия на каждый из лигандов [Spronk H.M.H., 2018].

Начальный этап рекрутирования тромбоцитов к местам повреждения сосудов опосредован GPIIb-V-IX рецептором, структурным комплексом, экспрессируемым исключительно в тромбоцитах и мегакариоцитах [Lu J., 2022]. В качестве потенциальной мишени для подавления адгезии тромбоцитов данный рецепторный комплекс давно привлекает внимание ученых [Biswas R., 2023]. Антагонисты GPIIb в настоящее время считаются мощными ингибиторами адгезивной функции тромбоцитов, однако терапия анти-GPIIb еще не разработана. Анфибатид (завершена II фаза клинических исследований) представляет собой антагонист GPIIb, лектиноподобный белок С-типа, полученный из белкового комплекса агглюцетина. Он имеет типичную структуру гетеродимера с двумя близкородственными субъединицами: α - и β -цепями [Li T.T., 2015]. Результаты агрегометрии на I фазе клинических исследований выявили зависимое от времени и дозы ингибирование агрегации тромбоцитов, опосредованной vWF и вызванной

ристоцетином, в крови, собранной у добровольцев, получавших анфибатид. В ходе исследований не наблюдалось серьезных нежелательных явлений или аллергических реакций [Li В.Х., 2021].

Важный аспект передачи сигналов тромбоцитов включает связывание секретируемого серотонина с его 5HT_{2A} рецептором для усиления функциональных реакций тромбоцитов. В связи с этим инициируются несколько петель положительной обратной связи, включая секрецию серотонина, чтобы повысить степень агрегации посредством усиления реакции тромбоцитов, а также привлечения других тромбоцитов к месту повреждения, чтобы добиться образования стабильного сгустка [John Jayakumar J.A.K., 2020]. Поиск и создание средств, селективно блокирующих 5HT_{2A} рецепторы на поверхности тромбоцитов, являются актуальными задачами в терапии сердечно-сосудистых заболеваний [Czopek A., 2021]. Имеющиеся в разработке молекулы обладают разным сродством с подтипом 2A и, как следствие, способствуют развитию нежелательных эффектов, а в ряде случаев оказывают токсическое воздействие. Кетансерин снижает частоту инфаркта миокарда у пациентов со стенозом коронарной артерии. Однако эти результаты сопровождались побочными эффектами из-за отсутствия селективности в отношении 5HT_{2A} рецептора [Marcinkowska M., 2022]. Сарпогрелат показал многообещающие результаты в клинических исследованиях на людях. Однако позже было установлено, что данное средство проявляет активность в отношении 5HT_{2B} рецептора. Селективный антагонист 5HT_{2A} рецептора AR246686 не имел сродства к 5HT_{2B} и 5HT_{2C} подтипам и проявлял антитромботические эффекты *in vitro* и *in vivo*, однако значительная токсичность препятствовала его клиническому использованию. Примечательным является и тот факт, что блокада 5HT_{2A} рецепторов тромбоцитов позволяет избежать развития серьезных кровотечений. 5HT_{2A}-опосредованные ответы больше участвуют во вторичной амплификации агрегации тромбоцитов в растущем тромбе, а не играют первичную роль в формировании и стабилизации гемостатического тромба, как, например, АДФ и тромбоксан A2 [Ramirez J.E.M., 2022].

Протеиндисульфидизомераза (PDI) имеет решающее значение для агрегации тромбоцитов, а ингибирование ее оценивается как новая антитромботическая стратегия. Оксидоредуктин-1α (Ero1α) образует систему транспорта электронов с PDI и конститутивно окисляет ее на поверхности тромбоцитов. Система Ero1α/PDI окисляет GSH и обеспечивает восстановительный потенциал (около -140 мВ), оптимальный для агрегации тромбоцитов [Wang L., 2022]. PDI может непосредственно действовать на рецептор GPIIb/IIIa, активировать восстановление и изомеризацию дисульфидных связей и способствовать изменению пространственной конформации рецептора [Sun X.D., 2021]. Тромбоциты содержат несколько изоформ семейства ферментов PDI, включая PDIA1, PDIA3, PDIA4 и PDIA6, которые секретируются и рекрутируются на поверхность тромбоцитов в ответ на их активацию. PDIA1

необходим для накопления тромбоцитов и зависящего от тканевого фактора образования фибрина в месте повреждения сосудов *in vivo*. Затем было обнаружено, что PDIA3, PDIA6 и PDIA4 регулируют функцию тромбоцитов и образование тромбов *in vivo* [Przyborowski K., 2022]. Природный флавоноид рутин (кверцетин-3-О-рутинозид) обратимо ингибирует PDI и проявляет антиагрегантную активность *in vivo* и *in vitro*. Ингибиторы PDI, такие как PACMA31 и CCF642, селективны в отношении PDI, но они необратимо связываются с остатками цистеина в активном центре и проявляют сильную цитотоксичность. Это свойство может быть полезно для эффективного лечения рака; однако, очевидно, не для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. HPW-RX40 ингибирует PDI по другому механизму, отличному от механизма необратимых ингибиторов PDI. HPW-RX40 является обратимым ингибитором PDI на поверхности тромбоцитов, этот эффект сопровождается подавлением агрегации тромбоцитов и образования тромбов. Более того, HPW-RX40 не оказывает существенного влияния на развитие белкового стресса в эндоплазматическом ретикулуме и не обладает цитотоксичностью [Kung P.H., 2017].

Статус активации тромбоцитов можно оценить по активации рецептора фибриногена GPIIb/IIIa, который распознается специфическим антителом (PAC-1), и поверхностной секрецией P-селектина (CD62P), которая происходит из α -гранул тромбоцитов. Связывание P-селектина с его гликопротеиновым лигандом-1 индуцирует иммунную модуляцию и воспалительные процессы. Активация тромбоцитов также может быть осуществлена опосредованно через выделение растворимого P-селектина в плазму. Активация P-селектина связана с артериальными и венозными тромбоэмболическими явлениями. Растворимый P-селектин вызывает протромботическое состояние и участвует в воспалении и атеросклерозе [Mehic D., 2023].

Активация тромбоцитов в местах повреждения сосудов приводит к высвобождению более 300 биологически активных молекул из отдельных секреторных гранул. Плотные (δ) гранулы преимущественно содержат небольшие молекулы, обладающие активирующими тромбоциты свойствами, способствующими привлечению тромбоцитов к растущему тромбу. Содержание и роль α -гранул более разнообразны, при этом исследования подчеркивают роль высвобождаемых α -гранул в иммунных реакциях и заживлении ран, а также в ангиогенезе и метастазировании опухолей. α -гранулы также экспрессируют на своих мембранах молекулы клеточной адгезии, такие как P-селектин, которые перемещаются на мембрану тромбоцитов при слиянии гранул, опосредуя взаимодействие с лейкоцитами и регулируя их проникновение в ткани [Wersäll A., 2018]. Влияние P-селектина на функцию тромбоцитов отчетливо видно во время инфекции SARS-CoV-2, о чем свидетельствует повышенная экспрессия поверхностного P-селектина

базально и при стимуляции, а также большее образование циркулирующих тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов. Тромбоциты пациентов с COVID-19 демонстрируют повышенную агрегацию, адгезию и распространение [Manne В.К., 2020]. Блокирование этого взаимодействия может снизить частоту вазооклюзионных кризов. Инклакумаб представляет собой моноклональное антитело, которое направлено против Р-селектина человека. В доклиническом исследовании инклакумаб продемонстрировал большее максимальное ингибирование межклеточных взаимодействий, чем кризанлизумаб [Mayer С.Л., 2023].

В литературе появляется все больше данных, подчеркивающих роль тромбоцитов как основных эффекторных клеток, участвующих в гемостазе, воспалении и реакциях иммунного ответа. Недавние исследования предоставили существенные доказательства их роли в борьбе с микробными угрозами, модулировании презентации антигенов, усилении адаптивных иммунных ответов, привлечении и стимулировании функций врожденных эффекторных клеток [Sharma S., 2022].

Современные антитромбоцитарные методы лечения вызывают кровотечение, гастропатии, как нежелательные побочные эффекты, новые подходы в лечении могут быть более полезными, если они направлены на специфические реакции тромбоцитов [van der Meijden P.E.J., 2019]. Рецепторный ландшафт тромбоцитов и сложная организация системы вторичных сигнальных посредников указывают на множество потенциальных мишеней для направленного поиска и создания высокоэффективных средств с минимальным риском развития осложнений.

Таблица 1.1.

Обзор ключевых антитромбоцитарных мишеней и их ингибиторов [Kuter D.J., 2022].

Мишени и их ингибиторы	Принцип действия	Антитромбоцитарные эффекты	Риск кровотечения	Способ введения	Текущие исследования
GPVI					
Ревасепт	Конкурентно связывается с открытыми коллагеновыми волокнами в месте повреждения	Предотвращает образование тромбов, индуцированных коллагеном и повреждениями атеросклеротических бляшек. Уменьшение размера инфаркта и поддержание перфузии миокарда на животных моделях.	Высокий уровень безопасности. Не пролонгирует время кровотечения. Не способствует развитию тромбоцитопении.	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза в процессе.
ACT017	Гуманизированный Fab-фрагмент моноклонального антитела. Непосредственно связывается с рецептором GPVI	Обратимо ингибирует индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов у здоровых добровольцев	Безопасен и не влияет на время кровотечения или количество тромбоцитов	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза в процессе.
PAR4					
BMS986120	Непосредственно связывается с рецептором PAR4	Снижает индуцированную тромбином агрегацию тромбоцитов у людей. Ингибирует PAR4-индуцированную агрегацию тромбоцитов и предотвращает образование окклюзионного тромба на животной модели.	Безопасен и не вызывает кровотечения и не влияет на свертываемость крови На этапе I фазы клинических исследований не сообщалось о кровотечениях	Внутрь	Клинические исследования. I фаза завершена

BMS986141	Непосредственно связывается с рецептором PAR4	Блокирует PAR4-опосредованные тромбоцитарные механизмы и предотвращает закупорку кровеносных сосудов на модели артериального тромбоза у нечеловеческих приматов	Незначительное увеличение времени кровотечения из брыжеечной артерии (в 1,2 раза), но меньше, чем у аспирина (в 2,2 раза) и клопидогрела (в 8,1 раза) у обезьян	Внутрь	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза в процессе.
GPIIb-IX-V- vWF					
ARC1779	Аптамер 1 генерации. Нейтрализует A1 домен фактора Виллебранда	Ингибирует ex vivo vWF-зависимую адгезию и агрегацию тромбоцитов у здоровых добровольцев. Снижает риск тромбоэмболии у пациентов, перенесших инсульт	У здоровых добровольцев во время фазы I не сообщалось о кровотечениях. Однако, наблюдались эпизоды кровотечений при комбинированном приеме с аспирином у пациентов с инсультом, проходящих КЭА во время II фазы	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза прекращена.
ARC15105	Аптамер 2 генерации. Нейтрализует A1 домен фактора Виллебранда	Снижает активность vWF в образцах, взятых у пациентов с ОКС	Не вызывал кровотечений у обезьян	В/в	ДКИ
Анфибатид	Токсин, полученный из лектиноподобного белка С-типа. Связывается с GPIIb	Ингибирует агрегацию тромбоцитов, опосредованную vWF и ристоцетином. Предотвращает адгезию тромбоцитов человека и образование тромбов на	Не увеличивает время кровотечения из хвоста и не вызывает кровоточащего диатеза у мышей. На I фазе не сообщалось о влиянии на	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза завершена.

		коллагене при высоких скоростях сдвига ex vivo	свертываемость крови или время кровотечения		
5-HT _{2A}					
Сарпогрелат	Связывается с 5-HT _{2A}	Снижает агрегацию тромбоцитов, стимулированную коллагеном и адреналином. Увеличивает время окклюзии артерии и уменьшает образование тромба на животной модели	Безопасен и не увеличивает кровотечение при применении в составе ДАТТ у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST. При оценке у пациентов, перенесших инсульт, кровотечение было значительно снижено в группе сарпогрелата по сравнению с группой аспирина	Внутрь	Уже используется в клинической практике
APD791	Связывается с 5-HT _{2A}	Ингибирует 5-HT-опосредованное усиление агрегации тромбоцитов, индуцируемое АДФ и коллагеном. Снижает риск рецидивирующего тромбоза и улучшает коронарную проходимость на животной модели тромбоза	Не увеличивает время кровотечения у собак.	Внутрь	Клинические исследования. I фаза завершена.

Ципрогептадин и пизотифен	Связывается с 5-HT _{2A}	Блокирует серотониновое усиление АДФ и ТХА2-опосредованных реакций тромбоцитов. Увеличивает время окклюзии сонной артерии на животных моделях тромбоза	Удлиняет время кровотечения из хвоста у мышей	Внутрь	Уже используется в клинической практике
L65.0472-00	Связывается с 5-HT _{2A} и 5-HT _{1B}	Ингибирует усиленную серотонином коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов	Во время первой фазы исследования у здоровых добровольцев не сообщалось о кровотечениях, несмотря на увеличение времени кровотечения из хвоста у крыс	Внутрь	Клинические исследования. I фаза завершена.
PDI					
Кверцетин-3-риунозид	Связывается с субстрат-связывающим доменом b'x PDI	Ингибирует агрегацию тромбоцитов человека и мыши. Ингибирует образование тромба на животной модели	Безопасный	Внутрь	ДКИ
Изокверцетин	Связывается с субстрат-связывающим доменом b'x PDI	Уменьшает размер инфаркта на крысиной модели ишемического инсульта. Сниженная выработка тромбина, образование D-димера и растворимых	О кровотечениях у онкологических больных во время второй фазы исследований не сообщалось	Внутрь	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза завершена.

		Уровень Р-селектина у здоровых добровольцев и пациентов.			
ML359	Связывается с субстрат-связывающим доменом b'x PDI	Ингибирует тромбообразование на модели артериального тромбоза на мышцах	Неизвестно	В/в	ДКИ
HPW-RX40	Связывается с каталитическим доменом a' PDI	Ингибировал агрегацию тромбоцитов, стимуляцию комплекса GPIIb/IIIa, уменьшал образование тромбообразование на модели тромбоза на мышцах	Неизвестно	В/б	ДКИ
Р-селектин					
Инклакумаб	Связывается с Р-селектином	Снижает уровень растворимого Р-селектина и общую активность Р-селектина, а также снижает образование агрегатов тромбоцитов и лейкоцитов	У пациентов с АКШ после инфузии инклакумаба не сообщалось о кровотечениях	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза завершена.
Кризанлизумаб	Связывается с Р-селектином	Блокирует функцию Р-селектина	В ходе испытаний I и II фазы не сообщалось о серьезных кровотечениях	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена, II фаза завершена, III фаза в процессе.
PSI-697	Связывается с Р-селектином	Блокирует активность Р-селектина in vitro и уменьшает воспаление и тромбообразование на животных моделях.	Безопасно, ни о каких кровотечениях у здоровых курильщиков во время фазы I не сообщалось	Внутрь	Клинические исследования. I фаза завершена.
PI3Kβ					

AZD6482	Связывается с сайтом связывания АТФ P13K β	Ингибирует агрегацию и адгезию тромбоцитов	Не увеличивает время кровотечения у здоровых добровольцев. Менее влияет на кровотечение при сочетании с аспирином, чем аспирин плюс клопидогрел	В/в	Клинические исследования. I фаза завершена.
---------	--	--	---	-----	---

Примечание: В/в-внутривенно, КЭА-коронарная эндартерэктомия, ОКС-острый коронарный синдром, PDI-протеиндисульфидизомераза

Рецептор лектина С-типа CLEC-2 в значительной степени экспрессируется на тромбоцитах. Его единственным известным физиологическим лигандом является подопланин. Доказана критическая роль CLEC-2 в венозном тромбозе, индуцированного воспалением, что вызывает особенный интерес к препаратам, нацеленным на CLEC-2 при тромбовоспалительных заболеваниях. Примечательным аспектом данной мишени является тот факт, что CLEC-2 не принимает участия в физиологическом гемостазе и поэтому, оказывая воздействие на данный рецептор, возможно влияние на процессы тромбовоспаления без существенных осложнений [Nicolson P.L., 2021].

Фосфоинозитид-3-киназа- β (PI3K β), входящая в семейство липидкиназ PI3K, играет важную роль в передаче сигналов по системе сигнальных мессенджеров от различных рецепторов тромбоцитов и необходима для стабильной адгезии тромбоцитов при высоких скоростях сдвига. Ингибиторы PI3K β AZD6482 и MIPS-9922 уменьшают тромбообразование в модельных экспериментах на собаках и мышах с минимальным воздействием на кровотечение. AZD6482 хорошо переносился здоровыми добровольцами и в комбинации с аспирином проявлял большую антитромбоцитарную активность. Несмотря на убедительные данные по изучению ингибиторов PI3K β , необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, будет ли нацеливание на PI3K β эффективной стратегией ингибирования тромбоза без пролонгирования кровотечения [Maskman N., 2020].

За последние годы тромбоциты стали одним из важнейших звеньев в опосредовании реакций на инфекционные процессы. Способность тромбоцитов воспринимать и реагировать на различные экзогенные и эндогенные инфекционные и воспалительные сигналы, инициируя иммунный ответ, объясняется широким спектром комплемента и, экспрессируемых ими, TLR (Toll-like рецепторы) и Fc-рецепторов [Ezzeroug Ezzraimi A., 2022]. В ответ на патогенное воздействие активированные тромбоциты секретируют свои гранулы, которые содержат множество иммуномодулирующих и антимикробных молекул, которые либо способствуют дифференцировке и активации иммунных клеток, либо могут напрямую убивать патогены. Эндотоксемия, вызванная липополисахаридами (ЛПС), имеет черты, подобные сепсису. ЛПС активируют TLR4 тромбоцитов, что усиливает образование NET (нейтрофильные экстрацеллюлярные ловушки). Высвобождение NET опосредовано P-селектинами, HMGB-1 и β 1-дефензинами. Тромбоциты также секретируют IL-1 β -богатые везикулы в ответ на ЛПС-зависимую активацию TLR4 [Niklaus M., 2022]. Кроме того, тромбоциты также вносят вклад в систему врожденного иммунного ответа печени, поскольку они временно взаимодействуют с клетками Купфера, которые выстилают стенки синусоидов в печени посредством GPIIb/IIIa-опосредованной адгезии тромбоцитов в присутствии таких бактерий, как *Bacillus cereus* и

метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*. Эта стабильная адгезия приводит к усилению инфильтрации нейтрофилов в синусоиды печени и вызывает реакцию хозяина против патогена [Kaltenmeier C., 2022]. Исследования показывают, что тромбоциты через TLR4 окружают и изолируют инфекцию, а также модулируют высвобождение провоспалительных цитокинов. Таким образом, исследуются методы лечения, влияющие на передачу сигналов тромбоцитов-TLR [Evans L., 2021].

Протеинтирозинфосфатаза 1b (PTP1b) высоко экспрессируется в тромбоцитах и является положительным регулятором передачи сигналов снаружи внутрь от интегрина $\alpha\text{IIb}\beta_3$. В частности, PTP1b дефосфорилирует С-концевой ингибирующий тирозин β_3 -ассоциированных SFK, инициируя нижестоящую передачу сигналов. Передача сигналов outside-in регулирует ремоделирование цитоскелета и важна для распространения тромбоцитов по фибриногену, а также для ретракции сгустка, двух важных процессов для стабильного образования тромбов и прекращения кровотечения. PTP1b-дефицитные тромбоциты обычно реагируют с коллагеном в условиях промежуточного сдвига, однако объем агрегатов резко снижается в условиях высоких скоростей сдвига (3000 c^{-1}), что обычно обнаруживается в стенозированных артериях, склонных к окклюзии. Это дает дополнительные убедительные доказательства того, что PTP1b является потенциальной антитромботической мишенью [Tautz L., 2015].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Было исследовано 148 новых соединений, относящихся к 12 различным химическим классам: 1,3-имидазолы, 1,2,4,5-тетразины, 3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дионы (ксантины), N9-имидазобензимидазолы, 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидины, 1H-бензимидазолы, N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, 3H-тиазолы, 6H-1,3,4-тиадиазины, 4H-бензо[1,3]оксазины, 2,3-дигидробензофураны, 1H-бензохромены.

Данные соединения синтезированы в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградском государственном медицинском университете» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного Федерального университета, Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирском государственном медицинском университете» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарском государственном техническом университете».

Исследование выполнено в соответствии с требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161), и в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии №81 от 03.11.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

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

Экспериментальное исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России протокол №2022-2020 от 18.02.2020 г.

В работе были использованы следующие реактивы и приборы:

-*реактивы*: физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия); цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия); динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (Sigma, США); диметилсульфоксид (ДМСО) (Татхимфармпрепараты, Россия); хлоралгидрат (Органика, Россия); хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия); бриллиантовый зеленый (ООО «ФАРМ-ПРОЕКТ», Россия).

-*приборы*: аквадистиллятор ДЭ-4-2 (ЗАО «Электромедоборудование», Россия, Саранск); облучатель рециркулятор медицинский («Armed», Китай); агрегометр Viola220 LA (ООО НПФ «Биола», Россия); кюветы стеклянные (ООО НПФ «Биола», Россия); магнитные мешалки (ООО НПФ «Биола», Россия); двухканальный анализатор агрегации тромбоцитов ChronoLog - 700 Lumi-Aggregometer («Chronolog», США); кюветы пластиковые («Chronolog», США); магнитные мешалки («Chronolog», США); центрифуга MultiCentrifuge Elmi CM 6MT (Elmi, Латвия); электронные весы (Ohauscorporation, 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 (SFMHospitalProductsGmbH, GERMANY); инструменты хирургические (МИЗ-Ворсма, Россия); микроскоп AxioCamplus (CarlZeiss, Германия); цифровая камера AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия).

Исследования *in vitro* проводились на плазме богатой тромбоцитами половозрелых кроликов-самцов породы Шиншилла, а для проведения исследований *in vivo* использовались половозрелые нелинейные крысы-самцы, как виды, рекомендованные Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н., 2012 г.] и общепринятые для данного этапа исследований.

Для исследования острой токсичности соединений-лидеров использовали грызунов (половозрелых мышей обоего пола) согласно действующему «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012 г.]. Количество животных, используемое в исследовании, было достаточным для полноценного исследования и регистрации изучаемых эффектов.

Эксперименты были выполнены на богатой тромбоцитами плазме 172 кроликов-самцов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг, а также 12 образцах крови здоровых добровольцев доноров, 1835 белых беспородных крысах массой 250,0-300,0 г, 476 белых половозрелых беспородных мышак самцах массой 20,0-25,0 г.

Животные подвергались карантину в течение 14 дней (крысы) и 21 дня (кролики) в условиях отдельных боксов вивария кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Животные были распределены по экспериментальным группам рандомизированно с использованием в качестве критерия массу тела, так, чтобы ее индивидуальное значение не отклонялось 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»).

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.

Эвтаназия производилась при необходимости с помощью транслокации шейных позвонков крыс, находящихся под хлоралгидратным наркозом, согласно правилам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012 г.] и осуществлялась своевременно, без причинения страданий, в помещении, где не содержатся другие животные.

Функциональную активность тромбоцитов *in vitro* исследовали на богатой тромбоцитами плазме 36 кроликов-самцов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. В качестве препарата сравнения использовалась ацетилсалициловая кислота. Влияние тестируемых соединений на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* изучали согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Viola LA-220. Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов, полученной по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971).

В качестве индуктора процессов агрегации тромбоцитов использовали АДФ, в конечной концентрации 5мкМ [Kwon H.W., 2016].

Исследуемые соединения и препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в диапазоне концентраций 1×10^{-4} – 1×10^{-6} М (100-1 мкМ). Для веществ с наиболее высокой

антиагрегантной активностью и препарата сравнения методом регрессионного анализа рассчитывали величину IC_{50} (концентрация, ингибирующая агрегацию тромбоцитов на 50%).

В ходе виртуальной оценки перспективности скафолдов *in silico* в качестве материалов выступали данные по 2D-структуре и уровню антиагрегантной активности 148 новых производных, относящихся к 12 различным химическим классам: 1,3-имидазолы, 1,2,4,5-тетразины, 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дионы (ксантины), N9-имидазобензимидазолы, 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидины, 1*H*-бензимидазолы, N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы, 3*H*-тиазолы, 6*H*-1,3,4-тиадиазины, 4*H*-бензо[1,3]оксазины, 2,3-дигидробензофураны, 1*H*-бензохромены.

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

- 1) рисование и обработку структурных формул, формирование и ведение химических баз данных – ChemOffice 9.0 [PerkinElmer, 2020];
- 2) расчет статистической значимости перспективности химического ряда с использованием биномиального критерия – оригинальный скрипт на Visual Basic;
- 3) общую обработку данных – MS Office Excel 2016.

С целью формирования базы данных по структурам и антиагрегантной активности Структурные формулы всех 148 новых соединений были приведены к стандартному виду: проверены связи и валентности и развернуты многоатомные функциональные группы.

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

В созданной базе данных были определены следующие поля:

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

С использованием построенных скаффолдов была сформирована таблица фрагментного описания 148 исследуемых соединений, в которой были индексированы химические классы по базовому скаффолду.

Наличие соединений с заданным уровнем активности индексировалось значением 1, отсутствие – значением 0.

В созданной таблице были определены следующие переменные:

- 1) Mol_ID – номер записи в БД SAR APlat;
- 2) Code – буквенно-цифровой (лабораторный) шифр соединения;
- 3) APlat – процент снижения амплитуды агрегации тромбоцитов в сравнении с контролем;
- 4) Levels – уровень антиагрегантной активности по результатам кластеризации.

Соединения в таблице располагались в порядке уменьшения их антиагрегантной активности.

Статистическая оценка значимости влияния различных структурных параметров на уровень антиагрегантной активности новых производных 1,3-имидазола, 1,2,4,5-тетразина, 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-диона, N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола, 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина, 1*H*-бензимидазола, N9-2,3-дигидроимидазобензимидазола, 3*H*-тиазола, 6*H*-1,3,4-тиадиазина, 4*H*-бензо[1,3]оксазина, 2,3-дигидробензофурана и 1*H*-бензохромена была проведена методом подструктурного анализа [Васильев П.М., 2014] с использованием биномиального критерия [Глотов Н.В., 1982] с помощью оригинального скрипта на Visual Basic.

Подсчитывали общее число признака i в классе активности h (высокоактивные) и nh (невысокоактивные)

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

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

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

M – число видов признаков.

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

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

Вычисляли Байесовскую вероятность встречаемости признака i в классе h и nh [Голендер, 1978]

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

Различия в частоте встречаемости признака i в классах h и nh определяли по биномиальному критерию [Глотов, 1982]

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

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

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

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

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

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

Статистически достоверное влияние соответствует $Ind_{ih} > 3$.

Если $P_{ih} \geq P_{inh}$, то признак i считали детерминирующим высокую активность. Если $P_{ih} < P_{inh}$, то признак i определяет отсутствие у соединения высокой активности. По этой же схеме оценивали влияние признака i на наличие высокого или умеренного (объединенная метка high or moderate) уровня активности Ind_{ihm} , $i = 1 \dots M$.

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

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

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

С целью молекулярного моделирования и виртуального докинга были построены и оптимизированы 2D- и 3D-структуры изучаемого химического соединения, референсных препаратов и веществ, а также белков-мишеней:

- 1) 2D-структурная формула нового соединения-лидера с высокой антиагрегантной активностью L-36;
- 2) 2D-структурные формулы наиболее близких к L-36 по спектру антиагрегантной активности препаратов сравнения аспирина и дазоксибена;
- 3) 3D-модели белков-мишеней, релевантных особенностям антиагрегантного действия L-36 – циклооксигеназы 1, циклооксигеназы 2 и тромбоксан-А-синтазы.

При выборе белков-мишеней, релевантных спектру антиагрегантной активности L-36, использовались обобщенные данные по результатам экспериментального тестирования данного соединения.

Для получения указанных структурных данных выполняли поиск в следующих интернет-ресурсах:

- 1) база знаний по структуре и функциям белков UniProtKB [UniProtKB, 2022];
- 2) банк данных по экспериментальным 3D-моделям белков PDBe [PDBe, 2022];
- 3) база данных по теоретическим 3D-моделям белков AlfaFold [AlfaFold, 2022];
- 4) база данных по известным лекарственным препаратам DrugBank [DrugBank, 2022].

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

- 1) построение методами молекулярной механики конформеров соединений – MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, 2021];
- 2) оптимизация методами квантовой химии конформации соединений – MOPAC2012 [MOPAC, 2021];
- 3) определение аминокислот, образующих сайт связывания – PrankWeb 1.0 [Jendele, 2019];
- 4) построение пространства докинга и виртуальный скрининг методом докинга новых химических соединений – PyRx 0.8 [PyRx, 2021];
- 5) докинг низкомолекулярных лигандов в специфические сайты связывания белков-мишеней – AutoDockVina 1.1.1 [Trott, 2010];
- 6) рисование и обработка 2D-структурных формул и 3D-моделей биомолекул – ChemOffice 9.0 [PerkinElmer/Chemistry, 2017];
- 7) общую обработку данных и построение графиков – MS Office Excel 2013 [Microsoft Office, 2022].

Расчеты выполняли с использованием 64-х ядерного персонального суперкомпьютера гибридной архитектуры – 8 x 8 x Intel Xeon E7-8837 2.66 ГГц 8core / DDR3 256 Gb 1333 MHz / GPU PNY nVidia Tesla K40 / HDD 4 x 4,0 Tb / OS Linux CentOS – пиковой производительностью ~2.8 Тфлопс.

Для соединения L-36 и двух препаратов сравнения по значениям энергий докинга ΔE были рассчитаны значения констант связывания K в отношении всех релевантных биомишеней.

Зависимость энергии докинга ΔE от константы связывания вещества с сайтом белка-мишени K описывается формулой [Chemoinformatics, 2003]

$$\Delta E = -RT \ln K ,$$

из которой после несложных преобразований получим

$$K = e^{-\Delta E/RT} ,$$

где R – газовая постоянная, равная 8.314 Дж/(моль·К);

T – температура, стандартное значение в докинге равно 300 °К.

Относительная аффинность соединения C (L-36) для биомишени i в сравнении с другим соединением j (аспирином, дазоксibenом) определяется вектором значений

$$Aff_{C,i,j} = \frac{K_{i,j}}{K_{C,i}} ,$$

где $K_{i,j}$ – константа связывания соединения j с биомишенью i ;

$K_{C,i}$ – константа связывания соединения C с биомишенью i .

Множество значений $Aff_{C,i,j}$ образует вектор относительной аффинности соединения C (L-36), в сравнении с референсными препаратами.

Изучение влияния вещества на функциональную активность тромбоцитов *in vivo* проводили согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Viola LA-220. Тестируемыми образцами являлась богатая тромбоцитами плазма беспородных половозрелых крыс-самцов массой 250,0-300,0 г, которым вводили исследуемые соединения, проявившие наиболее высокую антиагрегантную активность *in vitro* в дозах, эквивалентных значениям IC_{50} , полученным в опытах *in vitro*, а также препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и тирофибан. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 5 мкМ.

Для всех тестируемых образцов методом регрессионного анализа рассчитывали величину ED₅₀ (эффективная доза, в которой вещество ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

Для изучения острой токсичности использовали половозрелых мышей согласно действующему «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012]. Количество животных было достаточно для полноценного исследования и регистрации изучаемых эффектов.

Согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012], один из путей введения исследуемых фармакологических средств в исследовании острой токсичности должен соответствовать планируемому способу приема лекарства в клинической практике. С учетом основного пути применения препарата в клинической практике соединения вводились внутривенно или внутривенно с использованием атравматического металлического зонда.

После введения исследуемых соединений за животными установлено наблюдение на наличие смертности или токсических признаков в течение 14 дней исследования: в первые сутки непрерывно в течение 6 часов после введения вещества регистрировали сроки развития интоксикации и гибель животных [Миронов А.Н., 2012; Трахтенберг И.М., 1991; Griffin L.P., 1981], в последующие дни - 2 раза в день.

Изучение влияния тестируемых образцов на функциональную активность тромбоцитов, стимулированных различными индукторами проводилось *in vitro* согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ViolaLA 220. Эксперименты были проведены на богатой тромбоцитами плазме 12 кроликов-самцов, а также суспензии отмытых тромбоцитов в случае использования в качестве индукторов агрегации агониста тромбоксановых рецепторов U46619 и тромбина [Zhou Y., 2020; Octave M., 2021].

Влияние соединений на пуриновые P2Y₁- (*in vitro*) и P2Y₁₂-рецепторы (*in vivo*) тромбоцитов было изучено методом малоуглового светорассеяния на приборе Лайт-Скан (НПФ «Люмекс», Россия) [Сакаев М.Р., 2000]. Исследования выполнялись на богатой тромбоцитами плазме кроликов в кальциевой и безкальциевой среде [Beck F., 2017].

Методом иммуноферментного анализа, с применением высокочувствительных и специфичных в видовом отношении наборов ELISA kit for Thromboxane B2 (TXB2) (CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США) и ELISA kit 6-Keto-Prostaglandin F1Alpha (CUSABIO TECHNOLOGY LLC., США), была произведена оценка влияния веществ на баланс тромбоксана и простациклина [Chen H., 2018; Rangarajan S., 2020].

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

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

Для более полной оценки влияния соединений на различные звенья системы гемостаза была проведена степень изменений параметров тромбоэластограммы крыс при однократном внутривенном введении на двухканальном тромбоэластографе TEG5000 (Haemonetics Corporation, Финляндия) [Carter K.T., 2020; Chowdhury A., 2021].

Исследования фармакокинетики¹ субстанции соединений Ф-168 и RU-891 проводили на крысах, биоэквивалентность лекарственных форм оценивали на кроликах.

В работе использовали жидкостной хроматограф (Shimadzu, Япония). Определение соединения Ф-168 осуществлялось при помощи флуоресцентного детектора (λ экстинкции/эмиссии 290/340 нм) на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 150x4,6 мм) с использованием модификатора фазы. Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил (УФ210) (Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещенного фосфата калия 50 мМ.

Оптимальными условиями количественного определения субстанций Ф-168 являются следующие: буферная система из 50 мМ однозамещенного фосфата калия pH=4,68; соотношение водной и органической фазы 75%:25% (v|v), с добавлением модификатора фазы натриевой соли гептансульфоновой кислоты (0,12 %); температурный режим 40⁰С. При данных условиях время удерживания составило 6,7 - 7,1 мин.

Оптимальными условиями количественного определения субстанции RU-891 являются следующие: буферная система из 50 мМ однозамещенного фосфата калия pH=6,0; соотношение водной и органической фазы 74%:26% v|v, с добавлением модификатора фазы натриевой соли

¹ За помощь в проведении фармакокинетических исследований выражаем глубокую признательность заведующей лабораторией фармацевтических аналитических исследований НЦИЛС ВолгГМУ, д.б.н. Смирновой Людмиле Андреевне.

гептансульфоновой кислоты (0,12 %); температурный режим 30°C. При данных условиях время удерживания составило 5-5,5 мин.

Количественное определение проводилось в диапазоне концентраций от 500 нг/мл до 10 мкг/мл. В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер (рисунки 2.1 и 2.2).

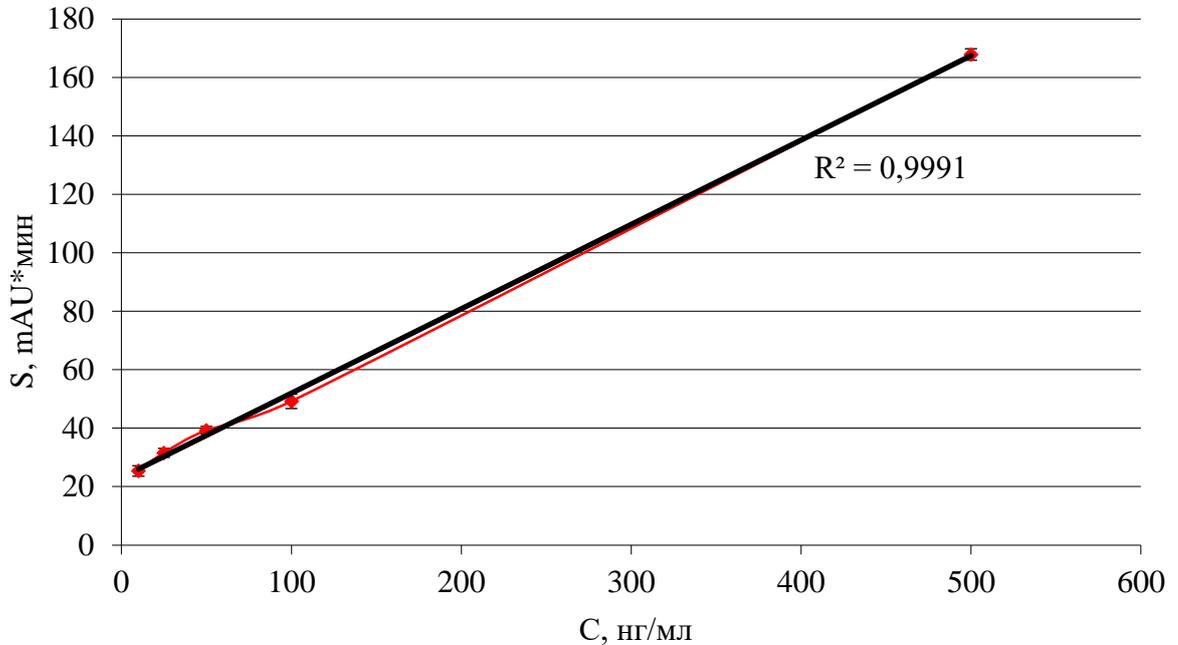


Рисунок 2.1. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации вещества Ф-168 в плазме крови.

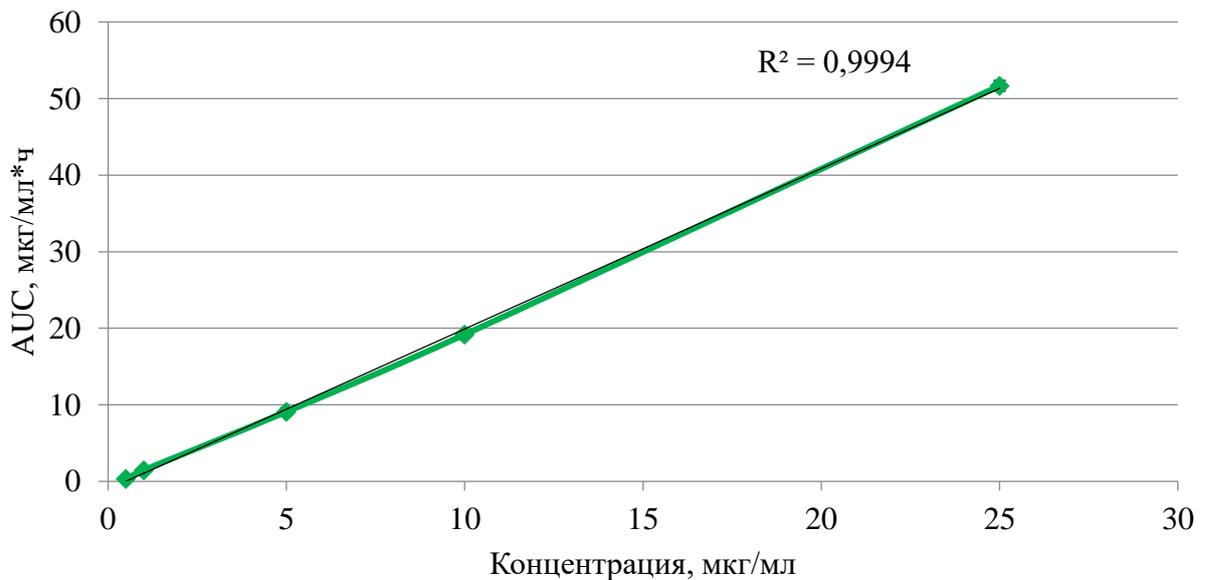


Рисунок 2.2. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации вещества RU-891 в плазме крови.

Были определены внутривневные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 20% в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не превышали в основном 15%.

При изучении фармакокинетики соединений Ф-168 и RU-891 проводили оценку распределения соединения в организме крыс в тканях с сильной васкуляризацией – сердце, мозге, легких и селезенке; с умеренной васкуляризацией – мышце и слабой васкуляризацией - сальнике, а также в органах, обеспечивающих элиминацию - печени и почках. Содержание изучаемых соединений определяли также в моче и кале.

Для оценки фармакокинетических свойств изучаемых лекарственных веществ рассчитывали ряд параметров [Миронов А.Н., 2012]: площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” (AUC); общий (кажущийся) клиренс (cl); константа элиминации (K_{el}); общий (кажущийся) объем распределения (V_d); период полувыведения ($T_{1/2}$); среднее время удерживания (MRT). Для оценки интенсивности проникновения вещества в ткани использовали вычисление тканевой доступности (ft).

Прогноз возможных метаболитов соединений Ф-168 и RU-891, а также изменение физико-химических свойств в процессе биотрансформации проводили с помощью программы «PALLAS» (CompuDrug Chemistry Ltd., Венгрия). Определение метаболитов осуществляли также при использовании кислотного, щелочного и ферментативного гидролиза проб мочи и кала через 48 часов после введения.

Для количественной оценки связывания исследуемых препаратов с сывороточным альбумином использовался метод диализного равновесия [Чегер С.И., 1975]. Диализ проводился через полупроницаемую мембрану с размером пор 1200 Да (SERVA, Германия) в среде физиологического раствора Локка.

Антитромботическую активность субстанции и инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 оценивали в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012] в условиях *in vivo* при однократном внутривенном введении крысам-самцам на моделях артериальных тромбозов, индуцированных аппликацией хлоридом железа (III) [Kurz K.D., 1990; Spasov A.A., 2017; Ito Y., 2018] и воздействием электрического тока [Guglielmi G., 1991; Спасов А.А., 2016; Zhao X., 2016; Kuznetsova T.A., 2021] на сонную артерию крыс, а также при генерализованном адреналин-коллагеновом тромбозе на мышцах [Di Minno G., 1983; Manne B.K., 2018; Спасов А.А., 2020], на модели артериального тромбоза у крыс с экспериментальным некоронарогенным инфарктом

миокарда [Wei H., 2017; Boarescu P.-M., 2019; Спасов А.А., 2021], модели венозного тромбоза крыс [Jin Q.-Q., 2017; Albadawi H., 2017; Спасов А.А., 2021] и на модели оценки времени кровотечения у мышей [Mohammed B.M., 2020; Wyseure T., 2018]. Материал для морфологического исследования² помещался в 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) на 24 часа. Окраску осуществляли гематоксилином и эозином по общепринятым гистологическим методикам [Саркисов Д.С., 1996]. Для анализа средней площади тромбов на срезах легких мышей использовали цифровую камеру Аxiocam 105 color (CarlZeiss, Германия) на базе микроскопа Аxiocamplus (CarlZeiss, Германия) с использованием объектива x10; x40 и окуляра x10, а также программное обеспечение ZEN Pro 2012 (CarlZeiss, Германия) [Авгандилов Г.Г., 2002].

Моделирование гиперцитокинемии осуществляли с помощью добавления в тест-систему раствора липополисахарида в концентрации 20 нг/мл. Для веществ с наиболее высокой антиагрегантной активностью методом регрессионного анализа рассчитывали величину IC₅₀ (концентрация, ингибирующая агрегацию тромбоцитов на 50%).

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

В качестве препаратов сравнения было выбрано известное антиагрегантное средство блокатор гликопротеиновых P₂/P₃ рецепторов тромбоцитов тирофибан (Correvio, Швейцария), ацетилсалициловая кислота (Sigma, США), верапамил (ОАО Биосинтез, Россия).

² исследования при помощи заведующего кафедрой патологической анатомии, д.м.н., профессора А.В. Смирнова, за что выражаем ему глубокую признательность.

ГЛАВА 3. АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ СТРУКТУР

С целью выявления молекул с наибольшим уровнем активности на начальном этапе исследования была проведена оценка антиагрегантных свойств соединений, относящихся к 12 различным классам химических производных в условиях *in vitro*.

3.1. Антиагрегантная активность гетероциклических соединений *in vitro* 3.1.1. Влияние на агрегацию тромбоцитов моноциклических соединений с гетероатомом азота

Объектом исследования явились 20 соединений, представляющих собой азотсодержащие моноциклические гетероциклы, производные 1,3-имидазола и 1,2,4,5-тетразина. В качестве препарата сравнения была исследована ацетилсалициловая кислота.

При изучении производных 1,2,4,5-тетразина было обнаружено 87,5% соединений с низким уровнем активности, не превышающим таковой для ацетилсалициловой кислоты. Активность 41,7% оставшихся образцов позволила отнести их к соединениям со средним уровнем активности, сравнимым с таковым для ацетилсалициловой кислоты.

В ходе исследования производных 1,3-имидазола было установлено, что все изученные соединения проявляют, в той или иной степени, антиагрегантную активность. 58,3% соединений были отнесены к классу низко активных. Исследование 41,7% остальных соединений позволило выявить образцы под шифрами LOSAZ-33, RUI-19, RUI-20 и RUI-27, которые проявили средний уровень активности, выше 50% (приложение 1, таблица 3.1).

Дозозависимое изучение активности референсного препарата позволило рассчитать показатель IC_{50} , который для ацетилсалициловой кислоты составил 81,0 мкМ (таблица 3.2).

Инкубация тест-системы с исследуемым соединением под шифром LOSAZ-33 в конечной концентрации 100, 10 и 1 мкМ позволила установить дозозависимое ингибирование процессов агрегации тромбоцитов. Значение IC_{50} для соединения LOSAZ-33 составило при этом 70,4 мкМ (таблица 3.2).

Образцы RUI-19 и RUI-20 также проявили дозозависимый антиагрегантный эффект, что позволило рассчитать для данных соединений значение IC_{50} - 69,4 и 71,6 мкМ, соответственно (таблица 3.2).

Сопоставимым по активности оказалось и соединение RUI-27, значение IC₅₀ для которого составило 74,4 мкМ (таблица 3.2).

Таблица 3.2.

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

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

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

Таким образом, в ходе изучения гетероциклических азотсодержащих моноциклических веществ было выявлено 4 наиболее активных соединения производных имидазола, по показателю IC₅₀ не значительно превосходящих по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. В ряду производных пиримидина при проведении скрининговых исследований высокоактивных соединений выявлено не было.

3.1.2. Действие на агрегацию тромбоцитов конденсированных азотсодержащих гетероциклических соединений

Среди азотсодержащих конденсированных гетероциклических соединений было изучено 103 вещества на предмет антиагрегантной активности: производные ксантина, N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола, 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина, 1H-бензимидазола, N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы.

В ряду производных 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина и 1H-бензимидазола все соединения, в той или иной степени, проявили антиагрегантное действие. Однако, соединений, активность которых превышала бы значение в 50%, выявлено не было. Это позволяет отнести изученные производные к умеренно и низко активным. Так, в ходе кластеризации соединений

группы производных 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина было выявлено 62,5% образцов с низким уровнем активности и 37,5% соединений, проявляющих средний уровень активности. В ряду производных 1*H*-бензимидазола характерным было наличие 42,9% соединений с низким уровнем антиагрегантной активности и 57,1% веществ, проявляющих средний уровень активности, но не превосходящий таковой для ацетилсалициловой кислоты (приложение 1, таблица 3.3).

В ходе изучения веществ, относящихся к группе производных ксантина, было выявлено соединение Ф-168, проявляющее наибольшую антиагрегантную активность. В концентрации 100 мкМ соединение Ф-168 статистически значимо блокировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ на 66,2% (приложение 1, таблица 3.3). Соединений, проявляющих средний уровень активности при исследовании производных ксантина, выявлено не было. Большинство образцов - 85,7% - соответствовали низкому уровню активности.

Среди производных N9-мидазо[3,2-а]бензимидазола было выявлено 72,2% низко активных соединений. Наиболее активными оказались соединения RU-891, RU-1301 и RU-1303, которые проявляли ингибирующее влияние на процессы агрегации тромбоцитов 54,0, 54,9 и 54,0%, соответственно (приложение 1, таблица 3.3).

Наличие уровня активности выше 50% позволило изучить дозозависимое действие соединений с целью установления показателя IC_{50} . Соединение под шифром RU-1303 было сопоставимо по активности с препаратом сравнения ацетилсалициловой кислотой. Значения IC_{50} для них составили 84,8 и 81 мкМ, соответственно (таблица 3.4).

Показатель ингибирующей концентрации для веществ RU-1301 и RU-1309 составил 70,5 и 61,1 мкМ, соответственно (таблица 3.4).

Дозозависимое изучение влияния соединения Ф-168 на функциональную активность тромбоцитов, стимулированных АДФ, позволило установить показатель IC_{50} для данного вещества, который составил 27,0 мкМ (таблица 3.4).

В концентрации 100 мкМ соединение RU-891 проявило 54,0% антиагрегантной активности. Дальнейшее изучение соединения RU-891 в концентрациях 10 и 1 мкМ позволило рассчитать значение IC_{50} , которое составило 66,8 мкМ (таблица 3.4).

Таблица 3.4.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	Ф-168	66,2±2,3*	38,5±1,4*	8,9±1,6	27,0
2.	RU-891	54,0±4,1*	32,8±2,9*	15,2±3,0	66,8
3.	RU-1301	54,9±1,7*	27,5±2,4	8,2±2,7	70,5
4.	RU-1303	54,0±2,0*	25,9±2,8	13,0±3,5	84,8
5.	Ацетилсалициловая кислота	56,5±2,1*	20,5±5,4*	11,0±3,7	81,0

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

** - различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ($p < 0,003$);

Примечание: n-число тестируемых животных

Изучение антиагрегантной активности азотсодержащих конденсированных гетероциклических структур позволило выявить соединения Ф-168 и RU-891, которые превосходят по показателю IC₅₀ активность ацетилсалициловой кислоты в 3 и 1,2 раза, соответственно.

3.1.3. Антиагрегантная активность серосодержащих гетероциклических соединений

Результаты исследования конденсированных гетероциклических соединений, имеющих в своей структуре гетероатом серы, представлены в приложении 1 в таблице 3.5. В ряду производных 3*H*-тиазола было найдено 66,7% соединений, проявляющих достаточно высокий уровень активности и 33,3% веществ с умеренной активностью. Образец под шифром AZHT-7 при инкубации с богатой тромбоцитами плазмой кролика в концентрации 100 мкМ способствовал снижению амплитуды агрегации тромбоцитов на 65,8%. Дозозависимое изучение данного вещества позволило рассчитать величину IC₅₀, которая для соединения AZHT-7

составила 30,4 мкМ (таблица 3.6). Активность другого производного 3Н-тиазола соединение AZHT-9 превосходила по значению IC₅₀ образец AZHT-7 и ацетилсалициловую кислоту в 1,5 и 4 раза, соответственно (таблица 3.6).

Среди производных 6H-1,3,4-тиадиазина было выявлено 50% высоко активных соединений. Характерным для данного класса было наличие 16,7% образцов и с умеренной активностью, а также 33,3% образцов с низким уровнем антиагрегантной активности.

Соединение L-91 по величине IC₅₀ превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 2,2 раза (таблица 3.6). Сопоставимой была активность образцов под шифрами L-14 и L-17. Ингибирующая концентрация, при которой наблюдается 50% антиагрегантного эффекта, для данных соединений составила 11,6 и 10,2 мкМ, соответственно (таблица 3.6).

Наиболее активным в ряду производных 6H-1,3,4-тиадиазина оказалось соединение под шифром L-36. Значение IC₅₀ для данного образца составило 8,6 мкМ (таблица 3.6).

Таблица 3.6.

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

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

*- различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни

(p<0,05)

Таким образом, в ходе исследования антиагрегантной активности серосодержащих гетероциклических соединений было выявлено новое производное 6H-1,3,4-тиадиазина

соединение L-36, превосходящее по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 9,4 раза.

3.1.4. Влияние на агрегацию тромбоцитов кислородсодержащих гетероциклических конденсированных соединений

В качестве объекта исследования выступили 16 новых производных 4*H*-бензо[1,3]оксазина, 2,3-дигидробензофурана и 1*H*-бензохромена. В ходе изучения антиагрегантных свойств соединений указанных химических рядов не было выявлено соединений с достаточным уровнем активности, превосходящим таковой для ацетилсалициловой кислоты (приложение 1, таблица 3.7) (рисунок 3.1).

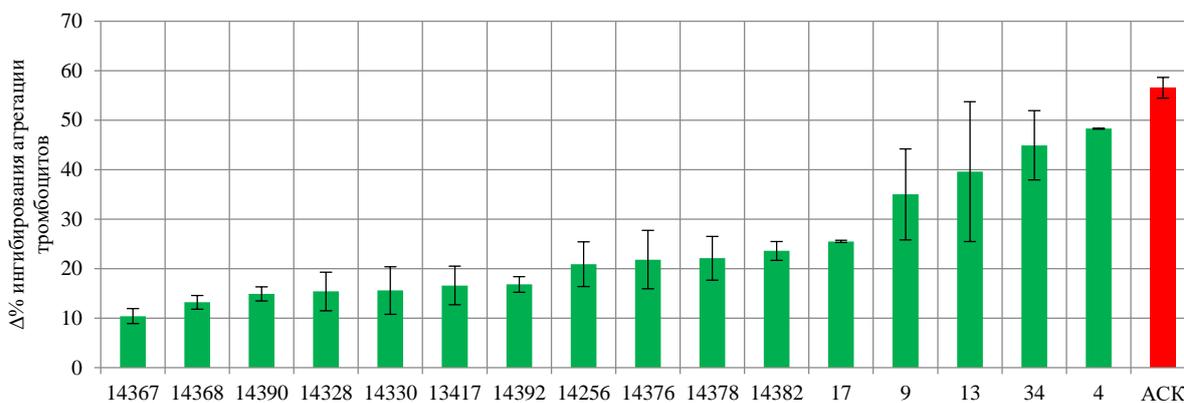


Рисунок 3.1. Антиагрегантная активность кислородсодержащих гетероциклических конденсированных соединений в концентрации 100 мкМ

Примечание: АСК - ацетилсалициловая кислота

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

Проведенное изучение различных классов гетероциклических соединений позволило выявить производное ксантина соединение Ф-168, производное N9-2,3-дигидроимидазобензидазола RU-891 и производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина L-36, как наиболее перспективные и представляющие интерес для дальнейшего углубленного изучения.

3.1.5. Анализ перспективности скафолдов для поиска и создания наиболее активных соединений *in silico*

Молекулярное моделирование — бурно развивающаяся область современной теоретической химии. Существует множество методов молекулярного моделирования, ориентированных на решение различных задач и различающихся как стратегическим подходом, так и программной реализацией. Моделирование молекулярной структуры является необходимым шагом в любом исследовании SAR/QSAR. Deskрипторы, используемые при таком моделировании, определяют возможности и успешность решения тех или иных задач SAR/QSAR [Kuz'min V., 2021]. В ходе дизайна и поиска новых перспективных структур потенциальных лекарственных веществ широко используют методы анализа количественной связи структура–активность и структура–свойство (Quantitative Structure–Activity/Property Relationships – QSAR/QSPR), которые предполагают описание структуры соединений посредством набора числовых параметров (deskрипторов) и построение предсказательных моделей связи активности или свойства с такими параметрами с помощью методов статистического машинного обучения [Cоснин С.Б., 2015]. Внедрение в драгдизайн методов QSAR/QSPR позволяет решить ряд важных задач [Бекзадаев Д.М., 2018]:

1. определить молекулярные фрагменты, ответственные за фармакологическую активность и токсичность;
2. провести моделирование и прогноз для требуемых соединений;
3. осуществить выбор наиболее эффективных и наименее токсичных соединений для синтеза.

Таким образом, является необходимым проведение *in silico* исследований массива из 148 производных различных химических рядов.

В ходе сбора данных о химической структуре и уровне антиагрегантной активности была создана стандартизованная база данных SAR APlat в формате СУБД ChemFinder 9.0.

На следующем этапе была проведена кластеризация всех исследованных соединений по уровню антиагрегантной активности. Указанные соединения были экспериментально изучены на антиагрегантную активность по методике Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) (приложение 1). Величина антиагрегантной активности была представлена в виде процентного снижения амплитуды агрегации тромбоцитов, в сравнении с контролем. Пример начала таблицы фрагментного описания химических структур приведен на рисунке 3.2.

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
4	149	12	9	7	18	16	48	14	3	6	6	3	7	← Число соединений										
5	Code	Core01	Core02	Core03	Core04	Core05	Core06	Core07	Core08	Core09	Core10	Core11	Core12											
6	RU-1318	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	← Начало высоко активные										
7	RU-1302	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0											
8	КНФА-482	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
9	F-168	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
10	RU-891	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0											
11	RU-1301	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0											
12	AZHT-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
13	AZHT-7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0											
14	L-14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0											
15	L-36	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0											
16	L-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0											
17	L-91	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0											
18	RU-19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	← Далее не высоко активные										
19	RU-23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
20	RU-21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
21	RU-22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
22	RU-24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
23	RU-31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
24	RU-29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
25	RU-32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
26	RU-30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
27	HC-0054	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
28	HC-0017	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
29	HC-0009	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
30	HC-0018	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
31	HC-0025	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
32	HC-0016	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
33	HC-0024	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
34	HC-0019	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
35	RU-20	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
36	КНФА-365	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
37	КНФА-357	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
38	КНФА-88	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
39	КНФА-367	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											

Рисунок 3.2. Начало таблицы фрагментного описания химических структур.

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

Наиболее перспективными по показателю индекса значимости оказались следующие химические классы:

1. 3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дионы (индекс значимости 4);
2. N9-имидазобензимидазолы (индекс значимости 4);
3. 6*H*-1,3,4-тиадиазины (индекс значимости 5).

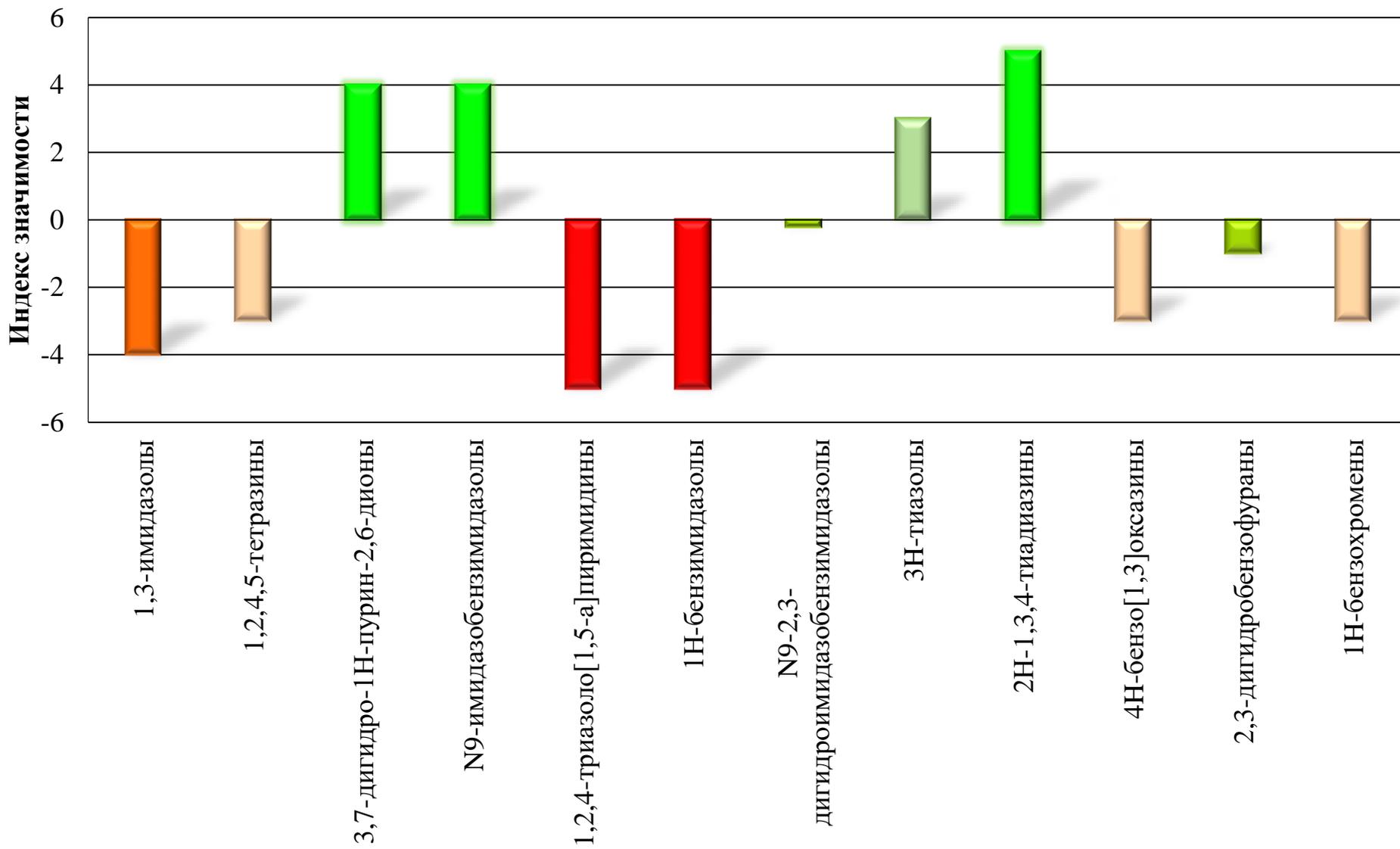


Рисунок 3.3. Индекс значимости исследованных химических рядов.

При проведении экспериментального скрининга 148 оригинальных соединений было выявлено 3 наиболее активных вещества – Ф-168, RU-891, L-36 (рисунок 3.4) – относящихся к приведенным выше наиболее перспективным классам по показателю индекса значимости.

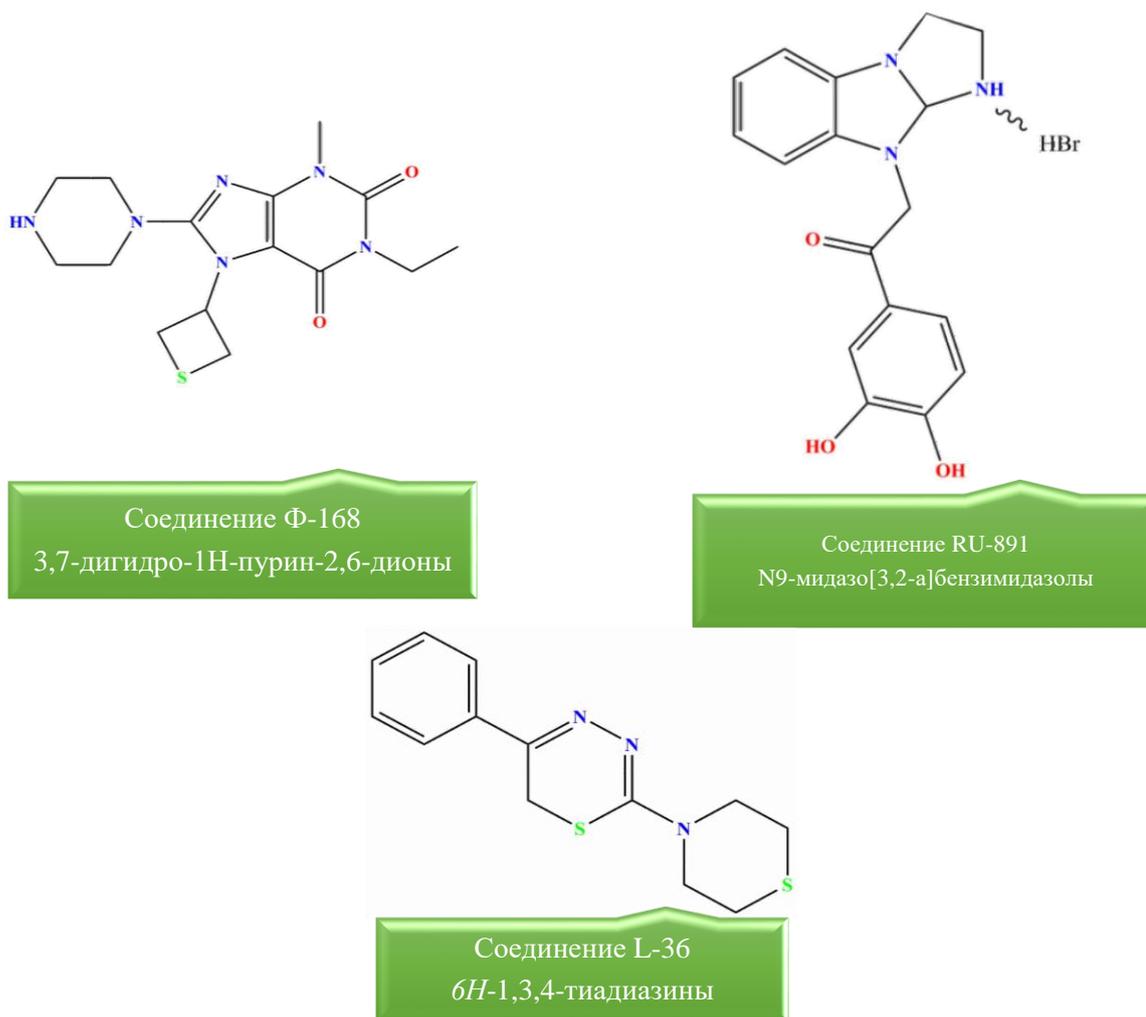


Рисунок 3.4. Структурные формулы соединений-лидеров.

3.1.6. Заключение

Таким образом, кластеризация 12 химических рядов позволила выявить наиболее перспективные скафолды для поиска и создания высоко эффективных антиагрегантных средств. Так, в ходе проведенного экспериментального скрининга было установлено, что соединения с высоким уровнем антиагрегантной активности относятся к следующим производным: 3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дионы, N9-имидазобензимидазолы и 6H-1,3,4-тиадиазина. Проведенный анализ *in silico* позволил подтвердить выбор соединений Ф-168, RU-891 и L-36, как наиболее активных, для дальнейшего углубленного изучения. На основании данных, полученных в ходе *in*

vitro и *in silico* исследований, было проведено изучение наиболее активных соединений в условиях целостного организма *in vivo*.

3.2. Влияние на процессы агрегации тромбоцитов новых гетероциклических структур *in vivo*

Исследования *in vitro* и *in silico* позволили выявить соединения, обладающие наиболее высоким уровнем антиагрегантной активности – Ф-168, RU-891 и L-36. Показатели IC₅₀ в несколько раз превосходили значения препарата сравнения. Однако, в указанных исследованиях невозможно полностью учесть суммарное влияние различных факторов целостного организма. Поэтому, на следующем этапе представилось интересным изучить антиагрегантную активность наиболее активных соединений в опытах *in vivo*.

3.2.1. Антиагрегантная активность и острая токсичность производного ксантина соединения Ф-168

При однократном внутривенном введении субстанции соединения Ф-168, была установлена высокая ингибирующая способность в отношении АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс. Образец Ф-168 в дозе 2 мг/кг снижал амплитуду агрегации тромбоцитов на 85,2% (таблица 3.7). При уменьшении дозы до 1 и 0,5 мг/кг уровень активности составил 57,2 и 34,5% соответственно. При этом значение ED₅₀ (эффективной дозы, в которой наблюдается 50% антиагрегантного эффекта) данной субстанции составила 0,89 мг/кг (таблица 3.7).

При внутривенном введении тирофибана в дозе 1,5 мг/кг ингибирование агрегации тромбоцитов составило 87,4%. При уменьшении дозы до 1 и 0,5 мг/кг данный препарат сравнения блокировал процесс агрегации тромбоцитов на 56,4 и 24,3%, соответственно. Исходя из полученных данных, ED₅₀ для препарата сравнения тирофибана составила 0,9 мг/кг (таблица 3.7).

Таблица 3.7.

Антиагрегантная активность соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс при однократном внутривенном введении ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов	ED ₅₀ , мг/кг
1	Ф-168	2	85,2±3,6*	0,89
		1	57,2±2,27*	
		0,5	34,5±3,4*	
2	Тирофибан	2	87,4±3*	0,9
		1	56,26±1,2*	
		0,5	24,32±3,76*	

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

Примечание: n-число тестируемых животных.

Таким образом, соединение Ф-168 при однократном внутривенном введении крысам проявило выраженную антиагрегантную активность и по ED₅₀ было сравнимо с эффектом тирофибана.

На следующем этапе для соединения Ф-168 была изучена острая токсичность с определением величины УТИ (условного терапевтического индекса: отношение LD₅₀ к ED₅₀), как показателя лекарственной безопасности.

Исследование острой токсичности Ф-168 при внутривенном введении проведено на белых беспородных мышах с массой тела 21,9±0,02 г. Контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. В опытных группах мышей соединение Ф-168 вводили в виде раствора однократно.

Установлено, что при введении тестируемой субстанции в дозе 0,5 мг/кг и 1 мг/кг гибели мышей не отмечено у особей обоего пола. В увеличенных дозах токсическое действие нарастало пропорционально увеличению дозы тестируемого образца. Так, при введении в дозе 5,0 мг/кг отмечали гибель 20% мышей-самцов и самок в первые часы. При увеличении дозы вещества Ф-168 до 25,0 мг/кг отмечали гибель 40% мышей-самцов и 60% мышей-самок в первые сутки. В дозе 50,0 мг/кг отмечали гибель 60% мышей-самцов и самок в течение первого часа. При дальнейшем увеличении дозы до 100,0 мг/кг отмечали глубокие редкие судорожные вздохи и

гибель 60% мышей-самок и самцов в течение первого часа после внутривенного введения соединения Ф-168. В дозе 300,0 мг/кг отмечали дыхание в виде глубоких редких судорожных вздохов и гибель 80% мышей-самок и самцов в течение первого часа. Гибель 100% мышей-самок и самцов наступала после введения вещества Ф-168 в дозе 600,0 мг/кг.

Состояние выживших животных во всех опытных группах в последующие дни наблюдений соответствовало норме, изменений в поведении мышей не зарегистрировано. Не выявлены изменения в двигательной активности и нервно-мышечной возбудимости. Мыши активно передвигались в клетке, реагировали на внешние раздражители (звуковые и тактильные). Не установлено изменений ритма дыхания, цианоза кожных покровов, нарушений со стороны вегетативной иннервации, т.к. отсутствовали изменения саливации, шерстных покровов; консистенции и окраски фекальных масс, цвета мочи. Не выявлено нарушений в потреблении корма.

Таким образом, при изучении острого токсического воздействия соединения Ф-168 при внутривенном введении зона острого токсического действия (от пороговой дозы до смертельной) определена между 5,0 мг/кг и 600,0 мг/кг. На рисунках 2 и 3 представлена прямая зависимость количества погибших мышей-самцов и самок (в %) от величины дозы вещества Ф-168, выраженной в мг/кг, через 14 суток после внутривенного введения.

Величина острой токсичности субстанции соединения Ф-168 через 14 суток после внутривенного введения мышам-самцам и мышам-самкам соответствует следующим показателям:

мышь самцы:	мышь самки:
$LD_{16}=3,813 (5,457 \div 2,665)$	$LD_{16}=3,185 (5,242 \div 1,935)$
$LD_{50}=34,555 (49,450 \div 24,147)$	$LD_{50}=28,729 (47,284 \div 17,455)$
$LD_{84}=313,096 (448,048 \div 218,791)$	$LD_{84}=259,146 (426,515 \div 157,454)$

Таким образом, при изучении острой токсичности тестируемого образца Ф-168 на белых нелинейных мышах при внутривенном введении клиническая картина отравления характеризовалась токсическими явлениями со стороны ЦНС в первые минуты после введения субстанции: заторможенностью, снижением реакции на звуковые и тактильные раздражители, затрудненным, неритмичным дыханием. Токсический эффект нарастал пропорционально увеличению дозы соединения Ф-168. Так, при введении в токсических дозах отмечали патологическое дыхание в виде глубоких редких судорожных вздохов и гибель животных.

Мыши-самки оказались более чувствительными к введению Ф-168 в токсических дозах, но токсическое действие нарастало медленно.

Критерием лекарственной безопасности является показатель условного терапевтического индекса. На доклиническом этапе исследований этот показатель представляет собой отношение между LD₅₀ (летальная доза, в которой наблюдается 50% гибели) и ED₅₀ (эффективная доза, в которой наблюдается 50% эффекта).

$$\text{УТИ} = \text{LD}_{50} / \text{ED}_{50}$$

Чем выше значение полученного терапевтического индекса, тем более безопасным для применения является соединение. Данные по значению терапевтического индекса исследуемых соединений приведены в таблице 3.8. Согласно литературным данным LD₅₀ тирофибан при внутривенном способе введения мышам превышает 5 мг/кг.

Таблица 3.8.

Значения терапевтического индекса соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибан

№ п/п	Тестируемый образец	Путь введения	LD ₅₀	ED ₅₀	УТИ
1.	Ф-168	внутривенно	31,6	0,89	35,5
2.	Тирофибан	внутривенно	>>5	0,9	>>5,6

Таким образом, по значению условного терапевтического индекса соединение Ф-168 превосходит препарат сравнения тирофибан в 6,3 раза.

3.2.2. Действие на агрегацию тромбоцитов и острая токсичность производного N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола соединения RU-891

Проведенные эксперименты позволили установить наличие выраженного дозозависимого антиагрегантного действия у соединения RU-891 при однократном внутривенном введении крысам-самцам.

Однократное внутривенное введение соединения RU-891 в дозе 52,0 мг/кг приводило к снижению амплитуды агрегации тромбоцитов на 85,8 % (таблица 3.9). При уменьшении дозы в два раза до 26,0 мг/кг Δ% ингибирования составил 57,1%. В результате дальнейшего двукратного снижения дозы до 13 мг/кг способность вещества RU-891 блокировать процессы агрегации тромбоцитов уменьшалась до 34,9 %. ED₅₀ RU-891 составила 23 мг/кг (таблица 3.9).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота при однократном внутрижелудочном введении также дозозависимо ингибировала функциональную активность тромбоцитов крыс. В дозе 15,0 мг/кг, эквимолярной значению IC₅₀ ацетилсалициловой кислоты, полученной в опытах *in vitro*, уровень активности составил 29,7% (таблица 3.9). В последующих исследованиях доза ацетилсалициловой кислоты была увеличена до 30,0 и 60,0 мг/кг. В этих дозах препарат сравнения блокировал агрегацию тромбоцитов на 57,3 и 64,4% соответственно. При этом ED₅₀ ацетилсалициловой кислоты составила 34,4 мг/кг (таблица 3.9).

Таблица 3.9.

Антиагрегантная активность соединения RU-891 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс при однократном внутрижелудочном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED ₅₀ , мг/кг
1.	RU-891	52,0	85,8±2,3*	23,0
		26,0	57,1±3,2*	
		14,0	34,9±1,3*	
2.	Ацетилсалициловая кислота	15,0	29,7±8,1*	34,4
		30,0	57,3±4,0*	
		60,0	64,4±5,5*	

Примечание: *- различия статистически значимы по отношению к контролю, критерий one-way ANOVA (p<0,05)

Таким образом, соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении в опытах *in vivo* оказалось активным в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов крыс и по ED₅₀ превосходил препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,5 раза.

Следующим этапом исследования соединения RU-891 было изучение острой токсичности данного вещества с установлением значения УТИ.

В группе животных, получавших соединение RU-891 в дозе 250,0 мг/кг, в отличие от контроля, отмечали тенденцию снижения реакции на болевые и тактильные раздражители в течение 3-х часов после введения вещества у самцов и в течение 1 часа у самок. Через 5-6 часов состояние мышей восстанавливалось и в последующие дни наблюдения общее состояние и поведение мышей не отличалось от контрольной группы (таблица 3.10).

В группе животных, получавших RU-891 в дозе 500,0 мг/кг, состояние мышей характеризовалось настороженностью, пугливостью. Через 1 час после введения вещества отмечали снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, снижение спонтанной подвижности, седацию в течение 3-4 часов. Через 24 часа общее состояние мышей восстанавливалось и в последующие дни наблюдения поведение мышей нормализовалось и не отличалось от контрольной группы (таблица 3.10). Отдаленную гибель отмечали у одной мышисамки на 9 сутки после введения вещества.

В группе мышей-самцов, получавших RU-891 в дозе 1000,0 мг/кг, отмечали в течение 2-3 часов после введения вещества снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, спонтанной подвижности, седацию. Гибель 2-х самок отмечена через 1 час 20 минут и через 3 часа 40 минут после введения вещества. В последующие дни состояние выживших мышей не отличалось от контрольной группы, однако на 6 сутки была отмечена отдаленная гибель 1 самца (таблица 3.10).

При увеличении дозы RU-891 до 1500,0 мг/кг у самцов и самок отмечали снижение спонтанной подвижности, признаки седации и уменьшение реакции на болевые и тактильные раздражители в течение 2-4 часов после введения вещества. Отмечалась гибель 3 особей в опытных группах самцов и самок через 2,5-4,5 часа после введения RU-891. У выживших животных частота дыхания в течение суток была в норме. В последующие дни наблюдения общее состояние выживших мышей не отличалось от контрольной группы, отсроченной гибели не выявлено (таблица 3.10).

При введении RU-891 в дозе 3000,0 мг/кг у самцов и самок отмечали более длительное снижение спонтанной подвижности, признаки седации, уменьшение реакции на болевые и тактильные раздражители, увеличение частоты дыхания. Наблюдалась гибель 4 особей в опытных группах самцов и самок через 3-4,5 часа после введения вещества. В последующие дни наблюдения у выживших животных общее состояние не отличалось от контрольной группы, отсроченной гибели не выявлено (таблица 3.10).

При введении RU-891 в дозе 5000,0 мг/кг у самцов и самок отмечали аналогичные признаки интоксикации, состояние усугублялось, токсическое действие было более длительным. Отмечалась 100% гибель мышей в группах самцов и самок в период 1-5 часов после внутрижелудочного введения RU-891 (таблица 3.10).

Динамика гибели мышей при внутрижелудочном введении RU-891*

№ п/п	Испытуемые дозы препарата	Количество погибших особей (%) от общего количества мышей в группе			
		Самцы		Самки	
		1 сутки	14 суток	1 сутки	14 суток
1.	250 мг/кг	0	0	0	0
2.	500 мг/кг	0	0	0	16,6
3.	1000 мг/кг	0	16,6	33,3	33,3
4.	1500 мг/кг	50	50	50	50
5.	3000 мг/кг	66,6	66,6	66,6	66,6
6.	5000 мг/кг	100	100	100	100

*Примечание: группы контрольных животных в таблицу не внесены.

По результатам гибели мышей рассчитаны величины ЛД₅₀, ЛД₁₆, и ЛД₈₄ исследуемой RU-891 по методу Литчфилда и Уилкоксона [Миронов А.Н., 2012]. Величина острой токсичности RU-891 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения мышам с указанием доверительного интервала представлена в таблице 3.11.

Таблица 3.11.

Показатели острой токсичности RU-891 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения белым беспородным мышам (мг/кг)

Пол животных	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
Мыши самцы	818,45	1749,144	3738,15
	990,99÷675,95	2117,88÷1444,61	4526,19÷3087,31
Мыши самки	501,11	1407,71	3954,53
	627,56÷400,14	1762,94÷1124,06	4952,43÷3157,70

Согласно литературным данным LD₅₀ ацетилсалициловой кислоты при внутрижелудочном способе введения мышам составляет 250 мг/кг [Лисина С.В., 2007].

Значения терапевтического индекса исследуемых соединений

№ п/п	Тестируемый образец	Путь введения	LD ₅₀	ED ₅₀	УТИ
1.	RU-891	внутрижелудочно	1578,4	23,0	68,6
2.	Ацетилсалициловая кислота	внутрижелудочно	250,0	34,4	7,3

Таким образом, по значению терапевтического индекса соединение RU-891 превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 9,4 раза.

3.2.3. Антиагрегантная активность и острая токсичность производных 6H-1,3,4-тиадиазина соединения L-36

Соединение L-36 в дозе 2,4 мг/кг (доза, эквиволярная значению IC₅₀ антиагрегантной активности в исследованиях *in vitro*) при однократном внутрижелудочном способе введения крысам-самцам приводило к снижению уровня агрегации тромбоцитов животных на 29,3%. Увеличение дозы исследуемого соединения до 24,0 и 48,0 мг/кг привело к ингибированию функциональной активности тромбоцитов крыс на 47,5 и 65,9% соответственно. Значение ED₅₀ при этом для соединения L-36 составило 27,8 мг/кг (таблица 3.13).

Таблица 3.13.

Антиагрегантная активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED ₅₀ , мг/кг
1	L-36	2,4	29,3±4,1	27,8
		24,0	47,5±4,5*	
		48,0	65,9±4,7*	
2	Ацетилсалициловая кислота	15,0	29,7±8,1*	34,4
		30,0	57,3±4*	
		60,0	64,4±5,5*	

*данные достоверны по отношению к контролю (критерий one-way ANOVA, p≤0,01)

Таким образом, по значению ED₅₀ антиагрегантной активности образец L-36 превосходил ацетилсалициловую кислоту в 1,2 раза.

На втором этапе исследований *in vivo* была изучена острая токсичность соединения L-36 и установлен УТИ.

Рандомизацию животных в каждой группе проводили по массе тела. Оценка состояния и поведения особей мышей в контрольных группах (получавших воду очищенную) с опытными группами мышей показала отсутствие различий в общем состоянии животных и их поведении.

В группе мышей, получавших соединение L-36 в дозе 140,0 мг/кг, в отличие от контрольных животных, отмечали тенденцию снижения реакции на болевые и тактильные раздражители в течение 2 часов после введения вещества у самцов и в течение 4-х часов у самок. Через сутки состояние мышей восстанавливалось и в последующие дни наблюдения общее состояние и поведение мышей не отличалось от контрольной группы (таблица 3.14).

В опытных группах мышей, получавших L-36 в дозе 280,0 мг/кг, состояние мышей характеризовалось настороженностью, пугливостью, угнетением двигательной активности. Через 1 час после введения вещества отмечали снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, снижение спонтанной подвижности, седацию в течение 3-4 часов. Через 24 часа общее состояние 4 мышей-самцов и самок восстанавливалось и в последующие дни наблюдения поведение мышей нормализовалось и не отличалось от контрольной группы (таблица 3.14). Отдаленную гибель отмечали у одной мыши-самки и одного самца на 9 и 3 сутки после введения вещества, соответственно.

В группе мышей-самцов, получавших L-36 в дозе 560,0 мг/кг, отмечали в течение 2-3 часов после введения вещества снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, спонтанной подвижности, выраженную седацию. Гибель 2-х самок отмечена через 2 часа в первые сутки после введения раствора соединения и на 3 сутки. В группе самцов наблюдалась гибель одной особи через 45 минут после введения вещества. В последующие дни состояние выживших мышей не отличалось от контрольной группы, однако на 2 сутки была отмечена отдаленная гибель 2 самцов (таблица 3.14).

При увеличении дозы L-36 до 1120,0 мг/кг у самцов и самок отмечали снижение спонтанной подвижности, признаки седации и уменьшение реакции на болевые и тактильные раздражители в течение 1-2 часов после введения вещества. У самцов и самок отмечали аналогичные признаки интоксикации, состояние усугублялось, токсическое действие было более длительным. Отмечалась 100% гибель мышей в группах самцов и самок в период 3-6 часов после внутрижелудочного введения L-36 (таблица 3.14).

Таблица 3.14.

Динамика гибели мышей при внутрижелудочном введении L-36*

№ п/п	Исследуемые дозы препарата	Количество погибших особей (%) от общего количества мышей в группе			
		Самцы		Самки	
		1 сутки	14 суток	1 сутки	14 суток
1.	140 мг/кг	0	0	0	0
2.	280 мг/кг	0	20	0	20
3.	560 мг/кг	20	40	20	20
4.	1120 мг/кг	100	100	100	100

*Примечание: группы контрольных животных в таблицу не внесены.

По результатам гибели мышей рассчитаны величины ЛД₅₀, ЛД₁₆ и ЛД₈₄ исследуемой L-36 по методу Литчфилда и Уилкоксона [Миронов А.Н., 2012]. Величина острой токсичности L-36 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения мышам с указанием доверительного интервала представлена в таблице 3.15.

Таблица 3.15.

Показатели острой токсичности L-36 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения белым беспородным мышам (мг/кг)

Пол животных	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
Мыши самцы	275,8	469,6	799,7
	200,5÷379,5	352,0÷626,6	592,9÷1079,0
Мыши самки	355,2	580,4	948,4
	184,9÷682,4	413,2÷815,4	480,7÷1871,0

Условный терапевтический индекс для соединения L-36 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты представлен в таблице 3.16. По значению УТИ исследуемое соединение превосходит в 2,6 раза ацетилсалициловую кислоту.

Значения терапевтического индекса исследуемых соединений

№ п/п	Тестируемый образец	Путь введения	LD ₅₀	ED ₅₀	УТИ
1.	L-36	внутрижелудочно	525,0	27,8	19,0
2.	Ацетилсалициловая кислота	внутрижелудочно	250,0	34,4	7,3

3.2.4. Заключение

Таким образом, проведенные исследования наиболее активных соединений – Ф-168, RU-891 и L-36 – в условиях целостного организма, позволяют заключить, что данные вещества обладают выраженной антиагрегантной активностью, превосходящей таковую для препаратов сравнения. По данным по изучению острой токсичности установлено, что исследуемые соединения обладают большим диапазоном терапевтического индекса в сравнении с референсами.

3.3. Заключение

В результате проведенных скрининговых исследований *in vitro* было выявлено в ряду моноциклических гетероциклов 4 активных молекулы LOSAZ-33, RUI-19, RUI-20 и RUI-27. Однако уровень их активности по значению IC₅₀ значительно не превосходил таковой для препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. Так, соединение под шифром LOSAZ-33 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 1,15 раза. Образцы RUI-19, RUI-20 и RUI-27 – в 1,2; 1,13 и 1,1 раза, соответственно.

Исследования, проведенные среди конденсированных структур, имеющих в составе гетероатом азота и серы, позволили выявить соединения под шифрами RU-891, Ф-168 и L-36, проявляющие наиболее выраженную антиагрегантную активность. В опытах *in vitro* соединение Ф-168 по уровню антиагрегантной активности (показатель IC₅₀) превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 3 раза. Производное 6*H*-1,3,4-тиадиазина соединение L-36 по значению IC₅₀ превосходит препарат сравнения в 9,4 раза.

Кластеризация исследуемых химических рядов позволила выявить соединения с низким (<20%), средним (20-60%) и высоким (>60%) уровнем активности в каждом химическом классе.

Так, в ряду производных 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-диона, N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола и 6Н-1,3,4-тиадиазина было выявлено 14,3; 11,1 и 50,0% высоко активных соединений (таблица 3.17). Наиболее активные соединения по результатам скрининговых исследований относятся к этим химическим классам:

- Ф-168 - производное 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-диона;
- RU-891 - производное N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола;
- L-36 - производное 6Н-1,3,4-тиадиазина.

Таблица 3.17.

Кластеризация исследуемых химических рядов по уровню активности

№ п/п	Химический класс	% соединений с низким уровнем активности	% соединений со средним уровнем активности	% высокоактивных соединений
1.	1,3-имидазолы	58,3	41,7	-
2.	1,2,4,5-тетразины	87,5	12,5	-
3.	3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-дионы	85,7	-	14,3
4.	N9-имидазобензимидазолы	72,2	16,7	11,1
5.	1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидины	62,5	37,5	-
6.	1Н-бензимидазолы	60,4	39,6	-
7.	N9-2,3-дигидроимидазо-бензимидазолы	42,9	57,1	-
8.	3Н-тиазолы	33,3	66,7	-
9.	6Н-1,3,4-тиадиазины	33,3	16,7	50
10.	4Н-бензо[1,3]оксазины	33,3	66,7	-
11.	2,3-дигидробензофураны	100	-	-
12.	4Н-ксантены	100	-	-

Чтобы достаточно полно учесть суммарное влияние множества эндогенных факторов на процесс образования тромбоцитарных агрегатов в сосудистом русле и точнее оценить антиагрегантный эффект субстанции, были проведены опыты в условиях *in vivo* на плазме белых

беспородных крыс, с изучением биологического материала *ex vivo* при однократном введении исследуемых соединений и препаратов сравнения. Методом регрессионного анализа были рассчитаны значения ED₅₀ для наиболее активных исследуемых соединений. По данному показателю соединение Ф-168 было сравнимо с тирофибаном. Производное N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола RU-891 было в 1,5 раза активнее препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. Соединение L-36 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 1,2 раза.

Исследование острой токсичности наиболее активных соединений позволило заключить, что соединение Ф-168 при внутривенном способе введения относится к III классу токсичности химических веществ. Образцы RU-891 и L-36 при внутрижелудочном введении - к IV классу [Березовская И.В., 2003].

Критерием лекарственной безопасности является показатель условного терапевтического индекса. Чем выше значение полученного условного терапевтического индекса, тем более безопасным для применения является вещество.

Таким образом, по значению условного терапевтического индекса соединение Ф-168 превосходит препарат сравнения тирофибан в 4 раза. Исследуемые вещества под шифрами RU-891 и L-36 - в 9,4 и 2,6 раза, соответственно, превосходят значение УТИ для ацетилсалициловой кислоты.

ГЛАВА 4. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО КСАНТИНА СОЕДИНЕНИЯ Ф-168

Для эффективной профилактики тромбообразования во время и после оперативного вмешательства на предмет артериального стентирования, баллонной ангиопластики используют антиагрегантные средства, а также их комбинации (двойная и тройная антитромбоцитарная терапия). При этом терапия ацетилсалициловой кислотой нередко сопровождается развитием резистентности, гастродуоденальными поражениями, кровотечениями. Совместное применение ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела резко повышает риск развития клинически значимого кровотечения [Gong Y., 2015]. Антагонисты гликопротеиновых П₂/Уа-рецепторов тромбоцитов эффективны в снижении образования тромбоцит-зависимых тромбов. Однако применение этих препаратов сопряжено с потенциальным риском развития кровотечений и других токсических эффектов, поскольку терапевтическое окно для них очень узкое. Другим потенциальным недостатком терапии П₂/Уа антагонистами является их способность связываться как с активированным, так и с покоящимися рецепторами. Кроме того, по иммунологическим причинам применение абциксимаба связано с заметно повышенным риском развития тяжелой тромбоцитопении, требующей тщательного мониторинга количества тромбоцитов вскоре после введения абциксимаба и в ряде случаев переливания тромбоцитарной массы [Hashemzadeh M., 2008].

Наличие существенных недостатков в применении антитромбоцитарной терапии является основанием для поиска и создания новых, высокоэффективных средств, обладающих выраженными антиагрегантными свойствами и минимальным спектром побочных эффектов. Кроме того, в настоящий момент в клинической практике приходится прибегать к терапии импортными блокаторами П₂/Уа-рецепторов тромбоцитов, ввиду отсутствия отечественных лекарственных средств с подобным механизмом действия.

В данной главе представлены результаты исследования нового антиагрегантного средства, блокатора П₂/Уа-рецепторов тромбоцитов, производного ксантина соединения Ф-168.

4.1. Влияние соединения Ф-168 на стадии функциональной активности тромбоцитов

Процесс формирования тромба осуществляется в несколько стадий – адгезия, активация и агрегация тромбоцитов, а также параллельно происходит активация коагуляционного каскада.

Учитывая многостадийность процесса взаимодействия кровяных пластинок между собой, а также с высокомолекулярными белками адгезии представилось целесообразным изучить влияние соединения Ф-168 на различные этапы функциональной активности тромбоцитов.

4.1.1. Действие на процессы адгезии тромбоцитов

Важным этапом в процессе тромбообразования является стадия адгезии тромбоцитов. Адгезия тромбоцитов осуществляется к поврежденному эндотелию (травма, дисфункция эндотелия на фоне сахарного диабета, атеросклероза) посредством коллагена через гликопротеин VI. При повреждении сосудов тромбоциты устремляются в рану, где они инициируют образование первичной гемостатической пробки, катализируют образование фибрина и облегчают заживление раны [Норев М.В., 2020]. Их адгезия и последующее распределение в открытом внеклеточном матриксе играют ключевую роль в процессе заживления, который модулируется различными факторами внешней среды, такими как компоненты плазмы, секретируемые тромбоцитами факторы и их специфические мембранные рецепторы. В дополнение к молекулярному составу окружающей среды, ее физические свойства, такие как жесткость, рельеф и скорость сдвига, создаваемые потоком крови, также влияют на процесс адгезии и распределения тромбоцитов. Эти молекулярные взаимодействия тромбоцитов с микроокружением регулируются специфическими рецепторами адгезии, такими как интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (гликопротеин IIb/IIIa), который связывается с фибриногеном и участвует в образовании фибринового сгустка, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ и гликопротеин VI, которые опосредуют адгезию тромбоцитов к коллагену сосудистой стенки [Момот А.П., 2020; Норев М.В., 2020; Shevchuk O., 2021].

Оценку степени адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена проводили по значению импеданса. В контрольных образцах цельной крови величина сопротивления составила 19,0 Ом (рисунок 4.1).

Изучение влияния соединения Ф-168 на способность тромбоцитов к адгезии позволило выявить, что тестируемый образец дозозависимо ингибировал процессы адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена. В концентрации 100 мкМ соединение Ф-168 на 77,2% блокировало способность тромбоцитов к адгезии. Изучение образца Ф-168 в концентрациях 10 и 1 мкМ позволило заключить, что в указанных концентрациях исследуемое вещество ингибирует адгезию тромбоцитов на 57,0 и 14,0% соответственно. Учитывая наличие дозозависимого эффекта, была рассчитана величина IC_{50} для соединения Ф-168, которая составила 10,5 мкМ.

Препарат сравнения тирофибан также дозозависимо блокировал адгезию тромбоцитов. IC_{50} для него составила 7,4 мкМ

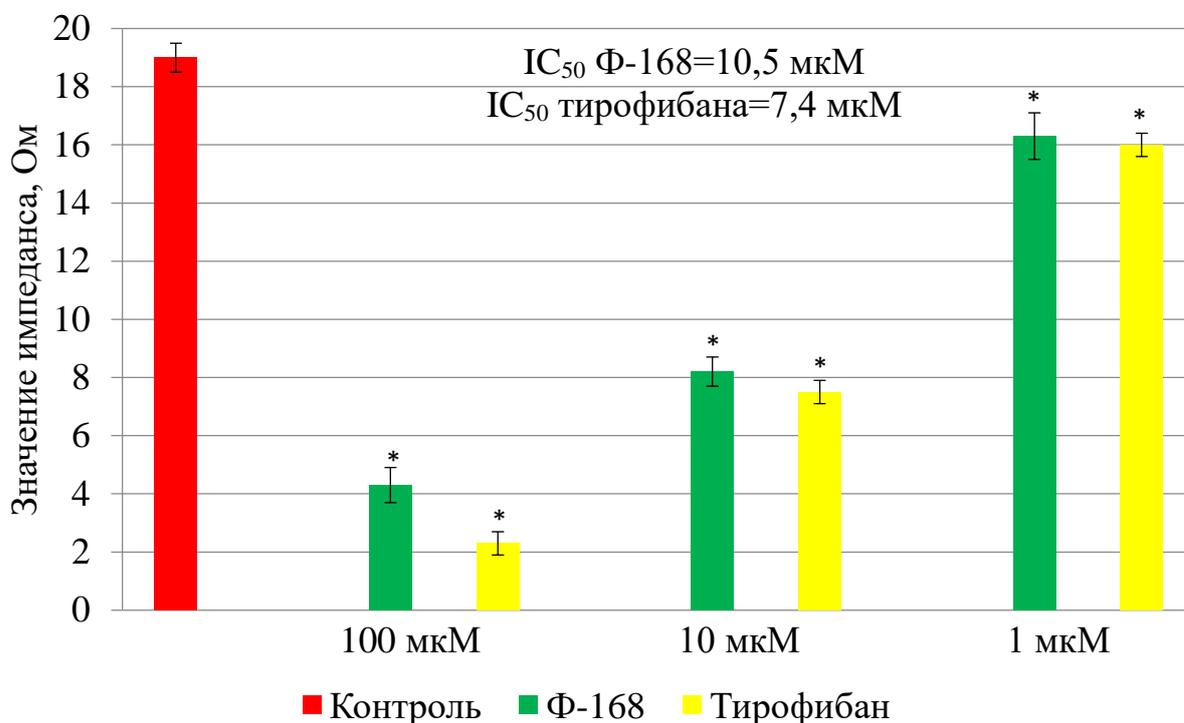


Рисунок 4.1. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на адгезию тромбоцитов к микрофибриллам коллагена

Примечание:

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

4.1.2. Влияние на активацию тромбоцитов

В результате проведенных исследований соединение Ф-168 в концентрации 1 мкМ ингибировало активацию $P2Y_1$ -рецепторов тромбоцитов в безкальциевой среде на 13,1% (таблица 4.1).

Ввиду отсутствия в клинической практике средств, селективно блокирующих $P2Y_1$ -рецепторы тромбоцитов, с целью валидации метода было использовано вещество MRS-2179, проявляющее свойства селективного антагониста по отношению к $P2Y_1$ -рецепторам тромбоцитов. В концентрации 1 мкМ данное вещество ингибировало активацию тромбоцитов на 80,3%.

Влияние соединения Ф-168 и вещества MRS-2179 на степень активации P2Y₁-рецепторов тромбоцитов *in vitro* (M±SEM)(n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Амплитуда активации тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования активации P2Y ₁ -рецепторов тромбоцитов
1.	Контроль	1,16±0,22	
2.	Ф-168	1,01±0,08	13,1±6,8
3.	MRS-2179	0,23±0,02*	80,3±0,2*

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

Примечание: n-число животных в группе

Таким образом, соединение Ф-168 оказывает низкую P2Y₁ – антагонистическую активность, уступая веществу сравнения MRS-2179 в 6,1 раза. По влиянию на P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов соединение Ф-168 превосходит препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза.

4.1.3. Ингибирование секреции АТФ из гранул хранения тромбоцитов

Активация тромбоцитов и образование тромбов включают различные сигнальные пути, ведущие к изменению формы тромбоцитов, активации интегрина и дегрануляции [Chatterjee M., 2020]. Одним из компонентов, секретируемых из плотных гранул тромбоцитов, является аденозин-трифосфат. На поверхности тромбоцитов среди пуриновых рецепторов экспрессируется АТФ-связывающий ионный канал P2X₁, который является мишенью для АТФ [Mitrugno A., 2018].

Измерение уровня секретируемой АТФ из плотных гранул тромбоцитов проводилось люминесцентным методом детекции с использованием агрегометра Chronolog-700. На данном приборе возможна одновременная запись кривых секреции АТФ и агрегации тромбоцитов. Таким образом, наряду с измерением уровня секреции АТФ проводили измерение значения импеданса под влиянием вещества Ф-168.

При стимуляции цельной крови раствором АДФ в конечной концентрации 5 мкМ было установлено, что значение импеданса для интактных образцов в среднем составило 21,5 Ом. При добавлении в тест-систему 100 мкМ тестируемого образца Ф-168 наблюдалось снижение

сопротивления цельной крови до 4,1 Ом (рисунок 4.2). Это подтверждает выраженное антиагрегантное действие исследуемого соединения.

Уровень секретируемой АТФ при стимуляции 5 мкМ АДФ в контрольных образцах в среднем составил 68,4 нМ. Соединение Ф-168 в концентрации 100 мкМ подавляло секрецию АТФ до 21,6 нМ (рисунок 4.2).

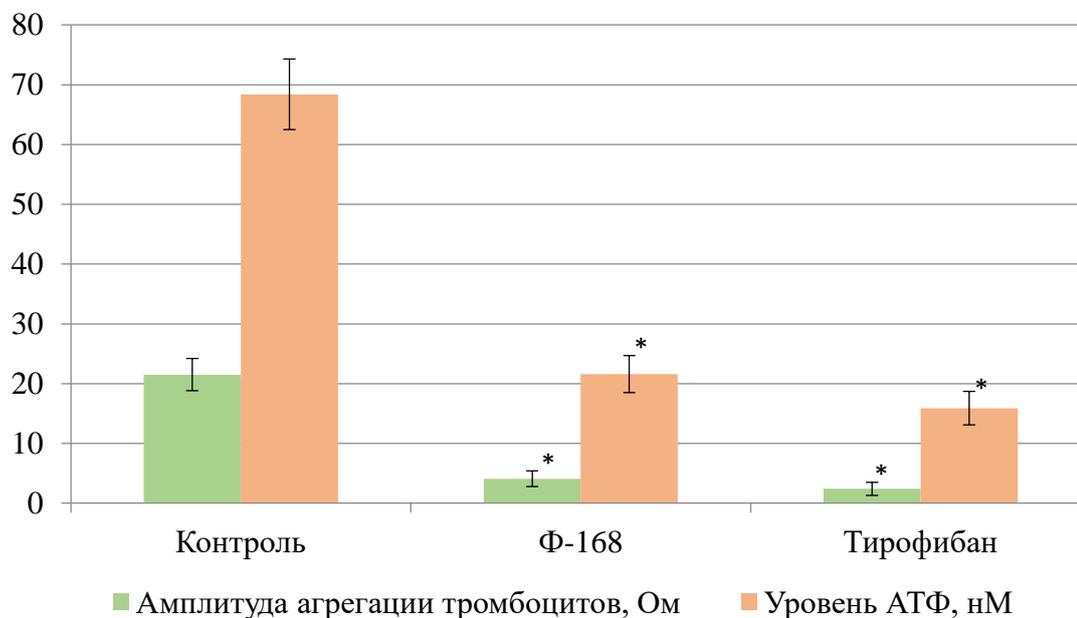


Рисунок 4.2. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на секрецию АТФ из гранул хранения тромбоцитов

Примечание:

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

В ходе проведенного исследования импедансным методом детекции было подтверждено наличие выраженных антиагрегантных свойств соединения Ф-168. Достоверных различий в уровне активности исследуемого вещества и препарата сравнения тирофибана установлено не было. Препарат сравнения тирофибан способствовал снижению уровня секретируемой АТФ до 15,9 нМ, что сопоставимо с тестируемой субстанцией Ф-168.

4.1.4. Влияние на тромбоксан-простациклиновую систему

Активированные тромбоциты генерируют важный липидный медиатор тромбоксан А₂, который служит для привлечения других тромбоцитов к месту тромбообразования и способствует укреплению сгустка. Генерация тромбоксана координируется пуриновыми

рецепторами и интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Тромбоксан генерируется из его предшественника арахидоновой кислоты через циклооксигеназные пути, которые действуют как медиатор положительной обратной связи для усиления начальных функциональных ответов тромбоцитов и укрепления стабильности сгустка [Manne В.К., 2018]. В настоящее время известна антиагрегационная роль простаглицлина сосудистой стенки, осуществляющего регуляцию функциональной активности тромбоцитов в балансе с тромбоксаном A_2 [Chirkov Y.Y., 2022].

При изучении влияния соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана при внутривенном введении на уровень тромбоксана B_2 в тромбоцитах крыс контрольные значения составили 8887,9 пкг/мл. Субстанция соединения Ф-168 снижала количество измеряемого показателя до 1672,1 пкг/мл, что в 5,3 раза ниже уровня контрольных значений (рисунок 4.3). Препарат сравнения тирофибан также уменьшал уровень тромбоксана B_2 в тромбоцитах крыс до 1222,4 пкг/мл, что в 7,3 раза ниже значений, полученных в контроле.

Контрольные значения при изучении влияния на уровень 6-кетопростаглицдина $\text{F1}\alpha$ (простаглицлина) у крыс, составили 21273,4 пкг/мл. При внутривенном введении соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана данный показатель статистически значимо не изменялся и составлял 22768,5 пкг/мл и 21409,8 пкг/мл, соответственно (рисунок 4.3).

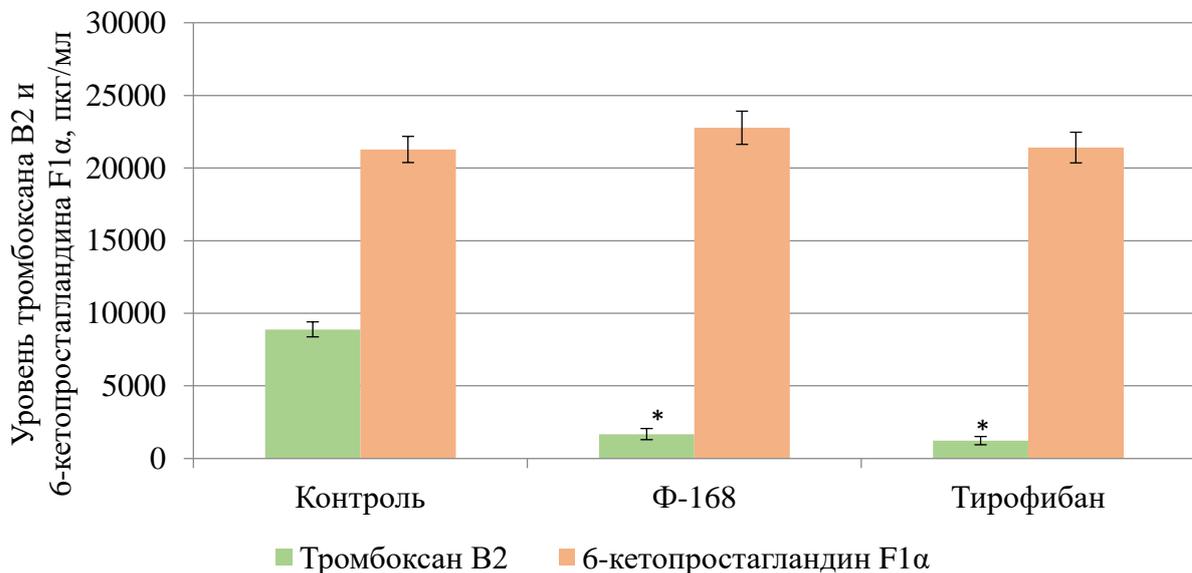


Рисунок 4.3. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на тромбоксан-простаглицлиновую систему

Примечание:

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

4.1.5. Снижение уровня кальция в тромбоцитах

При повреждении сосудов различные агонисты вызывают активацию и агрегацию тромбоцитов посредством повышения концентрации цитозольного Ca^{2+} [Walford T., 2016]. Увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} является решающим шагом в активации, изменении формы тромбоцитов и высвобождении гранул хранения. Некоторые рецепторы, такие как гликопротеин IIb/IIIa, комплекс Ib-IX-V, гликопротеин VI, P2Y_{12} и рецепторы, активируемые протеазой PAR, экспонируются и активируются на мембране тромбоцитов именно во время изменения формы, опосредованное резким повышением уровня кальция [Zhang H., 2020]. Повышение уровня Ca^{2+} активирует множество различных процессов, необходимых для образования тромбов, и, таким образом, внутриклеточный пул ионов Ca^{2+} , может рассматриваться как потенциальная мишень для антитромботических препаратов [Walford T., 2016]. Исходя из этого, представилось интересным изучить влияние нового производного ксантина соединения Ф-168 на уровень внутриклеточного кальция тромбоцитов.

Перед проведением исследований была изучена хелатирующая способность соединения Ф-168 по отношению к ионам кальция. В результате этого, было показано, что тестируемый образец в отличие от ЭГТА не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах (рисунок 4.4). Полученные результаты свидетельствует в пользу того, что соединения Ф-168 не является хелатором ионов кальция.

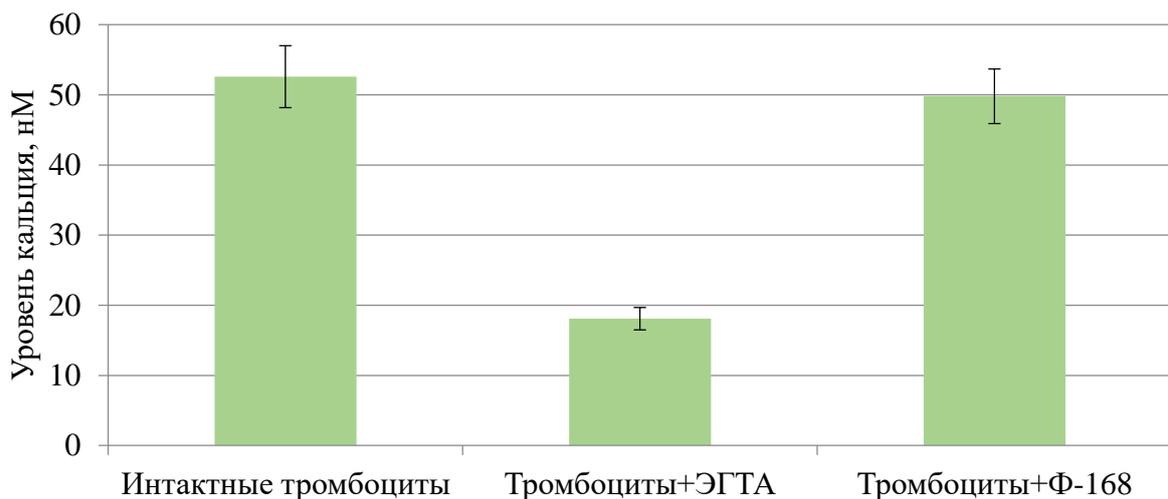


Рисунок 4.4. Влияние соединения Ф-168 и ЭГТА на связывание ионов кальция в интактных тромбоцитах.

Примечание:

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

На первом этапе исследований, индуцированный тромбином выход Ca^{2+} из клеточных депо в присутствии физиологических концентраций, сопровождался увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} с базального уровня 51,8 нМ до 359,1 нМ (рисунок 4.5). Данный показатель был принят за контроль.

Соединение Ф-168 дозозависимо ингибировало увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах, стимулированных тромбином. Так, в концентрации 100 мкМ тестируемая субстанция почти полностью блокировала выход внутриклеточного Ca^{2+} , количество которого в пробе составило 35,0 нМ, что соответствовало 90% ингибирования данного процесса. В концентрациях 10 и 1 мкМ образец Ф-168 блокировал индуцированное тромбином увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах на 67,7 и 41,8%, соответственно. IC_{50} для соединения Ф-168 составила 2 мкМ. Таким образом, тестируемая субстанция проявила высокую активность в отношении уменьшения прироста внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином.

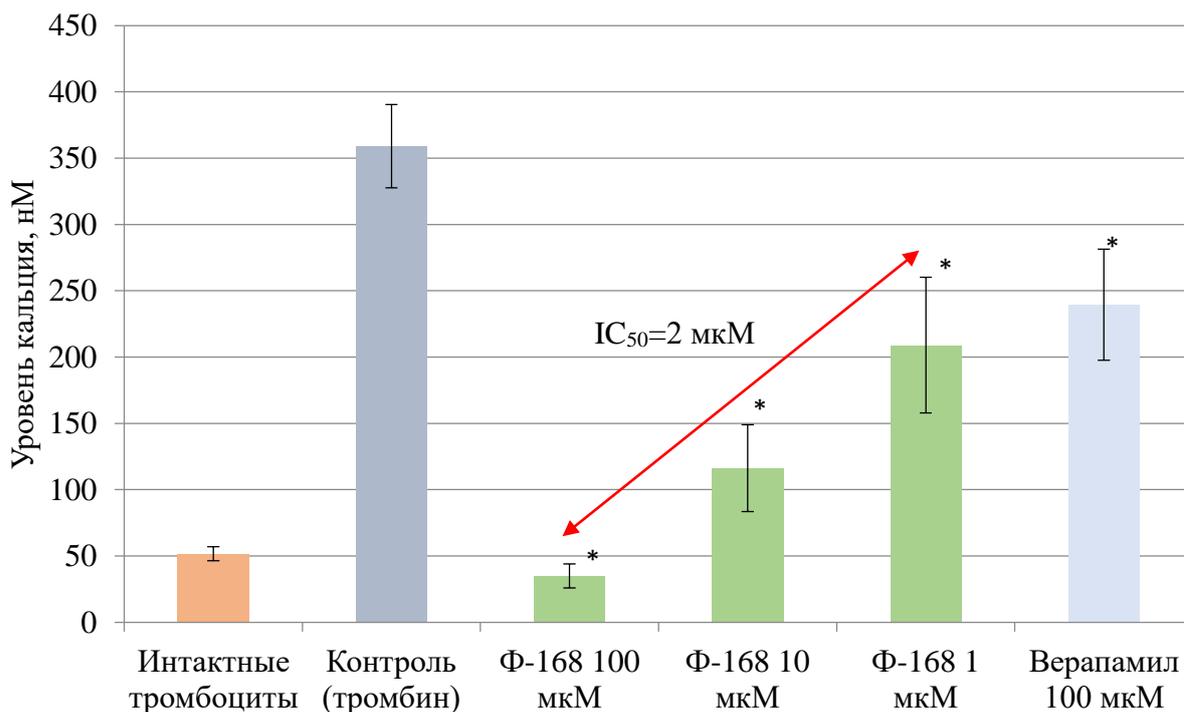


Рисунок 4.5. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения верапамила на уровень кальция в тромбоцитах, стимулированных тромбином в концентрации 0,5 ед./мл

Примечание:

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

Антагонист ионов кальция верапамила гидрохлорид в концентрации 100 мкМ в меньшей степени, чем соединение Ф-168, снижал уровень внутриклеточного кальция. Процент ингибирования при этом составил 33,3%.

На втором этапе исследования проводилось изучение влияния соединения Ф-168 на уровень внутриклеточного кальция в отсутствие внешнего Ca^{2+} . В данном случае индуцированный тромбином выход Ca^{2+} из клеточных депо в безкальциевой среде сопровождался увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} с базального уровня 50,1 нМ до 224,4 нМ (рисунок 4.6).

Соединение Ф-168 в концентрации 100 мкМ практически полностью блокировало прирост внутриклеточного Ca^{2+} по сравнению с контролем. Его количество в пробе составило 19,4 нМ (рисунок 4.6). Процент ингибирования уровня внутриклеточного Ca^{2+} при этом соответствовал 91,4%. При уменьшении концентрации Ф-168 до 10 и 1 мкМ данный показатель составил 68,5 и 36,3%, соответственно (рисунок 4.6). IC_{50} для соединения Ф-168 была равна 2,7 мкМ.

В результате проведенных исследований препарат сравнения верапамила гидрохлорид не оказывал действия на изучаемый показатель. Количество внутриклеточного Ca^{2+} в пробе с данным веществом соответствовало контрольным значениям (рисунок 4.6).

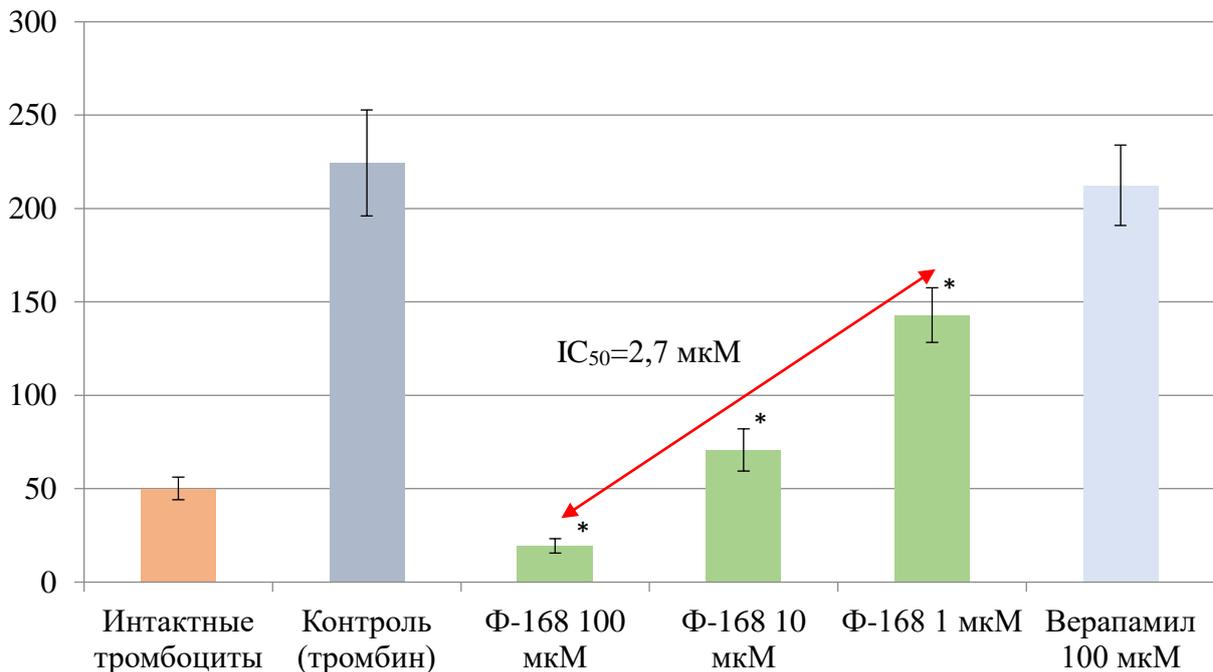


Рисунок 4.6. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения верапамила на уровень кальция в тромбоцитах, стимулированных тромбином в концентрации 0,5 ед./мл, в безкальциевой среде

Примечание:

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

4.1.6. Заключение

Таким образом, установлено, что соединение Ф-168 и референсный препарат тирофибан достоверно дозозависимо ингибировали процессы адгезии тромбоцитов к микрофибриллам коллагена. Уровень антиадгезивной активности для обоих образцов был сравним по значению IC_{50} .

Соединение Ф-168 способствовало выраженному снижению уровня секретируемой АТФ из гранул тромбоцитов. По данному действию исследуемое вещество статистически значимо не различалось с препаратом сравнения тирофибаном.

По влиянию на уровень тромбоксана B_2 соединение Ф-168 было сравнимо с референсным препаратом тирофибаном. Оба тестируемых образца достоверно выраженно снижали измеряемый показатель. На уровень 6-кетопростагландин $F1\alpha$ соединение Ф-168 и тирофибан влияния не оказывали.

Дозозависимое статистически значимое снижение внутриклеточной концентрации ионов кальция в тромбоцитах под влиянием соединения Ф-168 подтверждает наличие выраженного действия исследуемого соединения на процессы агрегации тромбоцитов.

4.2. Действие соединения Ф-168 на рецепторный ландшафт тромбоцитов

Известно, что при первичном гемостазе тромбоциты адгезируются к поврежденной стенке сосуда в месте повреждения. Этот процесс протекает через множество сигнальных каскадов и сильно зависит от активности семейства интегринов (гликопротеинов $Ib/IIIa$, $Ib-IX-V$, VI), экспрессируемых на поверхности тромбоцитов [Курепова М., 2018]. Также рецепторный ландшафт тромбоцитов представлен семейством G-белок-сопряженных пуриновых рецепторов $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ и $P2X_1$, участвующих в активации и агрегации тромбоцитов [Burnstock G., 2015]. Связывание АДФ с этими рецепторами приводит к активации и дегрануляции тромбоцитов и высвобождению множества факторов. В настоящее время в лечении пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями используется несколько ингибиторов $P2Y_{12}$ (тикагрелор, клопидогрел, тиклопидин) [Cho M.S., 2017]. Однако существует большое количество генетически-обусловленных изменений в аминокислотной последовательности этих рецепторов, что приводит к трудностям в эффективности терапии блокаторами пуриновых АДФ-рецепторов тромбоцитов [Курепова М., 2018]. В тромбоцитах человека компонент коагуляционного звена

гемостаза α -тромбин расщепляет N-концевой внеклеточный участок изоформ PAR1- и PAR4-рецепторов. Посредством последующей передачи сигналов через G-белки тромбин индуцирует широкий спектр реакций тромбоцитов, включая изменение цитоскелета, внутриклеточного пула ионов Ca^{2+} , активацию интегринов и секрецию гранул [Wu J., 2020].

Учитывая такое разнообразие рецепторов на поверхности тромбоцитов, важным является детализация механизма действия потенциального антиагрегантного средства.

4.2.1. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ

При действии АДФ происходит активация P2Y_1 и P2Y_{12} рецепторов тромбоцитов. Стимуляция рецептора P2Y_1 увеличивает внутриклеточное содержание ионов кальция за счет генерации IP_3 и активации протеинкиназы C, а также образования диацилглицерина после активации фосфолипазы C. Рецептор P2Y_{12} связан с G β -белком и его активация способствует ингибированию аденилатциклазы [Chaudhary P.K., 2019]. В клинической практике наиболее широкое распространение получили антагонисты P2Y_{12} рецепторов тромбоцитов [Kuszynski D.S., 2021].

Проведенные эксперименты позволили установить наличие высокой активности у соединения Ф-168 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. Контрольное значение уровня амплитуды агрегации тромбоцитов плазмы кроликов составило 18,5 отн. ед. (таблица 4.2).

В концентрации 100 мкМ соединение Ф-168 снижало амплитуду агрегации тромбоцитов до 6,2 отн. ед., на 66,5% достоверно ниже уровня контроля. При дальнейшем снижении концентрации исследуемого образца до 10 и 1 мкМ величина показателя агрегации тромбоцитов составила 11,4 и 16,2 отн. ед., что на 38,4 и 12,4% соответственно.

Таким образом, добавление в тест-систему соединения Ф-168 приводило к достоверному дозозависимому снижению функциональной активности тромбоцитов в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ. Значение IC_{50} для образца Ф-168 при этом составило 27 мкМ. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также проявил дозозависимую антиагрегантную активность в диапазоне изученных концентраций и величина IC_{50} для референса составила - 81 мкМ.

Таблица 4.2.

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ *in vitro* ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Амплитуда агрегации тромбоцитов (отн. ед.)			
		Контроль	Исследуемая концентрация, мкМ		
			100	10	1
1.	Ф-168	18,5±1,5	6,2±0,4**	11,4±0,2**	16,8±0,3
2.	Ацетилсалициловая кислота	18,5±1,5	8,0±0,5**	14,7±0,2*	16,4±0,2

Примечание:

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

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

n-число тестируемых животных

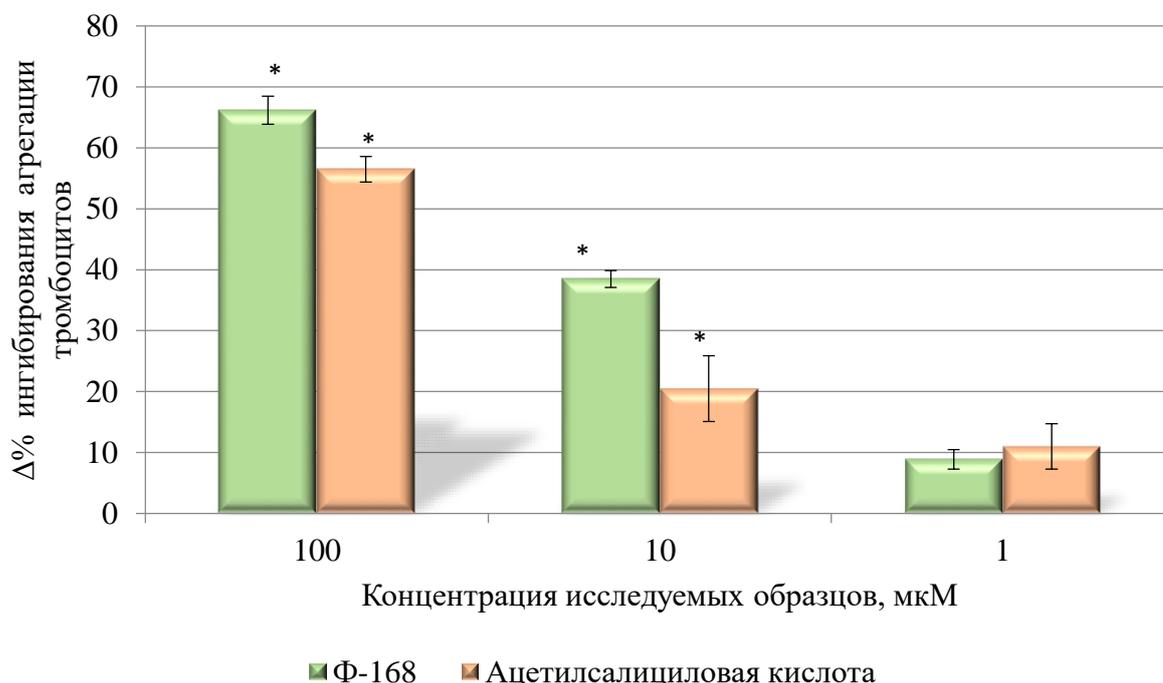


Рисунок 4.7. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ *in vitro*.

Примечание:

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

Таким образом, по показателю IC_{50} соединение Ф-168 превосходит активность ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в 3 раза.

4.2.2. Ингибирование функциональной активности тромбоцитов на модели адреналин-индуцированной агрегации

Проведенные исследования позволили установить дозозависимое блокирующее влияние соединения Ф-168 на функциональную активность тромбоцитов, индуцированную адреналином. Уровень амплитуды агрегации интактных тромбоцитов под действием индуктора адреналина, в концентрации 5 мкМ составил 44,7 отн. ед. Вещество Ф-168 в концентрации 1000 мкМ снижало агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором на 94,1% относительно контрольных значений. Далее в более низких концентрациях 500, 200 и 100 мкМ тестируемая субстанция оказывала защитное действие в отношении функциональной активности тромбоцитов на 81,0, 52,4 и 27,1%, соответственно (рисунок 4.8). IC_{50} для Ф-168 при этом составила 190 мкМ.

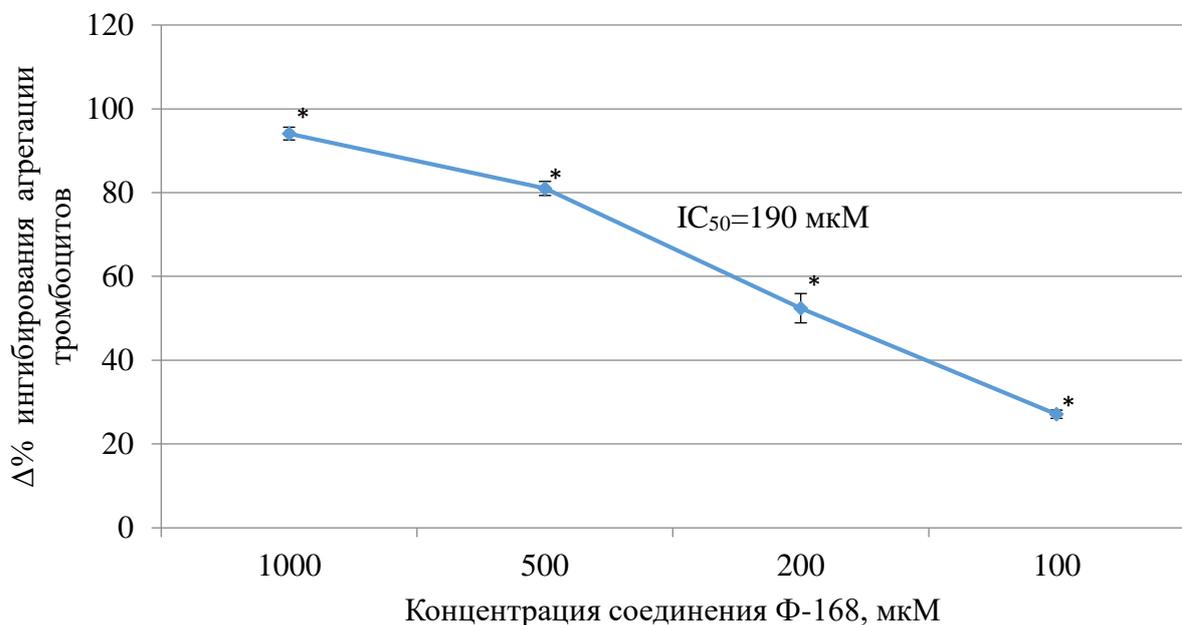


Рисунок 4.8. Влияние соединения Ф-168 на функциональную активность тромбоцитов на модели адреналин-индуцированной агрегации *in vitro*

Примечание:

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

4.2.3. Действие на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой

Влияние соединения Ф-168 на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, изучали в сравнении с ингибитором циклооксигеназы ацетилсалициловой кислотой. В концентрациях 1000, 500 и 200 мкМ образец под шифром Ф-168 ингибировал агрегацию тромбоцитов на 98,2, 44,8 и 32% соответственно (рисунок 4.9). IC_{50} Ф-168 при этом составила 460 мкМ.

Ацетилсалициловая кислота дозозависимо ингибировала агрегацию, индуцированную арахидоновой кислотой, блокируя данный процесс в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ на 94,6, 25,1 и 13,4%, соответственно (рисунок 4.9). При этом IC_{50} препарата сравнения составила 17 мкМ. Следовательно, по IC_{50} антиагрегантной активности ацетилсалициловая кислота превосходит Ф-168. Такое влияние референсного препарата объясняется его механизмом действия, связанным с ингибированием превращения арахидоновой кислоты на уровне циклооксигеназы-1 тромбоцитов.

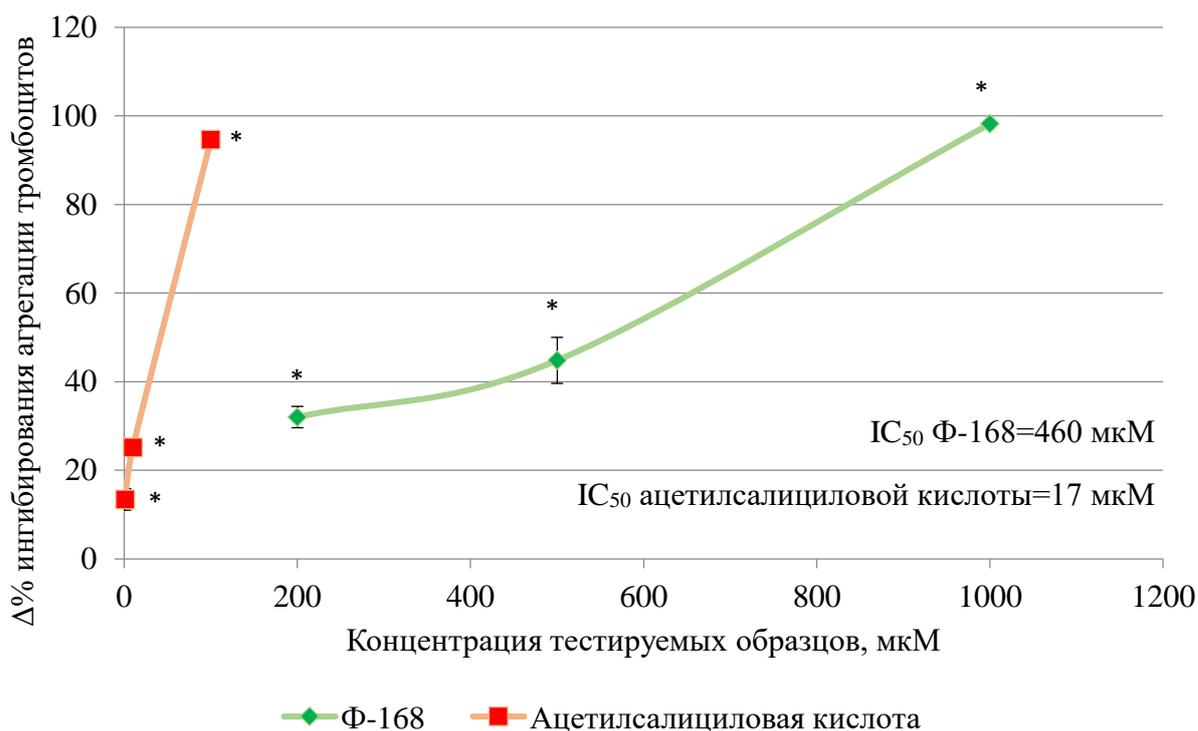


Рисунок 4.9. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой.

Примечание:

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

n-число тестируемых животных

4.2.4. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную коллагеном

По влиянию на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов соединение Ф-168 было изучено в сравнении с тирофибаном. В концентрациях 500, 200 и 100 мкМ соединение Ф-168 блокировало агрегацию тромбоцитов на 87,0, 49,4 и 18,8%, соответственно. IC₅₀ тестируемой субстанции при этом составила 190 мкМ. В контрольных образцах плазмы крови при исследовании препарата сравнения тирофибана амплитуда агрегации тромбоцитов составила 34,5 отн. ед. Данный препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию, индуцированную коллагеном, но в более низких концентрациях. При этом IC₅₀ тирофибана составила 7,9 мкМ. Таким образом, по показателю IC₅₀ препарат сравнения тирофибан превосходит соединение Ф-168 в 24 раза.

Таблица 4.3.

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

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

Примечание:

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

n-число тестируемых животных

4.2.5. Действие на повышение агрегации тромбоцитов, индуцированное агонистом тромбоксановых рецепторов

В контрольных образцах суспензии тромбоцитов крови при исследовании антиагрегантной активности соединения Ф-168 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов U46619, амплитуда составила 42,2 отн. ед. (рисунок 4.10). В исследованных концентрациях 1000, 100 и 10 мкМ соединение Ф-168

ингибировало агрегацию тромбоцитов на 66,3, 24,3 % и 21,6% соответственно. IC_{50} Ф-168 при этом составила 650 мкМ.

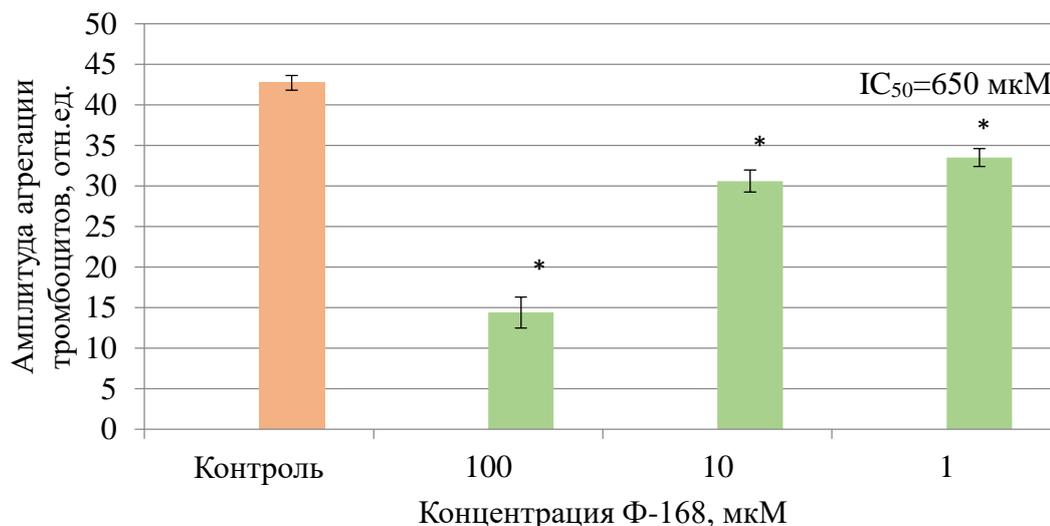


Рисунок 4.10. Влияние соединения Ф-168 на агрегацию суспензии тромбоцитов кроликов, индуцированную агонистом тромбоксановых рецепторов U46619.

Примечание:

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

Амплитуда агрегации тромбоцитов в контрольных образцах суспензии тромбоцитов при изучении антиагрегантной активности препарата сравнения тирофибана составила 39,5 (рисунок 4.11). В изученных концентрациях это средство статистически значимо блокировало агрегацию тромбоцитов, вызванную агонистом тромбоксановых рецепторов. При этом IC_{50} тирофибана составила 0,4 мкМ.

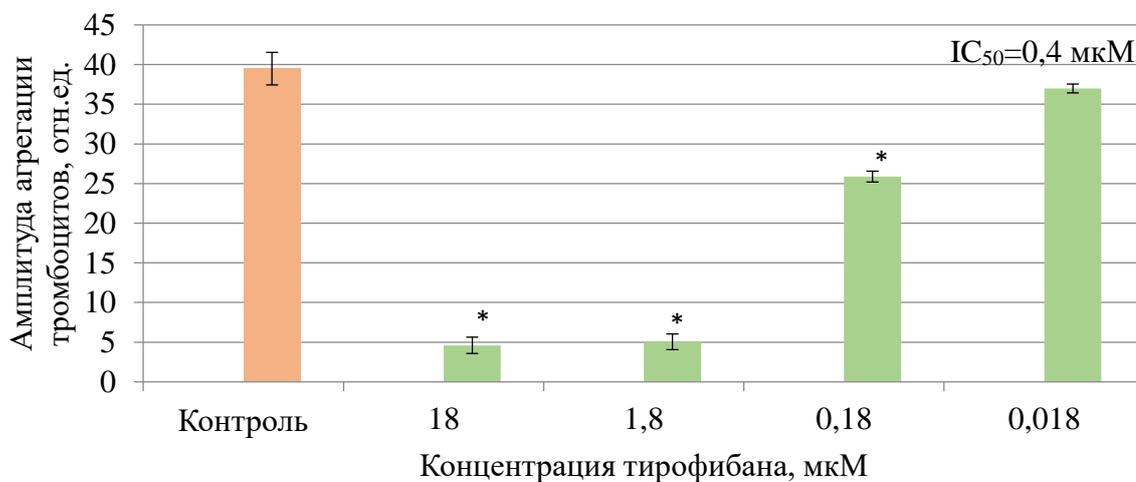


Рисунок 4.11. Влияние тирофибана на агрегацию суспензии тромбоцитов кроликов, индуцированную агонистом тромбоксановых рецепторов U46619.

Примечание:

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

При изучении влияния на агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 установлено, что препарат сравнения тирофибан выражено превосходит по активности соединение Ф-168.

4.2.6. Действие на процессы агрегации тромбоцитов, индуцированные селективным агонистом PAR-1 рецепторов

Исследование проводилось с использованием крови здоровых добровольцев доноров. В контрольных образцах плазмы крови здоровых доноров амплитуда агрегации тромбоцитов составила 26,3 отн. ед. (рисунок 4.12). В концентрациях 100, 10 и 1 мкМ соединение Ф-168 блокировало агрегацию тромбоцитов на 92,2, 69,9 и 48,2%, соответственно. IC₅₀ при этом для Ф-168 составила 0,12 мкМ.

В контрольных образцах плазмы крови здоровых доноров при исследовании препарата сравнения тирофибана амплитуда агрегации тромбоцитов составила 27, отн. ед. (рисунок 4.13). Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию, индуцированную агонистом PAR₁ рецепторов тромбоцитов в концентрациях 18, 1,8 и 0,18 мкМ на 90,8, 71,3 и 38,5%, соответственно. При этом IC₅₀ тирофибана составила 0,4 мкМ.

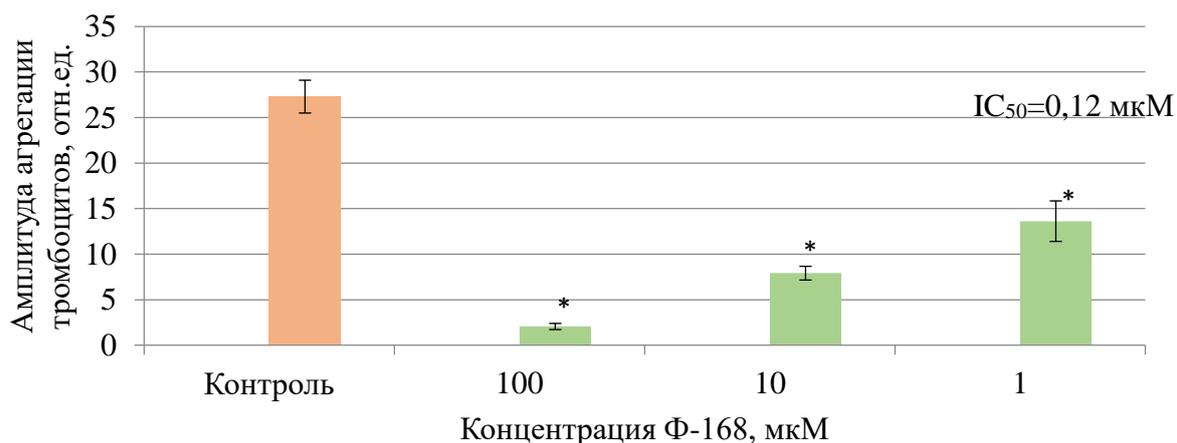


Рисунок 4.12. Влияние соединения Ф-168 на агрегацию тромбоцитов плазмы доноров, индуцированную селективным агонистом PAR₁ рецепторов тромбоцитов.

Примечание:

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

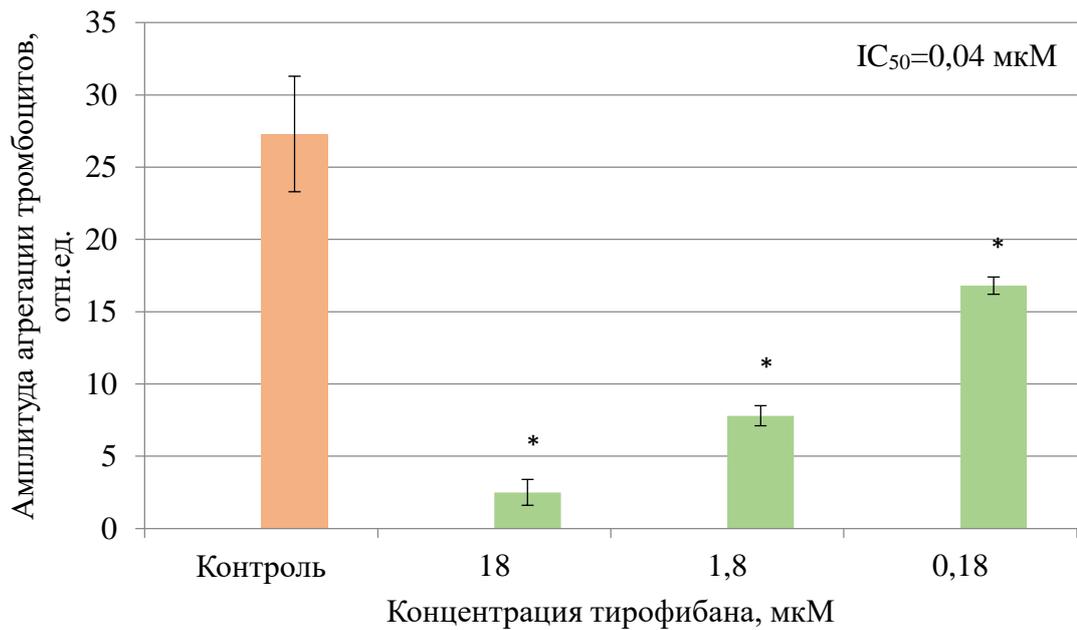


Рисунок 4.13. Влияние препарата сравнения тирофибана на агрегацию тромбоцитов плазмы доноров, индуцированную селективным агонистом PAR₁ рецепторов тромбоцитов

Примечание:

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

Таким образом, соединение Ф-168 и тирофибан проявили высокую активность в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов, опосредованной активацией рецепторов тромбина - PAR₁.

4.2.7. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную селективным агонистом гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов

TRAP (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe) является синтетическим гексапептидом, который, в отличие от тромбина активирует тромбиновые рецепторы независимо от их расщепления. По влиянию на TRAP – индуцированную агрегацию тромбоцитов здоровых доноров соединение Ф-168 было изучено в сравнении с тирофибаном. В контрольных образцах плазмы крови амплитуда агрегации тромбоцитов составила 56,2 отн. ед. (рисунок 4.14). В концентрациях 100, 10 и 1 мкМ соединение Ф-168 блокировало агрегацию тромбоцитов на 92,6, 79,0 и 13,7%, соответственно. IC₅₀ для образца Ф-168 при этом составила 5

мкМ. В контрольных образцах плазмы крови доноров при исследовании препарата сравнения тирофибана амплитуда агрегации тромбоцитов составила 55,4 отн. ед.

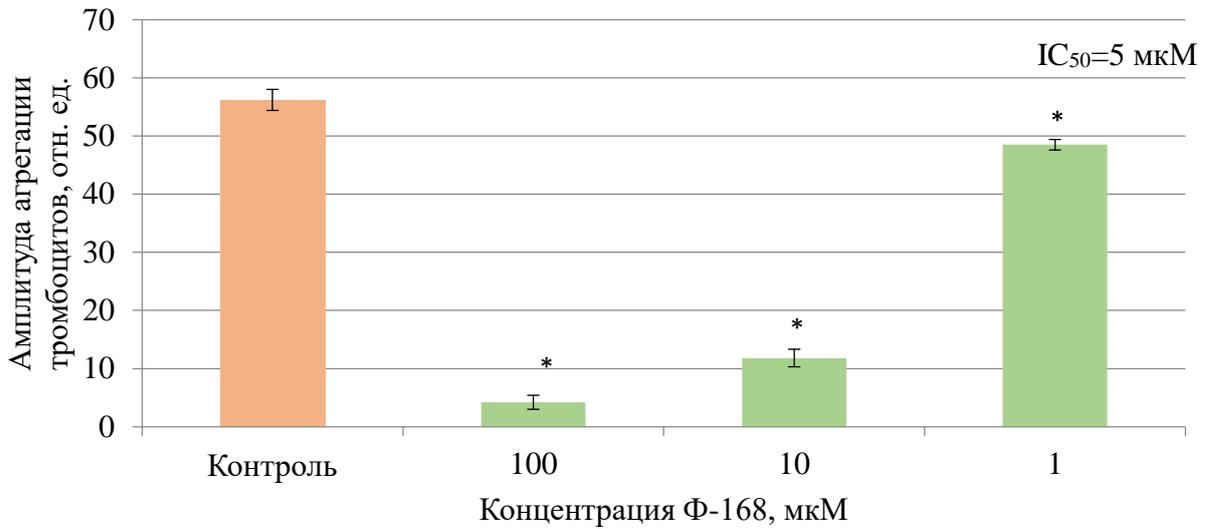


Рисунок 4.14. Влияние соединения Ф-168 на агрегацию суспензии тромбоцитов доноров, индуцированную TRAP.

Примечание:

*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)
n-число тестируемых животных

Препарат сравнения также дозозависимо ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную TRAP в концентрациях – 18,0, 1,8, 0,18 и 0,018 мкМ на 97,7; 93,2; 91,1 и 36,7%, соответственно. При этом IC₅₀ тирофибана составила 0,032 мкМ.

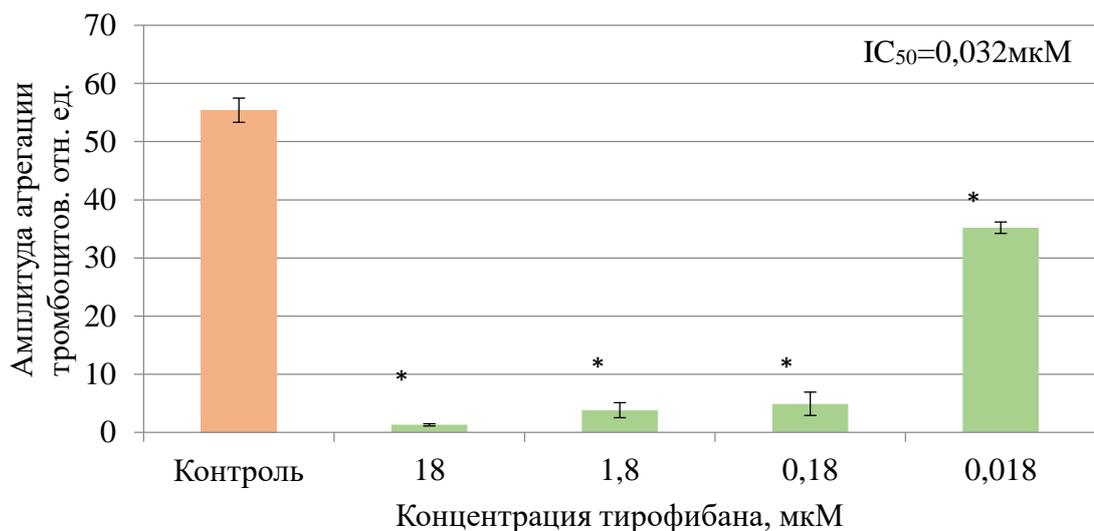


Рисунок 4.15. Влияние тирофибана на агрегацию суспензии тромбоцитов доноров, индуцированную TRAP.

Примечание:

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

n-число тестируемых животных

Таким образом, по показателю IC_{50} соединение Ф-168 и препарат сравнения тирофибан продемонстрировали высокую антиагрегантную активность. Однако тестируемая субстанция уступала препарату сравнения по влиянию на агрегацию тромбоцитов, индуцированную TRAP.

4.2.8. $P2Y_{12}$ -антагонистическая активность рецепторы тромбоцитов

Соединение Ф-168 и препарат сравнения тирофибан при внутривенном введении крысам проявили различную ингибирующую активность в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ в концентрации 200 нМ, приводящей к активации $P2Y_{12}$ -рецепторов тромбоцитов. При этом субстанция Ф-168 блокировала функциональную активность тромбоцитов на 57,4%, а препарат сравнения тирофибан ингибировал этот процесс на 33,1% (таблица 4.4).

Таблица 4.4.

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на степень активации $P2Y_{12}$ -рецепторов тромбоцитов при внутривенном введении ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Амплитуда агрегации тромбоцитов, отн. ед.	$\Delta\%$ ингибирования активации $P2Y_{12}$ -рецепторов тромбоцитов
1.	Контроль		10,51 \pm 0,46	
2.	Ф-168	0,89	4,89 \pm 0,56*	57,4 \pm 4,9*
3.	Тирофибан	0,9	7,69 \pm 0,44*	33,1 \pm 3,9*

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

Примечание: n-число животных в группе

4.2.9. Заключение

В результате проведенных экспериментальных исследований по изучению механизма антиагрегантного действия соединения Ф-168 было установлено, что антитромбоцитарный эффект исследуемое вещество реализует через блокирование Пб/Ша рецепторов тромбоцитов, о чем свидетельствует подавление агрегации тромбоцитов, индуцированной лигандом TRAP. Вместе с тем, было зафиксировано, что исследуемое соединение оказывает выраженное влияние на пуриновые P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов, превосходя по уровню активности препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза.

4.3. Антитромбогенные свойства соединения Ф-168

Артериальные тромбозы формируются при высоких скоростях сдвига и состоят преимущественно из скоплений тромбоцитов. Для коррекции повышенного тромбообразования в артериальной системе применяются именно антиагрегантные средства. Поэтому изучение специфической антитромботической активности потенциальных антиагрегантных средств является неотъемлемой частью доклинических исследований. Основной целью экспериментов, проведенных в данном разделе, явилось изучение антитромботической активности соединения Ф-168 на различных моделях артериального и венозного тромбозов.

4.3.1. Антитромботическая активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III)

Поверхностная аппликация 50%-ного раствора хлорида железа (III) на сонную артерию приводит к развитию локальной реакции окислительного стресса (последовательные реакции Хабера-Вейса и Фентона). Данный процесс сопровождается образованием активных форм кислорода и крайне активного гидроксильного радикала, который в свою очередь провоцирует перекисное окисление липидов. Все это приводит к необратимому повреждению липидов клеточной мембраны, дисфункции эндотелия сосудов и, как следствие, тромбообразованию [Бокерия Л.А., 2021; Скугорева С.Г., 2016; Слепухина А.А., 2019; Man A.W.C., 2020]. Так, в ходе проведенного исследования было установлено, что среднее время полной окклюзии в

контрольной группе животных составило 19,4 мин. Данные по изучению антитромботической активности представлены в таблице 4.5. Дозозависимое изучение антитромботической активности соединения Ф-168 при однократном внутривенном введении позволило рассчитать показатель ED₅₀ (эффективная доза, в которой наблюдается 50% антитромботического эффекта), который составил 1,33 мг/кг. По данному значению препарат сравнения тирофибан превосходил по активности соединение Ф-168 в 1,4 раза.

Таблица 4.5.

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

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

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

На следующем этапе была изучена антитромботическая активность инъекционной лекарственной формы Ф-168 в дозе ED₅₀, полученной на данной модели артериального тромбоза. При однократном внутривенном введении ГЛФ Ф-168 в дозе 1,33 мг/кг наблюдалось 47,4% эффекта, что согласуется с определением значения ED₅₀ и указывает на аналогичную эффективность ГЛФ Ф-168 в сравнении с чистой субстанцией (таблица 4.6).

Таблица 4.6.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время полной окклюзии	Δ % увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		19,6 \pm 0,3	
2.	ГЛФ Ф-168	1,33	28,9 \pm 0,5*	47,4 \pm 2,5*
3.	Тирофибан	0,93	28,7 \pm 0,9*	46,3 \pm 4,9*

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

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что субстанция соединения Ф-168 обладает выраженной антитромботической активностью, сопоставимой с референсным препаратом тирофибаном. Готовая инъекционная лекарственная форма исследуемого соединения при однократном внутривенном введении в дозе ED₅₀ оказывает эквивалентный для чистой субстанции антитромботический эффект.

4.3.2. Антитромботическая активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного электрическим током

В данной экспериментальной модели артериального тромбоза применение электрического тока к адвентициальной поверхности сонной артерии приводит к образованию стабильного окклюзионного тромба [Спасов А.А., 2021; Berry C.N., 1998]. Данные, отражающие антитромботическую активность соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана представлены в таблице 4.7. Контрольное значение времени полной окклюзии сонной артерии крыс составило 15,2 мин. Однократное внутривенное введение раствора соединения Ф-168 приводило к дозозависимому пролонгированию изучаемого показателя, что позволило рассчитать значение ED₅₀ для исследуемого образца, которое составило 0,26 мг/кг. Препарат сравнения тирофибан также проявил дозозисимую активность и его показатель ED₅₀ составил 0,3 мг/кг.

Таблица 4.7.

Антитромботическая активность субстанции соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутривенном введении ($M \pm m$) ($n=6$)

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

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

Таким образом, показано, что субстанция соединения Ф-168 обладает выраженными антитромбогенными свойствами, сопоставимыми с активностью референсного препарата по значению ED₅₀.

На втором этапе исследования была изучена инъекционная лекарственная форма. Внутривенное введение лекарственной формы в дозе 0,26 мг/кг приводило к достоверному увеличению времени окклюзии на 50,3%, что позволяет судить о высокой эффективности ГЛФ Ф-168, сопоставимой с таковой для чистой субстанции (таблица 4.8).

Таблица 4.8.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время полной окклюзии	$\Delta\%$ увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		15,3±0,3	

2.	ГЛФ Ф-168	0,26	23,0±0,9*	50,3±5,6*
3.	Тирофибан	0,3	22,7±0,5*	48,1±3,2*

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

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

4.3.3. Влияние на выживаемость мышей в условиях генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза

В результате проведенных экспериментов в группе контроля наблюдалась гибель 100% мышей, что соответствует результатам, полученным ранее другими исследователями [Marjoram R.J., 2014; Chen H., 2019; Craver B.M., 2020]. При этом были отмечены характерные признаки острой дыхательной недостаточности: наблюдалось увеличение частоты и поверхностный характер дыхания, выраженный экзофтальм и изменение цвета радужной оболочки. Визуально наблюдались судороги, животные принимали характерную позу, при которой задние лапы были выпрямлены и отведены назад. В течение 1-2 минут после введения тромботических агентов животные погибали.

Данные по изучению влияния исследуемых веществ на выживаемость мышей представлены на рисунке 4.16. Однократное внутривенное введение раствора соединения Ф-168 на данной модели предотвращало гибель 80% животных по сравнению с гибелью в контрольной группе. По антитромботической активности данное вещество превосходило препарат сравнения тирофибан в 1,14 раза.

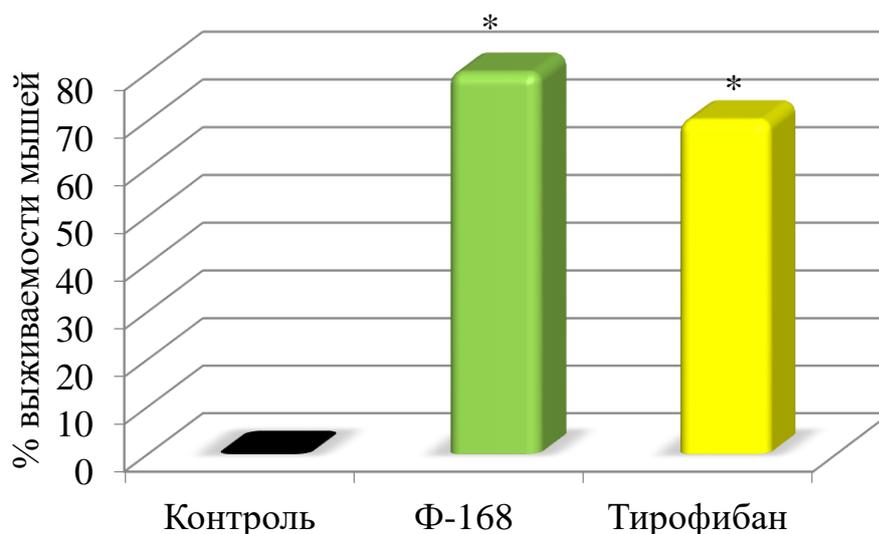


Рисунок 4.16. Влияние соединения Φ-168 и тирофибана на выживаемость белых беспородных мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза

Примечание:

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

Проведенные гистологические исследования органов, а именно печени, сердца, почек и головного мозга животных, которым внутривенно вводились тромботические агенты, показали, что микрососуды данных органов не были повреждены тромбами, что соответствует литературным данным [Ma N., 2015; Chen H., 2019; Craver V.M., 2020]. Однако при макроскопическом обследовании ткани легких выявлены кровоизлияния очагового и сливного характера. В препаратах легких контрольных животных, при электронно-микроскопическом исследовании преобладали альвеолы средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, адгезированные к сосудистой стенке и находящиеся в просвете сосуда (рисунок 4.17-А). Определялось значительное расширение затромбированных капилляров и межальвеолярных перегородок, а также очаговые повреждения сосудистой стенки капилляров и респираторного эпителия. В венах и венулах обнаруживались красные тромбы, а в отдельных артериолах - смешанные. При проведении морфометрического исследования срезов легких контрольных животных выявлено, что средняя площадь тромба на срезах составила $9438,56 \text{ мкм}^2$ (таблица 4.9).

У животных, получавших внутривенно однократно соединение Φ-168, было выявлено полнокровие капилляров и утолщение межальвеолярных перегородок. Также наблюдался диапедез эритроцитов в межальвеолярные перегородки. В венах и венулах определялись красные тромбы (рисунок 4.17-Б). При проведении морфометрического исследования срезов легких

животных, получавших соединение Ф-168, выявлено, что средняя площадь тромбов на срезах составила 3492,52 мкм², что статистически значимо ниже 63,0% по сравнению с группой контроля (таблица 4.9).

В легких животных, получавших внутривенно тирофибан, преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Обнаружены небольшие единичные тромбы в сосудах венозного типа. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия, выявлены участки умеренно выраженных кровоизлияний, явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки и просветы альвеол (рисунок 4.17-В). При этом средняя площадь тромба на срезах составила 3569,79 мкм² (таблица 4.9).

Таблица 4.9

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

№ п/п	Тестируемый образец	Средняя площадь тромбов на срезе, мкм ²
1.	Контроль	9438,56±1367,32
2.	Ф-168	3492,52±924,17*
3.	Тирофибан	3569,79±1061,64*

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

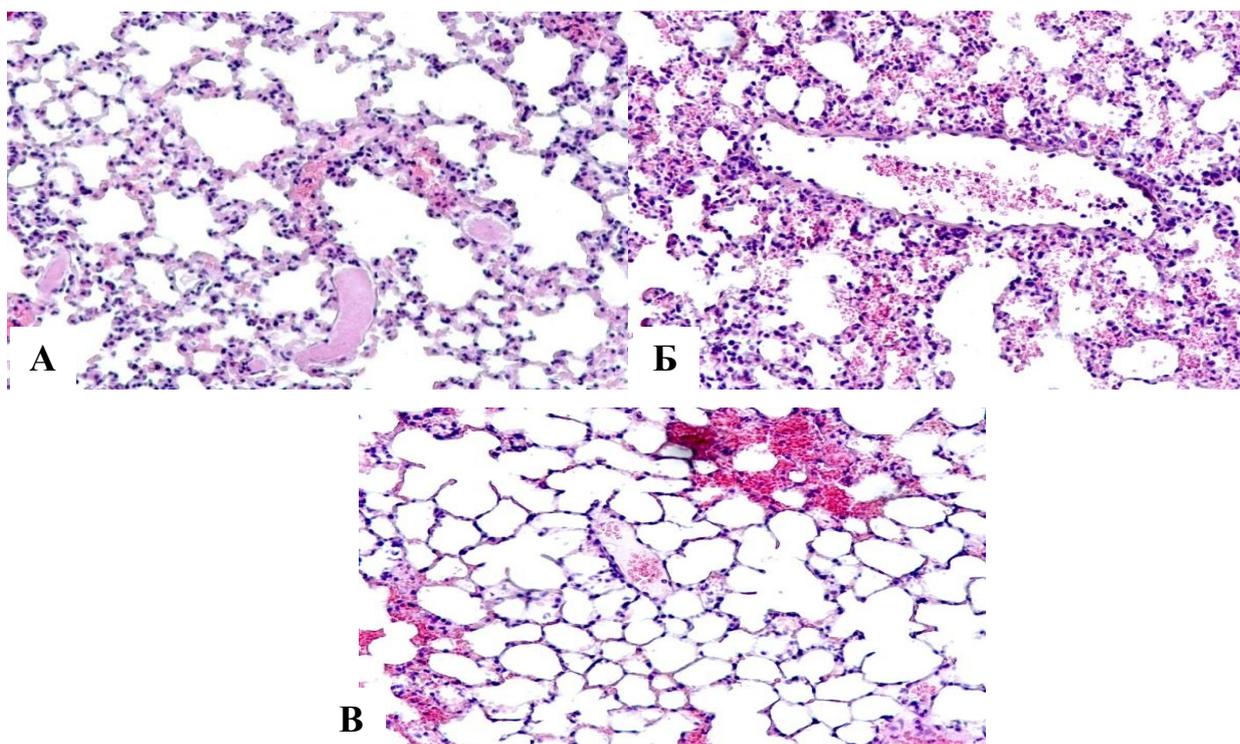


Рисунок 4.17. Тромбообразование, вызванное введением смеси коллагена и адреналина в срезах гистологических образцов легких мышей контрольной группы (А), при однократном внутривенном введении соединения Ф-168 (Б) и тирофибана (В). Окраска гематоксилином и эозином об.х10

Таким образом, на модели адреналин-колагенового тромбоза соединение Ф-168 при однократном внутривенном введении мышам оказывает выраженное антитромбогенное действие, достоверно снижая при этом среднюю площадь тромбов на срезах легких мышей в 2,7 раза по отношению к контролю и было сравнимо с тирофибаном.

4.3.4. Антитромбогенное действие на модели тромбоза нижней полой вены

Большинство тромбов может развиваться в глубоких венах голени, поднимаясь отсюда до бедра; однако до 30% сгустков могут иметь первичное происхождение выше, в подвздошно-бедренном венозном сегменте. Тромбоз вен нижних конечностей влечет за собой высокий риск развития тромбоэмболического состояния. Тромбоэмболия легочной артерии может быть наиболее опасным осложнением венозного тромбоза, с высокой степенью летальности [Yao X., 2019]. В связи с этим явилось необходимым изучение эффективности потенциального антиагрегантного средства в условиях экспериментального венозного тромбоза.

Изучение антитромботической активности соединения Ф-168 на модели венозного тромбоза при однократном внутривенном введении позволило заключить, что исследуемая субстанция способна предотвращать не только артериальные, но и венозные тромбозы. Соединение Ф-168 и препарат сравнения тирофибан были изучены в дозах ED₅₀ полученных в экспериментах по изучению антиагрегантной активности *in vivo*.

Группа ложно-оперированных животных была необходима для того, чтобы показать, что операционные манипуляции с животными не вызывают образование тромба в нижней полой вене. Это было подтверждено проведенными экспериментами (таблица 4.10).

В группе контроля после лигирования нижней полой вены через сутки наблюдалось образование массивных тромбов, средняя масса которых составила 110,3 мг. В опытной группе животных, которым внутривенно вводилось соединение Ф-168, средняя масса тромбов была статистически значимо ниже относительно значений, полученных в контроле, на 83,0% (таблица 4.10).

Средняя масса тромбов, изъятых из вен животных, получавших препарат сравнения тирофибан, составила 31,4 мг (таблица 4.10).

Таблица 4.10.

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

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

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

Примечание:

n- количество животных в группе.

¹-дозы ED₅₀, полученные при изучении антиагрегантной активности *in vivo*.

Таким образом, проведенное исследование позволяет утверждать, что соединение Ф-168 обладает выраженной способностью предотвращать образование тромбов в венозной системе.

4.3.5. Антитромботическая активность в условиях экспериментального инфаркта миокарда

Риск повторной госпитализации пациентов остается высоким в течение года после перенесенного инфаркта миокарда ввиду того, что в постинфарктный период достаточно длительное время сохраняется повышенный тромбогенный потенциал крови. Проведенные исследования показали, что антитромбоцитарные препараты оказались эффективными, прежде всего, при лечении острой фазы инфаркта миокарда и инсульта, а также для вторичной профилактики возможных рецидивов [Чазов Е. И. 2016; Berger J.S. 2018; Gulizia M.M., 2018; van de Graaf R.A., 2021].

В таблице 4.11. представлены данные по антитромботической активности Ф-168, полученные в ходе эксперимента на крысах с экспериментальным некоронарогенным инфарктом миокарда.

В контрольной группе животных с экспериментальным инфарктом миокарда, тромб в сонной артерии образовывался в среднем через 14,7 мин. Данный показатель является статистически значимым относительно группы интактных животных (таблица 4.5. и 4.6.), что свидетельствует о повышенном тромбогенном потенциале крови на фоне указанной патологии [Maxwell S., 2000; Delewi R., 2012; Fu Z., 2020; Konijnenberg L.S.F., 2020].

Субстанция соединения Ф-168 при однократном внутривенном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда достоверно пролонгировала время наступления полной окклюзии сонной артерии на 90,5% больше, чем в группе контрольных животных с данной патологией.

В ранее проведенных экспериментах по изучению антитромботической активности соединения Ф-168 при внутривенном введении интактным животным на модели тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III) на сонную артерию крыс, была показана его высокая антитромботическая активность (таблица 4.5. и 4.6.). Однако в условиях экспериментального инфаркта миокарда субстанция и готовая лекарственная форма соединения Ф-168 проявила более высокую антитромботическую активность, чем в исследованиях на интактных животных (таблица 4.11).

Таблица 4.11.

Антитромботическая активность соединения Ф-168 при однократном внутривенном введении на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-ного раствора FeCl₃ (III) при экспериментальном инфаркте миокарда и у интактных животных (M±SEM) (n=6)

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

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

Примечание: n- число животных в каждой группе.

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

4.3.6. Заключение

В ходе проведенного исследования по изучению антитромбогенных свойств соединения Ф-168 и готовой инъекционной лекарственной формы было установлено, что на различных моделях артериальных тромбозов АФС и ГЛФ оказывают выраженное антитромботическое действие. При моделировании генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза показано, что соединение Ф-168 предотвращает гибель 80% животных. Также, данные о высоком уровне

антитромботической активности на указанной модели тромбоза были подтверждены гистологическими исследованиями. В условиях экспериментального инфаркта миокарда АФС и ГЛФ Ф-168 оказывали антитромботическое действие, превосходящее таковое для интактных животных. На модели венозного тромбоза соединение Ф-168 в 1,7 раза превосходит по уровню антитромботической активности тирофибан.

4.4. Влияние соединения Ф-168 на удлинение времени кровотечения

Вне зависимости от цели назначения антитромбоцитарного препарата и используемого режима дозирования всегда существует высокий риск развития кровотечений. При монотерапии антиагрегантами обычно сообщалось о повышенном риске желудочно-кишечного кровотечения. При двойной и тройной антитромбоцитарной терапии риск серьезных кровотечений повышается [Hilkens N.A., 2018; Bouget J., 2020].

В дозе ED₅₀ антиагрегантной активности соединение Ф-168 и препарат сравнения тирофибан (0,89 мг/кг и 0,9 мг/кг, соответственно) достоверно пролонгировали показатель времени кровотечения на 223,0 и 75,0%, соответственно. Снижение доз исследуемых веществ приводило к значительному снижению кровопотери. Такая зависимость эффекта от дозы позволила рассчитать показатель ED₅₀, который для соединения Ф-168 и тирофибана составил 0,38 и 0,71 мг/кг, соответственно (таблица 4.12).

Таблица 4.12.

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на удлинение времени кровотечения из хвостовой вены мышей при однократном внутривенном пути введения (M±SEM) (n=10)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время кровотечения, с	Δ% пролонгирования времени кровотечения	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль	-	376,7±9,7	-	
2.	Ф-168	0,89	1216,7±36,24*#	223,0±9,6	0,38
		0,45	677,7±22,06*®	79,9±5,9	
		0,25	389,2±3,63	3,3±1,0	

3.	Тирофибан	0,9	659,4±15,05*	75,0±4,0	0,71
		0,45	577,5±10,33*	53,3±2,7	
		0,25	391,7±3,02	4,0±0,8	

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

#- различия статистически значимы относительно препарата сравнения тирофибан в дозах 1,1; 0,55 и 0,25 мг/кг (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони, $p < 0,0001$);

@- различия статистически значимы относительно препарата сравнения тирофибан в дозах 0,55 и 0,25 мг/кг (критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони, $p < 0,0001$);

Таким образом, проведенное исследование позволяет заключить, что соединение Ф-168 в значительно большей степени оказывает влияние на систему гемостаза, чем референсный препарат тирофибан.

Важным этапом доклинических исследований потенциальных лекарственных средств является установление механизма антиагрегантного действия молекулы, проявившей высокую специфическую фармакологическую активность. Следующим этапом изучения соединения Ф-168 явилось исследование его влияния на различные звенья системы гемостаза, стадии агрегации тромбоцитов, а также рецепторный ландшафт и систему внутриклеточных сигнальных систем кровяных пластинок.

4.5. Оценка влияния соединения Ф-168 на систему гемостаза методом тромбоэластографии

Тромбоэластография (ТЭГ) относится к интегральным методам оценки гемостаза, отражающим кинетику всех стадий формирования тромба с учетом вклада как плазменных, так и клеточных (тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов) участников гемостатических реакций, а также фибринолиз [Wikkelsø A., 2016]. В отличие от традиционных лабораторных тестов, ТЭГ – это динамический тест, а не статический, что также увеличивает его достоверность, т.к. гемостаз – это динамическая система, которая может довольно быстро меняться во времени [Лобанова Т.Н., 2020].

Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на изменение параметров тромбоэластограммы было изучено *in vivo* при однократном внутривенном введении крысам в дозах 0,89 и 0,9 мг/кг, соответственно. Метод тромбоэластографии является обширным,

позволяющим интегративно оценить состояние системы гемостаза в целом - от момента образования первых нитей фибрина (коагуляционное звено) и активности кровяных пластинок (тромбоцитарное звено) до лизиса кровяного сгустка (система фибринолиза). При изучении соединения Ф-168 и препарата тирофибана было установлено, что исследуемые образцы не оказывают статистически значимого влияния на такие показатели тромбоэластограммы, как R (время от начала записи до образования первых нитей фибрина) и K (время начала образования стабильного сгустка) (рисунок 3.19), что говорит об отсутствии у них антикоагулянтных свойств.

Угол α на тромбоэластограмме отражает скорость образования стабильного сгустка. Данный параметр снижался под влиянием соединения Ф-168 и тирофибана, что объясняется их блокирующим действием на тромбоциты (рисунок 4.18). Показатель максимальной амплитуды отражает степень функциональной активности тромбоцитов и при действии Ф-168 и тирофибана данный параметр достоверно снижался (рисунок 4.18).

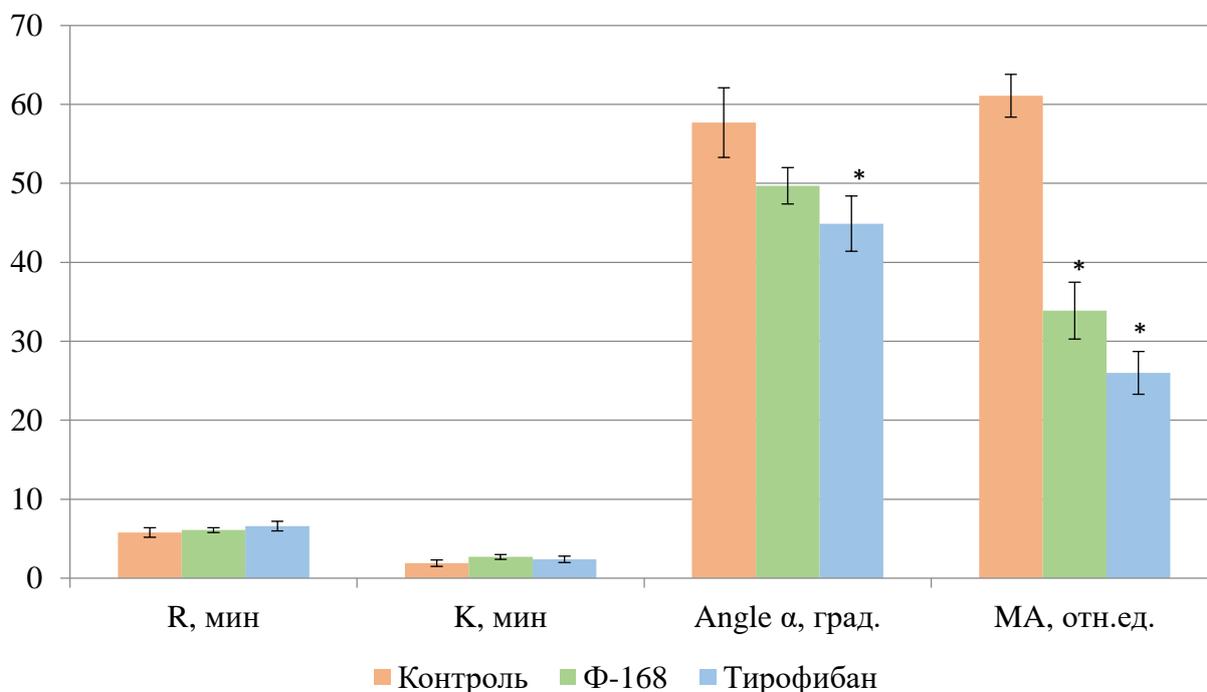


Рисунок 4.18. Влияние соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на параметры тромбоэластограммы крыс при однократном внутривенном введении

Примечание:

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

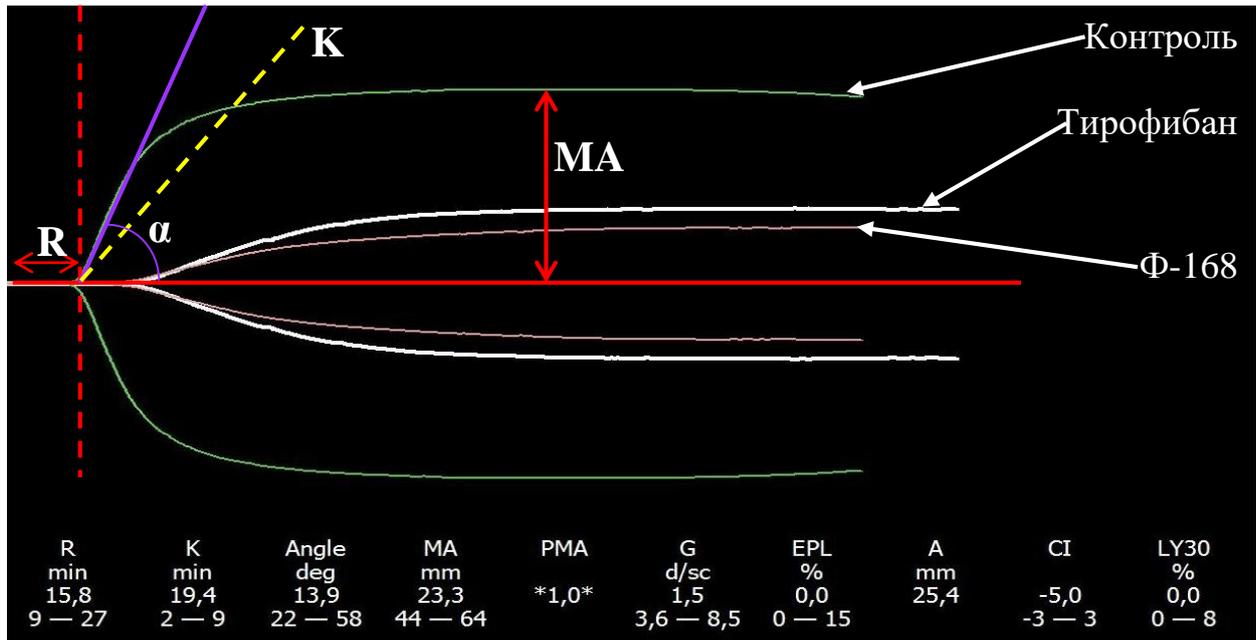


Рисунок 4.19. Пример тромбозаграмм, отражающих интегральную оценку влияния соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на систему гемостаза.

Таким образом, при комплексной оценке влияния исследуемых образцов на различные звенья системы гемостаза установлено, что соединение Ф-168 и препарат сравнения тирофибан в значительной степени обладают антиагрегантными свойствами и не проявляют при этом антикоагулянтного и/или фибринолитического действия.

4.6. Фармакокинетические свойства нового производного ксантина соединения Ф-168

Изучение фармакокинетики – кинетики всасывания, распределения и элиминации в организме является составной частью доклинических испытаний фармакологических средств. Знание фармакокинетических свойств фармакологического средства позволяет выбрать пути и методы введения, выявить ткани, в которые оно проникает наиболее интенсивно и/или в которых удерживается наиболее длительно, установить основные пути элиминации. Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости «концентрация-эффект», которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем «доза-эффект» и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека. Кроме того, по результатам экспериментального изучения фармакокинетики фармакологического средства возможно предсказать концентрацию препарата в крови (плазме) или, по меньшей мере, скорость ее снижения и, таким образом выбрать ориентировочную схему

дозирования, которая затем может быть уточнена в ходе клинических испытаний [Лапкин К.М., 1981; Миронов А.Н., 2012].

4.6.1. Фармакокинетические свойства активной фармацевтической субстанции

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации тестируемого образца в плазме крови крыс от времени (рисунок 4.20). Как видно из представленных данных, максимальная концентрация соединения Ф-168: 3-метил-8-пиперазинил-7-тиетанил-1-этилпуридинона гидрохлорида (230 нг/мл), наблюдается через пятнадцать минут после введения. Дальнейшее снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая фаза элиминации заканчивается к первому часу, вторая «медленная» фаза продолжается до 8 часов исследования.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные по зависимости концентрации соединения Ф-168 в плазме крыс от времени (таблица 4.13), показывают невысокое значение периода полувыведения ($T_{1/2} = 2,07$ часа) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата (MRT = 1,31 часа). Площадь под фармакокинетической кривой составляет $AUC = 176,87 \text{ мкг} \cdot \text{час} / \text{мл}$. Показатель системного клиренса достаточно высок ($Cl = 7,52 \text{ л} / \text{час} \cdot \text{кг}$). Величина общего объема распределения ($Vd = 22,43 \text{ л} / \text{кг}$) более, чем в 20 раз превышает общий объем жидкости в организме крысы, что свидетельствует о выраженной способности препарата интенсивно проникать в органы и ткани животных.

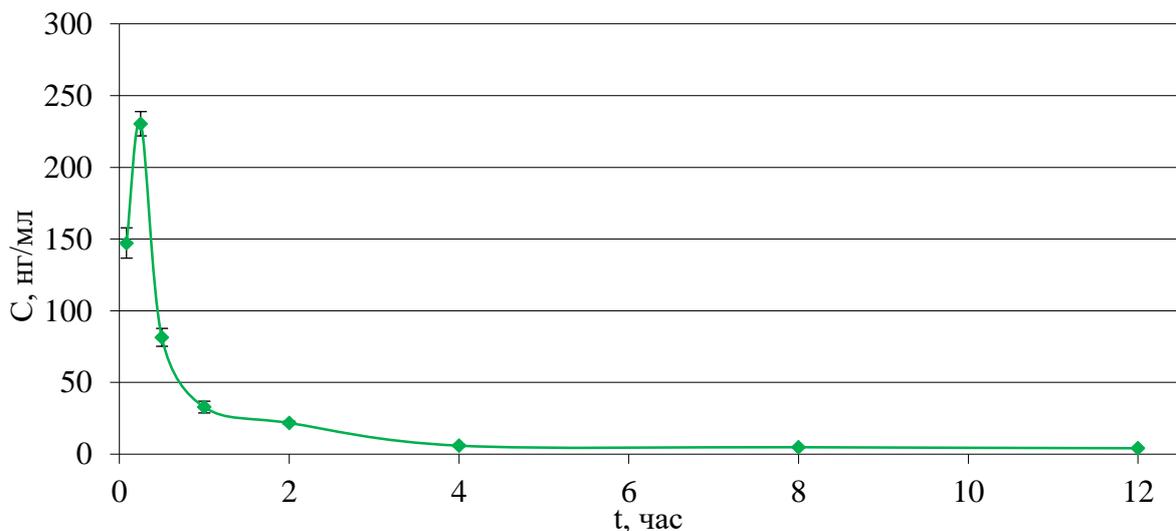


Рисунок 4.20. Содержание соединения Ф-168 в плазме крови крыс при внутривенном введении.

Таблица 4.13.

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

Параметр	Значение в плазме
AUC (нг*час/мл)	
Ke1 (час ⁻¹)	
T _{1/2} (час)	
MRT (час)	
Cl (л/(час/кг))	
Vd (л/кг)	

Изучение распределения соединения Ф-168 в организме показало, что данная субстанция проникает через гематоэнцефалический барьер в головной мозг, достигая максимальной концентрации (10,99 мкг/г) через 5 минут после введения, затем концентрация постепенно снижается до 4 часа (рисунок 3.22). Тканевая доступность составила 143,1 (таблица 4.14.).

Таблица 4.14.

Фармакокинетические параметры распределения соединения Ф-168 в органах и тканях при внутривенном введении крысам в дозе 1,33 мг/кг

Орган	AUC, нг×час/мл	Ft
Мозг		
Сердце		
Селезенка		
Легкие		
Почки		
Печень		

В сердце максимум концентрации (5,5 мкг/г) достигается также через 5 мин после введения (рисунок 4.22), затем количество вещества постепенно снижается, через час наблюдается еще одно незначительное повышение концентрации, затем концентрация снижается, оставаясь выше порога обнаружения в течение 12 часов. Тканевая доступность составила 141,13 (таблица 4.14).

В мышечной ткани содержание 3-метил-8-пиперазинил-7-тиетанил-1-этилпуриндина гидрохлорида значительно превосходит таковое в крови. Достигая максимума (20 мкг/г) через час после введения, концентрация соединения остается выше порога обнаружения в течение 4 часов (рисунок 4.25). Тканевая доступность составила 11,18.

В почках содержание вещества высокое, максимальное значение концентрации 9,3 мкг/г наблюдается через час после введения (рисунок 4.26). Тканевая доступность составила 85,35 (таблица 4.14).

Содержание соединения в печени приблизительно в 2 раза выше, чем в почках. Максимальная концентрация (18 мкг/г) наблюдается через час, оставаясь выше порога определения до 12 часов (рисунок 4.27). Тканевая доступность составила 264,4 (таблица 4.14).

Максимальная концентрация в селезенке (14 мкг/г) наблюдается через 5 минут после введения (рисунок 4.23), затем концентрация снижается, оставаясь выше порога определения до 12 часов. Тканевая доступность составила 726,15 (таблица 4.14).

Содержание соединения Ф-168 в легких достаточно высокое. Максимум концентрации наблюдается через час после введения (20 мкг/мл), затем резко снижается и определяется с 4 до 12 часов практически на одном уровне, превышая порог определения (рисунок 4.24). Тканевая доступность составила 364,8. (таблица 4.14).

В сальнике изучаемое вещество обнаружено не было.

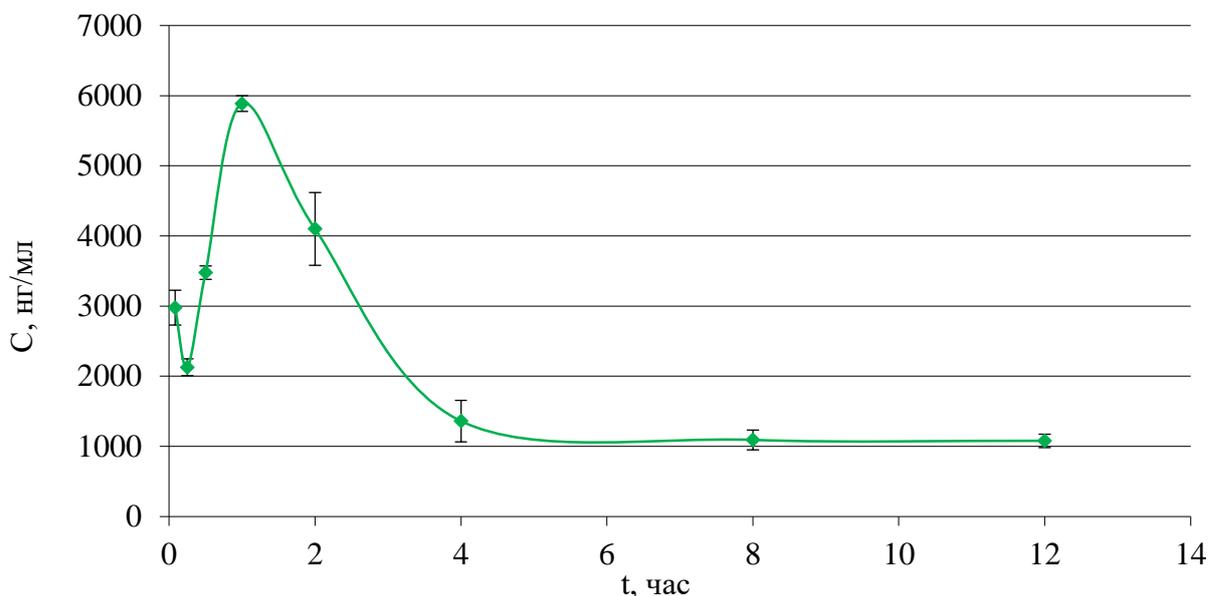


Рисунок 4.21. Содержание соединения Ф-168 в мозге крыс при однократном внутривенном введении.

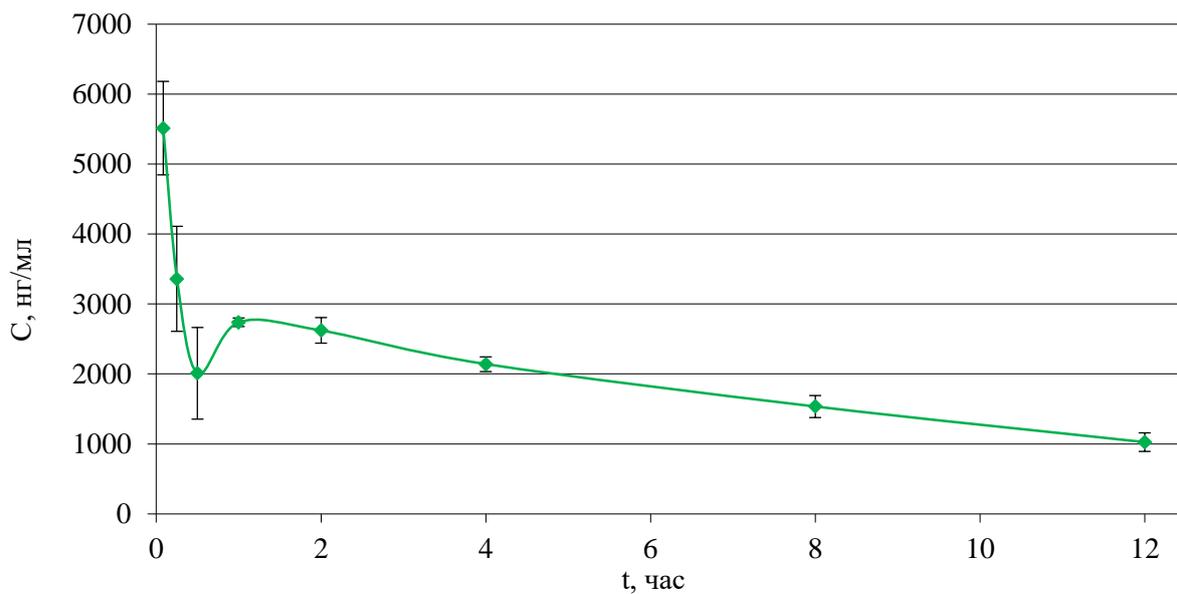


Рисунок 4.22. Содержание соединения Ф-168 в сердце крыс при однократном внутривенном введении.

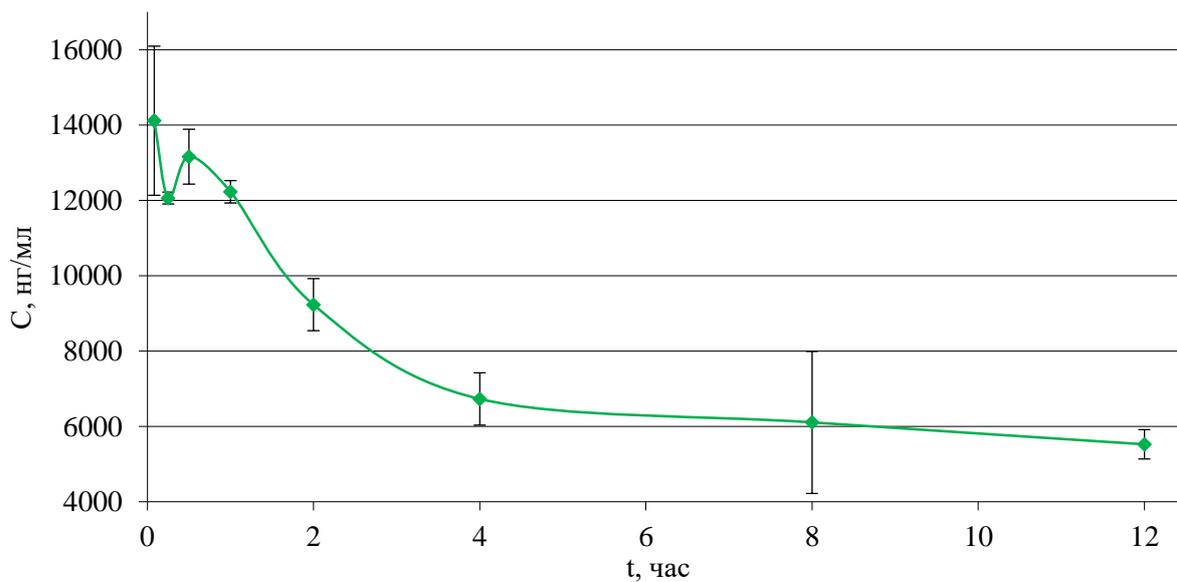


Рисунок 4.23. Содержание соединения Ф-168 в селезенке крыс при однократном внутривенном введении.

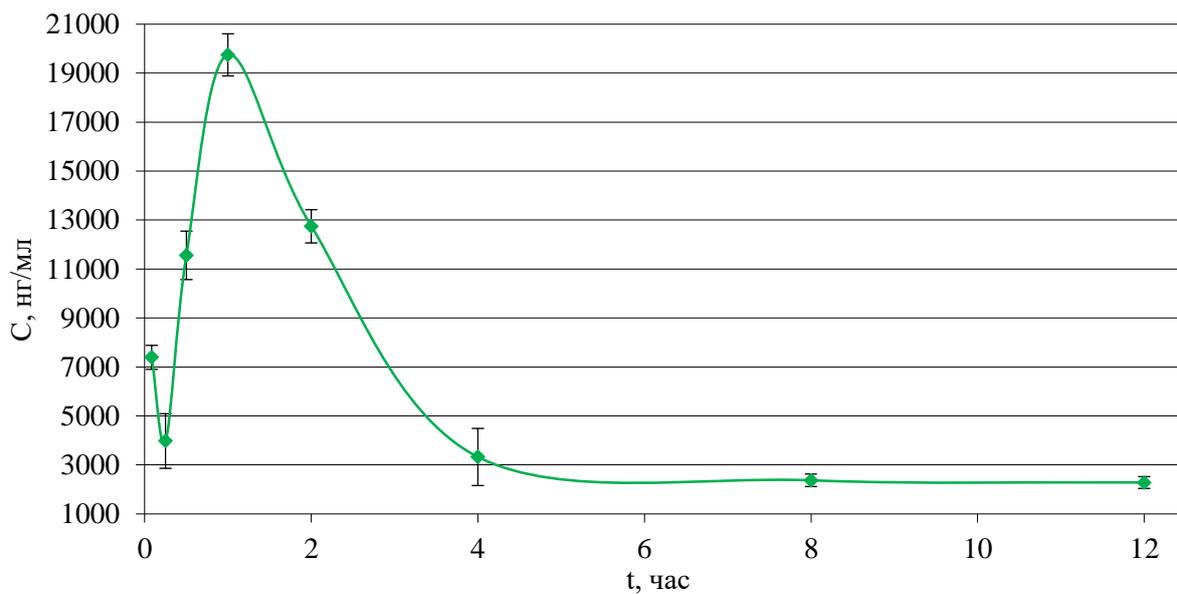


Рисунок 4.24. Содержание соединения Ф-168 в легких крыс при однократном внутривенном введении.

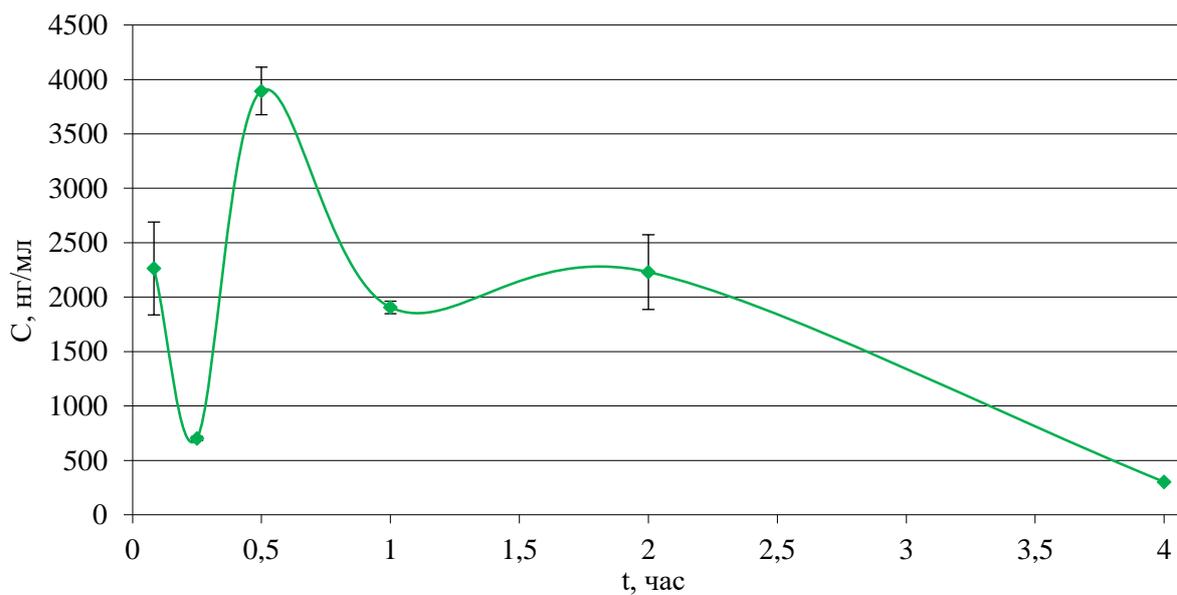


Рисунок 4.25. Содержание соединения Ф-168 в четырехглавой мышце крыс при однократном внутривенном введении.

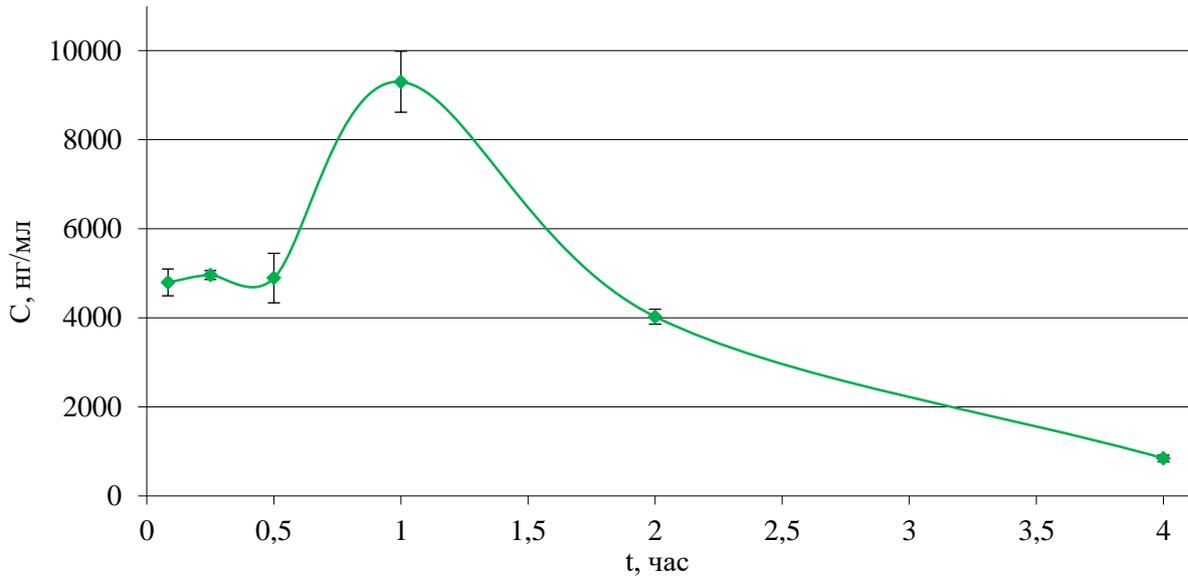


Рисунок 4.26. Содержание соединения Ф-168 в почках крыс при однократном внутривенном введении.

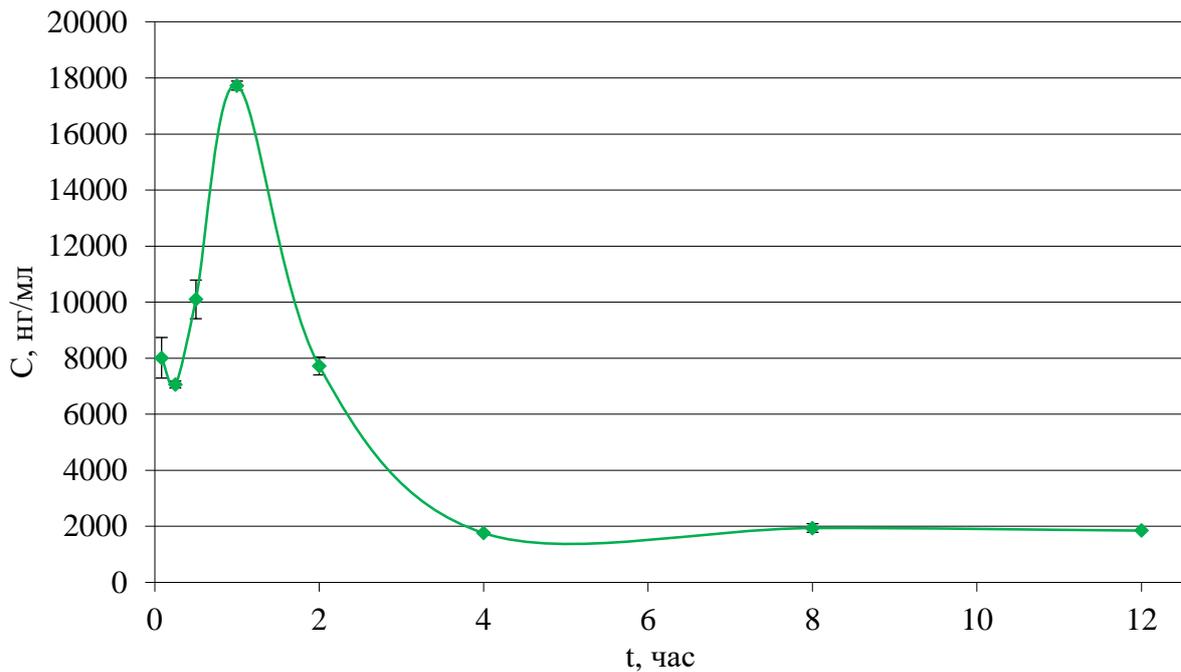


Рисунок 4.27. Содержание соединения Ф-168 в печени крыс при однократном внутривенном введении.

Таким образом, соединение Ф-168 обнаруживается во всех исследуемых органах и тканях в течение не менее 4-12 часов после введения, причем в распределении препарата наблюдается однородность. Следует отметить сходство фармакокинетических профилей образца Ф-168 в различных органах и тканях. Соединение Ф-168 хорошо проникает через гематоэнцефалический

барьер. Можно предположить, что характер распределения изучаемого соединения, скорее всего, зависит от степени васкуляризации органов и не связан с липофильностью вещества, так как оно не обнаруживается в жировой ткани.

При внутривенном введении соединения кумулятивная экскреция с мочой составляет 113 мкг, тестируемый образец определяется в моче в течение не менее 72 часов исследования после введения (рисунок 4.28).

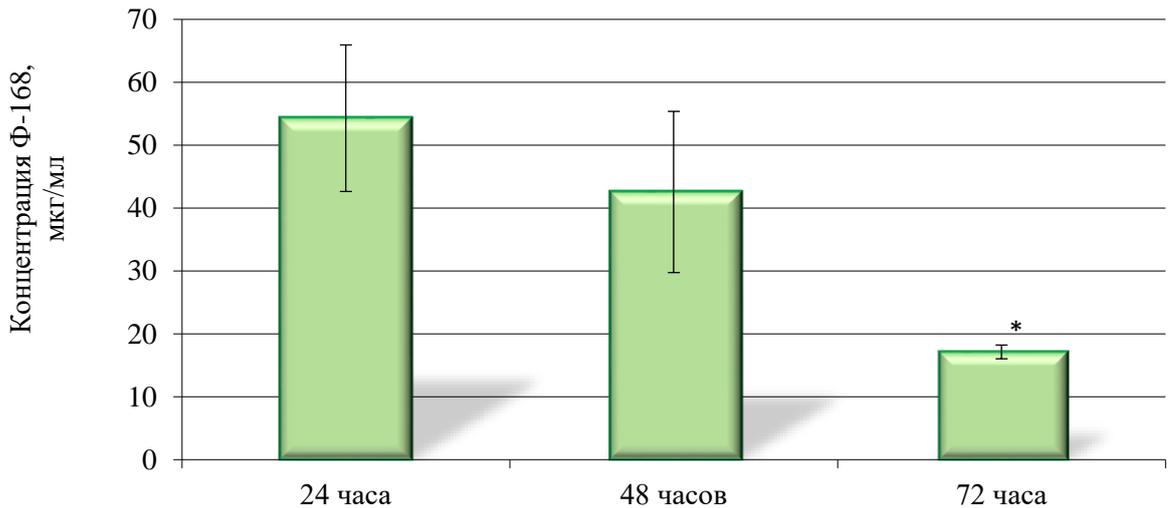


Рисунок 4.28. Содержание соединения Ф-168 в моче крыс при однократном внутривенном введении.

Экскреция соединения Ф-168 с содержимым кишечника происходит в течение 72 часов исследования (рисунок 4.29).

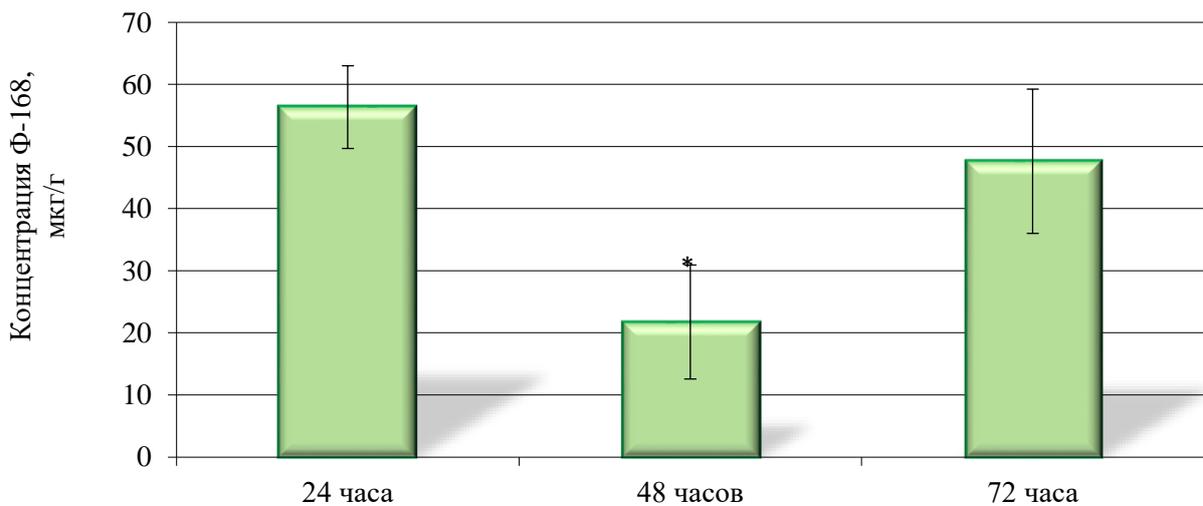


Рисунок 4.29. Содержание соединения Ф-168 в кале крыс при однократном внутривенном введении.

Таким образом, изучение выведения вещества Ф-168 показало, что внепочечный клиренс составляет 5,65 л/ч и значительно превышает ренальный - 0,53 л/ч.

Расчетная схема метаболизма соединения Ф-168 представлена на рисунке 4.32. Согласно данному прогнозу, основные пути метаболизма можно подразделить на окислительные, деградационные и синтетические реакции. Причем окисление возможно путём гидроксирования и оксидирования бензольных колец.

Деструкционные процессы происходят за счет дегградации пиперазинового радикала, а также за счет раскрытия гетероциклических радикалов. Среди синтетических путей биотрансформации характерны метилирование, процессы взаимодействия с глюкуроновой и серной кислотами не прогнозируются.

При оценке констант липофильности и диссоциации (таблица 4.16.) неизменной структуры соединения Ф-168 и его возможных метаболитов, можно предположить неоднозначное изменение физико-химических, а с ними, и хроматографических свойств по отношению к неизменной структуре.

При изучении влияния кислотного, основного и ферментативного гидролиза на содержание неизменной структуры в экскрементах, установлено, что в моче все виды гидролиза дают небольшой прирост концентрации неизменного вещества (рисунок 4.30). В кале такой тенденции не наблюдается.

Таким образом, соединение Ф-168 подвергается интенсивному метаболизму.

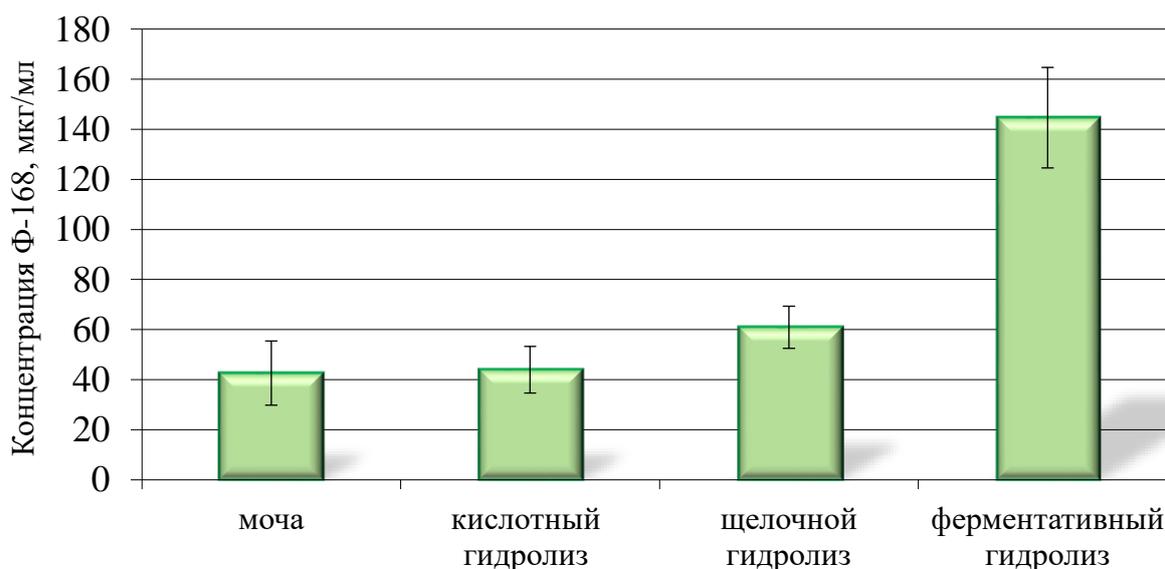


Рисунок 4.30. Содержание неизменного соединения Ф-168 в моче крыс после проведения кислотного, щелочного и ферментативного гидролиза.

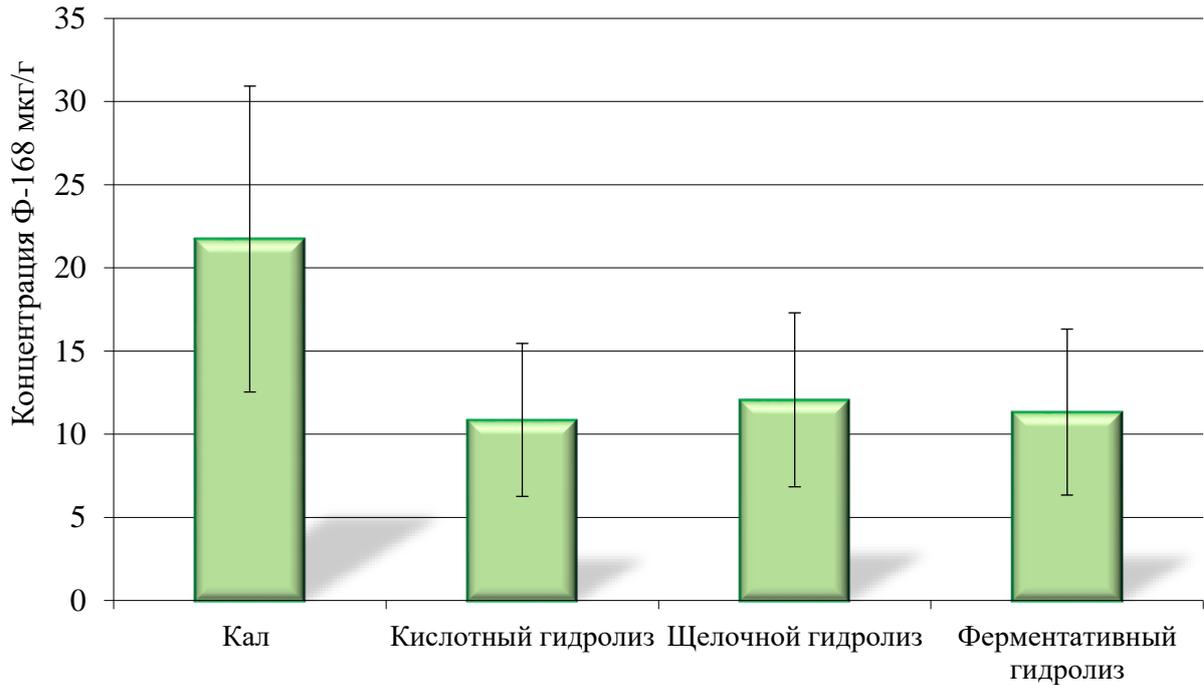


Рисунок 4.31. Содержание неизмененного соединения Ф-168 в кале крыс после проведения кислотного, щелочного и ферментативного гидролиза.

Также, в результате проведенных исследований установлена довольно высокая степень связывания тестируемого образца с сывороточным альбумином. В среднем степень связывания с белком составила 65,9% (таблица 4.15).

Таблица 4.15.

Степень связывания сывороточного альбумина с плазмой крови ($M \pm SEM$) ($n=5$)

№ п/п	Концентрация свободной фракции, нг/мл	Белковосвязанная фракция, нг/мл	Степень связывания с белком, %
1	4544,1±756,8	13183,8±1135,2	65,9±5,7

Примечание: n-количество проб

Таким образом, в результате проведенных исследований соединение Ф-168 циркулирует в крови крыс при внутривенном введении до 12 часов исследования. Интенсивно распределяется в органы и ткани, однако не содержится в жировой ткани. Проницаемость гематоэнцефалического барьера связана, скорее всего, с высокой степенью васкуляризации мозговой ткани, а не с липофильностью самого тестируемого образца. Выведение происходит и

через почки и через кишечник в течение 3 суток с момента введения. Соединение Ф-168 на 65,9% связывается с сывороточным альбумином. Метаболизм изучаемого вещества ярко выражен – образуется 15 метаболитов – и идет, в основном, по окислительному и синтетическому путям.

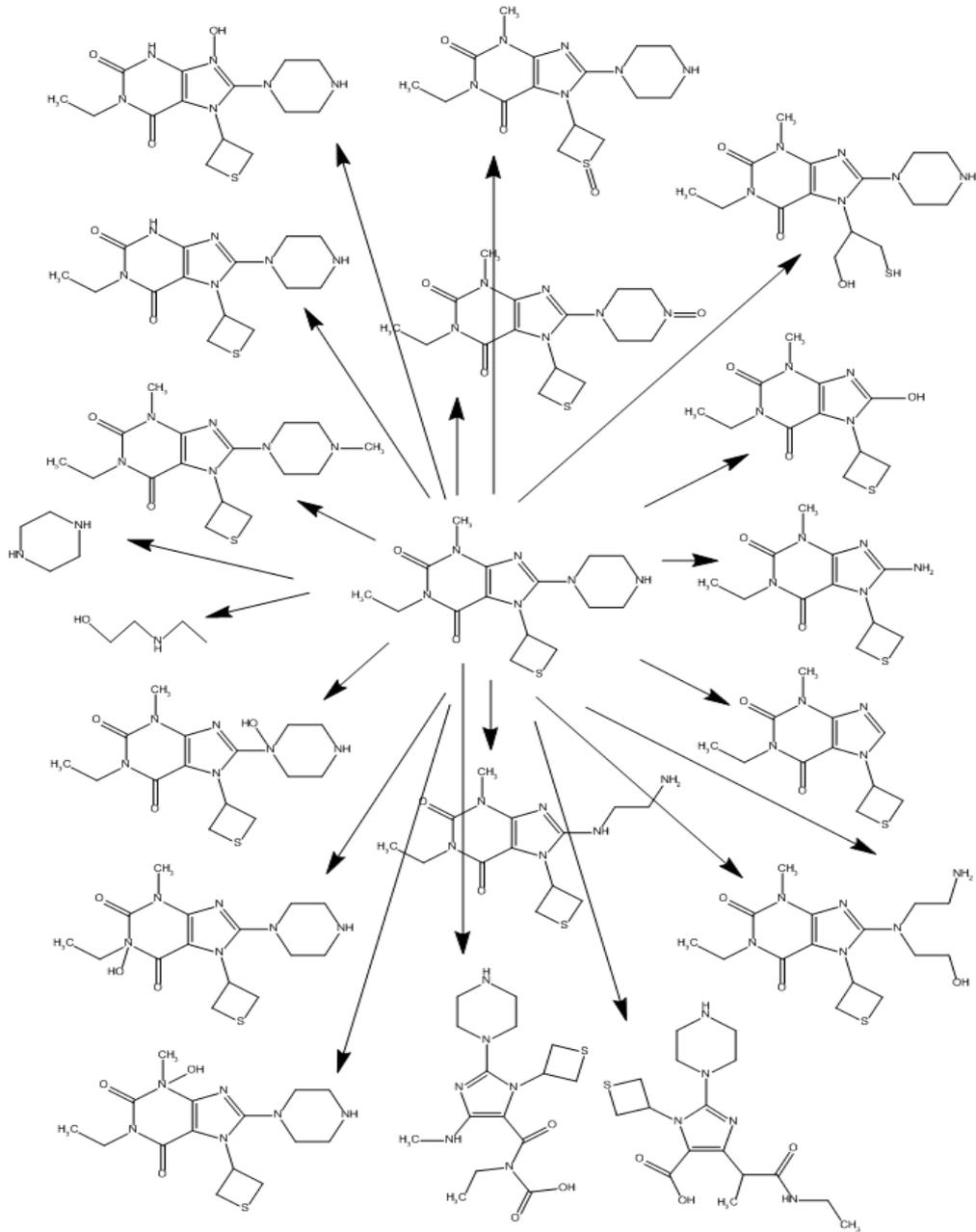
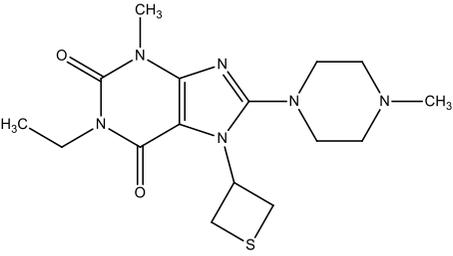
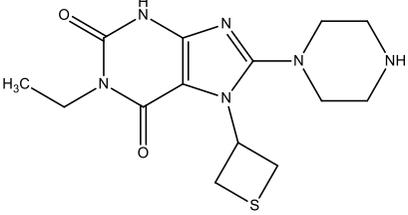
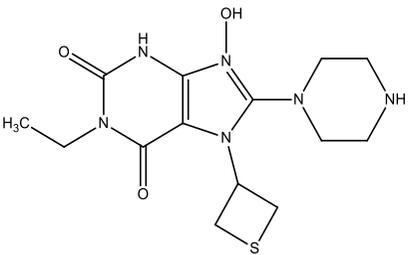
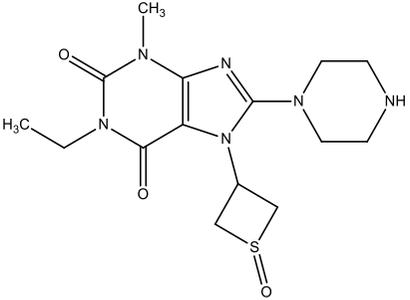
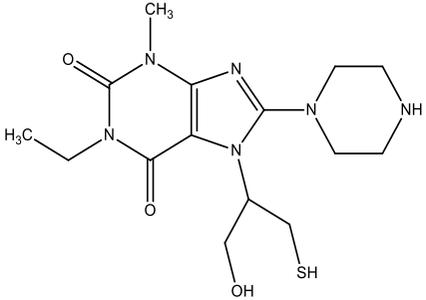


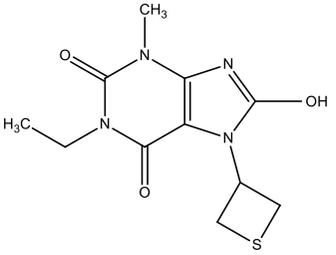
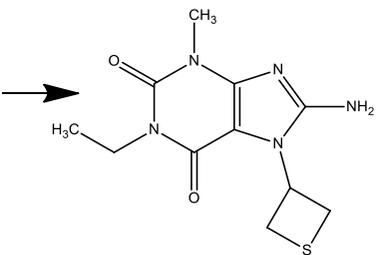
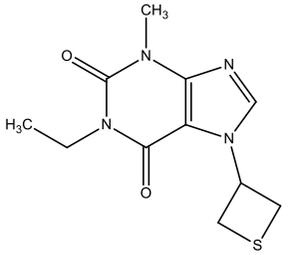
Рисунок 4.32. Прогноз метаболизма соединения Ф-168 в программе PALLAS

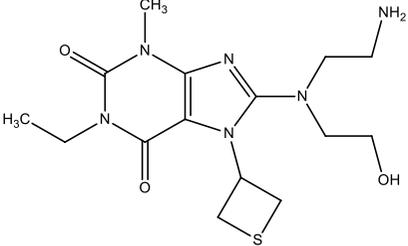
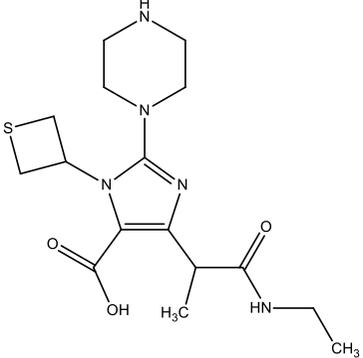
Таблица 4.16.

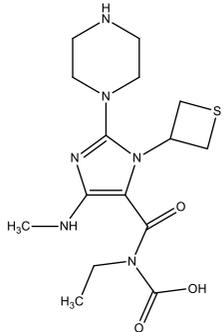
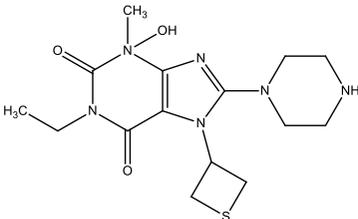
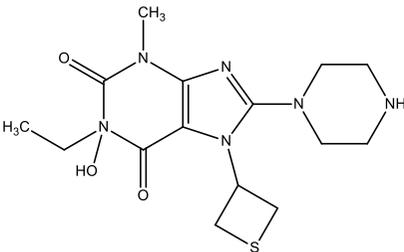
Физико-химические свойства соединения Ф-168 и его возможных метаболитов

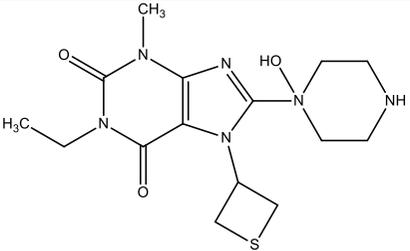
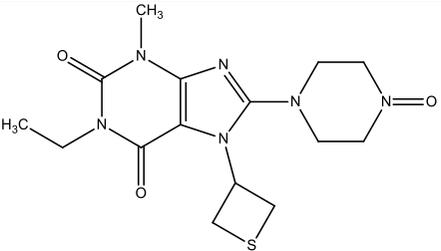
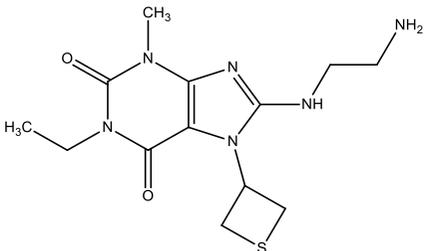
Метаболит	LgP	LgKa	
	$\log P_{\text{CDI-REKKE}} = 0.05$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 1.34$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.86$ $\log P_{\text{combined}} = 0.96$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	N-METHYL-PIPERAZINE = 4.95
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 1.15
ARCON(R)2 = -3.34			
	$\log P_{\text{CDI-REKKE}} = -0.33$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.52$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.85$ $\log P_{\text{combined}} = 0.75$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 1.56
			RARN(R1R2) = -0.92
ARCON(R)2 = -3.29			
	$\log P_{\text{CDI-REKKE}} = -0.67$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = -0.12$ $\log P_{\text{combined}} = -0.13$	Кислотные гр.	PHENOL = 7.58
		Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37
			RARN(R1R2) = 0.89
ARCON(R)2 = -3.44			

продолжение таблицы 4.16.			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -2.56$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = -0.12$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = -1.12$ $\log P_{\text{combined}} = -0.91$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 2.31
			RARN(R1R2) = -0.60
ARCON(R)2 = -3.20			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -1.30$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.43$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.59$ $\log P_{\text{combined}} = 0.52$	Кислотные гр.	RSH = 9.08
			RSH = 9.22
			RCH2OH = 15.25
		Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 1.97
			RARN(R1R2) = -0.70
	RCH2OH = -2.91		
	ARCON(R)2 = -3.06		

продолжение таблицы 4.16.			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -1.64$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = -0.29$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.61$ $\log P_{\text{combined}} = 0.35$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	$1\text{-SUBST.-IMIDAZOLE} = 1.13$ $\text{ARCON(R)2} = -3.4$
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.94$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = -0.04$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.54$ $\log P_{\text{combined}} = 0.38$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	$1\text{-SUBST.-IMIDAZOLE} = 4.09$ $\text{ARCON(R)2} = -3.20$
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -1.12$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.68$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 1.11$ $\log P_{\text{combined}} = 0.96$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	$1\text{-SUBST.-IMIDAZOLE} = 2.37$ $\text{ARCON(R)2} = -3.20$

продолжение таблицы 4.16.			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.83$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = -0.79$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = -0.54$ $\log P_{\text{combined}} = -0.61$	Кислотные гр.	$\text{RCH}_2\text{OH} = 15.40$
		Базисные гр.	$\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+ = 9.97$
			$1\text{-SUBST.-IMIDAZOLE} = 2.04$
			$\text{RCH}_2\text{OH} = -2.70$
			$\text{ARCON(R)2} = -3.18$
			$\text{RARN(R1R2)} = -4.41$
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.04$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.11$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = -1.20$ $\log P_{\text{combined}} = -0.87$	Кислотные гр.	$\text{ARCOOH} = 1.54$
		Базисные гр.	$1\text{-SUBST.-PIPERAZINE} = 6.37$
			$1\text{-SUBST.-IMIDAZOLE} = 3.96$
			$\text{RCONHR} = -0.96$
			$\text{RARN(R1R2)} = -1.61$

продолжение таблицы 4.16.			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.34$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.17$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.28$ $\log P_{\text{combined}} = \mathbf{0.24}$	Кислотные гр.	RCOOH = -2.64
		Базисные гр.	1-SUBST.-IMIDAZOLE = 7.25
			1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37
			RARN(R1R2) = 1.31
			ARCON(R)2 = -1.11
			RARNH2(CH3)+ = -1.76
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.94$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.08$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = -0.70$ $\log P_{\text{combined}} = \mathbf{-0.52}$	Кислотные гр.	ARN(OH)CO = 7.03
		Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 1.31
			RARN(R1R2) = -0.40
			ARCON(R)2 = -3.56
			$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.94$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.08$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = -0.70$ $\log P_{\text{combined}} = \mathbf{-0.52}$
Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.37		
	1-SUBST.-IMIDAZOLE = 1.54		
	RARN(R1R2) = -0.56		
	ARCON(R)2 = -4.76		

окончание таблицы 4.16.			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.94$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	1-SUBST.-PIPERAZINE = 6.86
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 1.27
ARCON(R)2 = -3.33			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.46$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = 0.04$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.43$ $\log P_{\text{combined}} = 0.32$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	1-SUBST.-IMIDAZOLE = 2.37
			RARN(R1R2) = -2.96
ARCON(R)2 = -3.20			
	$\log P_{\text{CDI-REKKER}} = -0.83$ $\log P_{\text{ANNLOGP}} = -0.81$ $\log P_{\text{ANNLOGP2005}} = 0.39$ $\log P_{\text{combined}} = 0.08$	Кислотные гр.	нет
		Базисные гр.	RCH2CH2NH3+ = 10.03
			1-SUBST.-IMIDAZOLE = 4.82
			RARNHR = -3.66
ARCON(R)2 = -3.81			

4.6.2. Биэквивалентность инъекционной лекарственной формы

Исследование проведено при однократном внутривенном введении кроликам-самцам. В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации вещества в плазме крови кроликов от времени (рисунок 4.33). Как видно из представленных данных, максимальная концентрация субстанции Ф-168 наблюдается через пятнадцать минут после введения. Дальнейшее снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. Первая фаза элиминации заканчивается к первому часу, вторая «медленная» фаза продолжается до 8 часов исследования и 12 часов при введении лекарственной формы.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные по зависимости концентрации соединения в плазме кроликов от времени представлены в таблице 4.17. Статистически значимых отклонений между фармакокинетическими параметрами при введении субстанции соединения Ф-168 и ГЛФ Ф-168 не обнаружено.

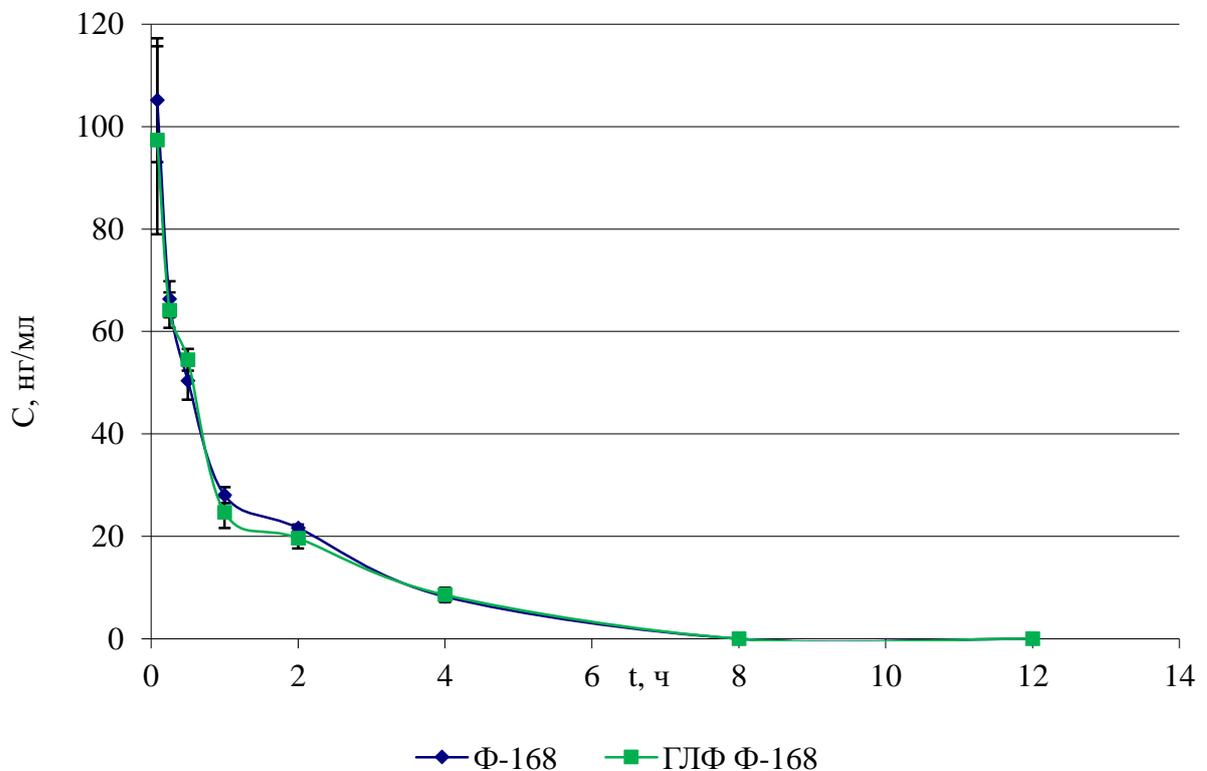


Рисунок 4.33. Содержание субстанции и готовой инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 в плазме крови кроликов при однократном внутривенном введении

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

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

Достоверных различий в фармакокинетических параметрах тестируемых образцов обнаружено не было. Анализируемый лекарственный препарат Ф-168 не вносит значимых различий в фармакокинетические свойства чистой субстанции соединения Ф-168.

4.6.3. Заключение

Таким образом, в результате проведенных фармакокинетических исследований соединения Ф-168 и его готовой инъекционной лекарственной формы установлено, что оба циркулируют в крови кроликов при внутривенном введении до 12 часов исследования. Статистически значимых различий в фармакокинетических параметрах активной фармацевтической субстанции и готовой инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 обнаружено не было. Относительная биодоступность при этом составила 97,88 %.

4.7. Изучение хронической токсичности соединения Ф-168

В рамках доклинических исследований по государственному контракту № 14.N08.12.0160 от «2» июня 2017 г. было проведено изучение хронической токсичности³ вещества Ф-168 при внутривенном 2-х недельном введении половозрелым крысам. Вещество Ф-168 испытывалось в виде субстанции белого порошка без запаха, растворимого в воде, а также в виде готовой

³ проведены с помощью сотрудников лаборатории токсикологии НЦИЛС ВолгГМУ под руководством д.б.н. Л.И. Бугаевой

лекарственной формы (концентрат для приготовления раствора для внутривенного введения). В данном разделе представлен анализ проведенных исследований.

В более ранних исследованиях установлено, что по степени токсичности соединение Ф-168 относится к классу малотоксичных веществ, а при внутривенном введении крысам его терапевтическая активность проявлялась в дозе 0,89 мг/кг. В этой связи, в хронических исследованиях при 2-х недельном внутривенном введении крысам, вещество Ф-168 испытывалось в дозах 0,89 мг/кг (что соответствует терапевтически эффективной дозе) – 1 опытная группа; 3,2 мг/кг (доза, превышающая терапевтическую в 3,5 раза) – 2 опытная группа и 5,4 мг/кг (токсическая доза, превышающая терапевтическую в 6 раз) – 3 опытная группа. Длительность эксперимента составляла 1 месяц и включала 2-х недельный курс введения вещества и 2-х недельный период отмены. В период проведения хронического эксперимента следили за общим состоянием животных, поведенческой активностью, проводили гематологические, биохимические, функциональные и патоморфологические исследования.

Установлено отсутствие повреждающего влияния вещества Ф-168 на общее состояние животных и прирост массы тела. Отмечаемые эффекты ухудшения состояния шерстного покрова у крыс, получавших токсическую дозу препарата, и снижение прироста массы тела были нивелированы после отмены введения вещества через 2 недели, что свидетельствует об обратимости эффектов и отсутствии патологического действия на состояние животных. Не отмечено влияния вещества в исследуемых дозах на пищевую и питьевую активности крыс.

При исследовании соединения Ф-168 в тесте «открытое поле» не обнаружено существенного влияния на поведенческую активность.

Анализ периферической крови и биохимических показателей плазмы крови не выявил существенных изменений. Наблюдаемые изменения носили транзиторный характер и не выходили за рамки физиологических величин.

Со стороны свертывающей системы крови у крыс изменений в 1-й и 2-й опытных группах не зафиксировано. Время свертывания крови и общее количество тромбоцитов не различалось с контрольными показателями. Тенденции, не выходящие за рамки физиологической нормы, отмечены у животных в 3-й опытной группе, у которых, относительно 1-й контрольной группы, количество тромбоцитов снижалось на 13,7% ($p > 0,05$) – у самцов и на 16,0% ($p > 0,05$) – у самок. При этом у самок в 3-й опытной группе фиксировалось достоверное снижение свертываемости крови (время свертывания крови увеличивалось на 41,2%, $p < 0,01$), тогда как у крыс самцов изменений не обнаружено.

Результаты исследований периферической крови крыс, полученные после отмены введения вещества Ф-168, характеризовались отсутствием каких-либо изменений со стороны изучаемых показателей относительно группы контрольных животных.

Результаты биохимических исследований плазмы крови крыс показали, что у самцов в 3-й опытной группе незначительно повышалось общее количество белка (до 30,0%). По результатам биохимических исследований, проведенных через 2-недели после отмены введения вещества Ф-168, установлено выравнивание с контролем содержания белка у животных экспериментальной группы.

Функциональными исследованиями не обнаружено повреждающего влияния вещества Ф-168 на процессы детоксикации и выведения. Показано, что вещество не обладает гепатотоксическим действием и способно активировать процессы детоксикации в печени. В действии вещества Ф-168 не обнаружено повреждающих эффектов на выводящую и реабсорбирующую функцию почек.

Изучение хронической токсичности готовой лекарственной формы для внутривенного введения вещества Ф-168 проводилось на половозрелых кроликах породы «Шиншилла» обоего пола 4-х месячного возраста.

Опытным группам кроликов однократно в первой половине дня в течение 2-х недель внутривенно вводили вещество Ф-168 в дозах: терапевтическая -0,43 мг/кг (соответствует 2,2 мл/кг готовой лекарственной формы); промежуточная между токсической и терапевтической дозами -1,1 мг/кг (соответствует 5,4 мл/кг, готовой лекарственной формы); токсическая доза-2,3 мг/кг (соответствует 10,8 мл/кг готовой лекарственной формы). Для расчета введения кроликам испытываемых доз в хроническом эксперименте, учитывали: результаты исследований хронической токсичности субстанции вещества Ф-168 при внутривенном введении крысам; также предполагаемую терапевтическую дозу данного вещества при его планируемом использовании в клинической практике; рекомендации «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) по межвидовому переносу вводимых доз с крысы на кролика [Миронов А.Н., 2012]. Кроликам в контрольной группе внутривенно вводили физиологический раствор, в соответствующих опыту объемах введения вещества. Длительность хронического эксперимента составила 1 месяц, при этом 2 недели, соответствовали курсу введения соединения Ф-168 кроликам и 2 недели - периоду его отмены. В хроническом эксперименте следили за общим состоянием животных и их поведением. Проводили гематологические, биохимические, функциональные и патоморфологические исследования.

По результатам проведенных исследований установлено отсутствие повреждающего влияния лекарственной формы вещества Ф-168 (0,02% концентрат для инфузий) в дозах 2,2 и 5,4 мл/кг на общее состояние, прирост массы тела гематологические, электрокардиографические и биохимические показатели. Выявленные изменения у животных в опытных группах не выходили за рамки физиологической нормы и были обратимы.

У кроликов, получавших лекарственную форму вещества Ф-168 (0,02% концентрат для инфузий) в дозе 10,8 мл/кг, общее состояние и прирост массы тела статистически не значимо различались с контрольными показателями. Поведение кроликов было ровным и не различалось с таковым в контрольной группе. При исследовании электрофизиологических показателей работы сердца у кроликов, получавших лекарственную форму вещества Ф-168 (0,02% концентрат для инфузий) в дозах 2,2; 5,4 и 10,8 мл/кг, не обнаружено патологических эффектов. Наряду с этим у кроликов выявлялись статистически не значимые тенденции дозозависимого повышения частоты сердечных сокращений и амплитуды зубца R, интервалы QRS и QT были без существенных изменений. Указанные изменения практически не выходили за рамки физиологической нормы и нивелировались до значений контрольной группы через 2 недели после отмены введения изучаемой лекарственной формы Ф-168. Дозозависимые изменения в миокарде зафиксированы также и при патоморфологическом обследовании органа. Так, если в группе с терапевтической дозой на препаратах миокарда фиксировалось лишь обратимое повышение кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла, то на препаратах сердца, взятых от кроликов, получавших вещество Ф-168 в дозах промежуточной - 5,4 мл/кг и токсической - 10,8 мл/кг, наряду с наличием периваскулярного отека встречались мелкие очаги диапедезных кровоизлияний. По результатам гематологических исследований, в периферической крови кроликов, получавших лекарственную форму вещества Ф-168 (0,02% концентрат для инфузий) в дозах 2,2 и 5,4 мл/кг, не обнаружено существенных изменений со стороны красной и белой крови. В периферической крови кроликов, получавших лекарственную форму вещества Ф-168 в дозе 10,8 мл/кг, в пределах физиологической нормы прослеживались тенденции понижения количества эритроцитов, при этом содержание гемоглобина в крови и цветовой показатель не изменялись относительно контрольных значений. В белой крови у этих же кроликов прослеживалось снижение содержания лейкоцитов без существенных патологических сдвигов в процентном содержании отдельных форм лейкоцитов в лейкоформуле. При этом в исследованиях, проведенных после отмены вещества Ф-168, ранее выявленные изменения в белой крови кроликов 3-й опытной группы выравнивались до значений контрольных величин, что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия вещества Ф-168 на периферическую кровь. Более отчетливыми были изменения со стороны свертывающей системы крови. При этом у кроликов-самцов в опытных группах было отмечено достоверно дозозависимое снижение уровня тромбоцитов (до $121,0 \times 10^9/\text{л}$) с одновременным увеличением времени свертывания крови (до 49,7 сек). У кроликов – самок указанные эффекты были достоверно выражены только при введении токсической дозы (10,8 мл/кг). Вместе с тем, в исследованиях, проведенных после отмены введения вещества Ф-168, у кроликов опытных групп

обоего пола не зафиксировано различий с контролем по количеству тромбоцитов и времени свертывания крови.

Патологических изменений у кроликов по биохимическим показателям плазмы крови не зарегистрировано. Не обнаружено также влияния вещества Ф-168 (0,02% концентрат для инфузий) на состояние биохимических показателей мочи, взятой из мочевого пузыря при некропии кроликов. При этом на вскрытии кроликов, визуальным осмотре внутренних органов и результатам их взвешивания и последующего расчета коэффициентов масс, не зафиксировано каких-либо отклонений в архитектонике расположения, их состоянии и в коэффициентах их масс.

При гистологическом обследовании препаратов тканей внутренних органов кроликов опытных групп, не зафиксировано также изменений в головном мозге, органах желудочно-кишечного тракта (желудке, кишечнике, поджелудочной железе), а также селезенке, тимусе надпочечниках и гонад. Наряду с этим у кроликов, получавших вещество Ф-168 в дозах 5,4 мг/кг и 10,8 мг/кг, были выявлены дозозависимые изменения в почках (в виде дистрофических изменений в канальцах, нарушении кровообращения в капиллярах клубочков с явлениями стаза и диапедеза эритроцитов), в печени (наличие от зернистой дистрофии, до мелкокапельной жировой дистрофии), в легких (нарушение кровообращения, утолщение межальвеолярных перегородок, наличие мелкоочаговых кровоизлияний).

На основании проведенных исследований и патоморфологического анализа состояния внутренних органов сделано заключение об отсутствии патологического влияния соединения Ф-168 на основные гомеостатические структуры крыс при 2-х недельном внутривенном курсе введения вещества в дозах 0,89; 3,2 и 5,4 мг/кг и следовательно, в токсикологическом плане данное соединение является безопасным.

Также, было установлено, что в лекарственной форме вещества Ф-168 (0,02% концентрат для инфузий) при 2-х недельном внутривенном введении кроликам в дозах 0,43 мг/кг (2,2 мл/кг) и 1,1 мг/кг (5,4 мл/кг) является не токсичной. Учитывая, имеющиеся обратимые тенденции влияния вещества Ф-168 в дозе 2,3 мг/кг (10,8 мл/кг) на гематологические, биохимические и электрокардиографические показатели, а также структурные изменения в печени, почках, сердце и легких, сочетающиеся с отсутствием гибели животных в группах, можно также заключить, что в токсикологическом плане лекарственная форма вещества Ф-168 при 2-х недельном внутривенном введении кроликам в дозе 2,3 мг/кг – является умеренно-токсичной. При этом сердце, печень и почки можно отнести к разряду «органы-мишени» в действии вещества Ф-168 при внутривенном введении в дозе 2,3 мг/кг.

Расчет дозы для человека проводился согласно методическим рекомендациям по определению безопасной дозы лекарственного препарата для проведения I фазы клинических исследований у взрослых волонтеров [Гуськова Т.А., 2012].

Расчет МРНД (Максимальная рекомендованная начальная доза) при в/в введении:

- ДБНОЭ (Доза без наблюдаемого отрицательного эффекта) лекарственной формы для крыс при внутривенном введении по результатам токсикологических исследований составляет 3,2 мг/кг;
- ЭДЧ (Эквивалентная доза для человека) = ДБНОЭ (крысы) 3,2 мг/кг /Кп (для крыс) 7 = 0,46 мг/кг;
- МРНД = ЭДЧ 0,46 мг/кг / КБ 10 = 0,046 мг/кг;
- МРНД (для человека 70 кг) = 0,046 × 70 = 3,22 мг.

ФАД (Фармакологически активная доза) по результатам исследований специфической фармакологической активности соединения Ф-168 составляет 0,9 мг.

С учетом низкой токсичности препарата соединения Ф-168 и ФАД равной 0,9 мг, представлялось целесообразным исследовать безопасность, реактогенность, эффективность и фармакокинетические параметры в ФАД соединения Ф-168 (0,9 мг) и в дозе МРНД (3,22 мг) при внутривенном болюсном введении однократно.

Таким образом, исследование безопасности, реактогенности и фармакокинетических параметров оригинального препарата - соединения Ф-168 проведены при однократном внутривенном болюсном введении в исследуемых дозах 0,9 мг и 3,22 мг.

4.8. Заключение

Артериальные тромбозы часто служат причиной внезапной сердечной смерти, инфаркта миокарда, сосудистых осложнений сахарного диабета, снижают эффективность эндоваскулярного и чрезкожного коронарного вмешательства [Петров В.И., 2019; Шляхто Е.В., 2021; Ajjan R.A., 2021; Alfi Y., 2017; Bala M.M., 2020; Bhatt D.L., 2020]. Поэтому было изучено антитромбогенное действие соединения Ф-168 и его готовой инъекционной лекарственной формы на различных моделях артериальных тромбозов. В результате изучения влияния соединения Ф-168 на процессы тромбообразования, установлена его высокая антитромботическая активность при однократном внутривенном способе введения на всех изученных моделях тромбозов. Так, на модели артериального тромбоза, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III) было показано, что по значению ED₅₀

соединение Ф-168 было сравнимо с препаратом тирофибаном, а на модели тромбоза, индуцированного электрическим током, превосходит по данному показателю тирофибан в 1,2 раза. Инъекционная лекарственная форма соединения Ф-168 при исследовании на указанных моделях артериальных тромбозов продемонстрировала высокую антитромботическую активность, подтверждающую способность Ф-168 пролонгировать время образования тромба в артериальной системе. Так, на модели артериального тромбоза, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III) на сонную артерию крысы, ГЛФ Ф-168 в дозе 1,33 мг/кг (ED_{50} антитромботической активности чистой субстанции Ф-168, полученная на данной модели артериального тромбоза) увеличивала время полной окклюзии сосуда на 47,4%. На другой модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, ГЛФ Ф-168 в дозе 0,26 мг/кг (ED_{50} антитромботической активности чистой субстанции Ф-168, полученная на данной модели артериального тромбоза) пролонгировал время образования тромба на 50,3%.

На модели тромбоза легочных артерий было показано, что соединение Ф-168 на 80 % увеличивает выживаемость мышей по сравнению с контрольными данными. Данные морфологического исследования тканей легких мышей подтверждают способность тестируемой субстанции предотвращать возникновение легочных тромбов.

Важной составляющей доклинического исследования потенциальных антиагрегантных средств является изучение их активности при экспериментальной патологии [Миронов А.Н., 2012; Majithia A., 2019]. Для этого исследования была выбрана модель экспериментального инфаркта миокарда, как наиболее близкая, при которой будет использоваться потенциальный антиагрегантный препарат в клинике. При этом в группе животных с экспериментальным инфарктом миокарда полная окклюзия сонной артерии наступала статистически значимо быстрее, чем в группе интактных крыс, что свидетельствует о повышенном тромбогенном потенциале крови у животных с данной патологией. При изучении антитромботической активности соединения Ф-168 была выявлена его высокая активность при однократном внутривенном введении, превосходящая действие данного тестируемого образца на интактных животных. Таким образом было показано, что соединение Ф-168 проявляет выраженное антитромботическое действие не только на интактных животных, но и на животных с экспериментальной патологией, сопровождающейся повышением тромбогенного потенциала крови. ГЛФ Ф-168 в условиях данной патологии продемонстрировала антитромботическую активность при однократном внутривенном способе введения в 1,7 раза превосходящую таковую на интактных животных, что говорит о высокой эффективности изучаемой лекарственной формы.

Формирование венозных тромбов чаще всего затрагивает нижнюю полую вену, поскольку анатомически это самый крупный сосуд в организме человека, и он играет главную роль в

кровообращении правого предсердия [Ройтман Е.В., 2015; Timp J.F., 2019; Anghel L., 2020]. Поэтому, помимо исследования антитромботической активности на экспериментальных моделях артериальных тромбозов явилось необходимым изучить данный вид активности на модели венозного тромбоза. Исследование влияния на процессы тромбообразования в нижней полой вене продемонстрировало, что соединение Ф-168 способствует уменьшению средней массы венозных тромбов в 5,9 раза по сравнению со значениями, полученными в контроле и при этом превосходит по антитромботической активности препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза.

Таким образом, соединение Ф-168 также способно предотвращать патологические процессы, связанные с тромбообразованием в венозной системе.

Антиагрегантная терапия вызывает различные побочные эффекты, среди которых наиболее опасными являются кровотечения. Следовательно, помимо наличия способности ингибировать агрегацию тромбоцитов, модели исследования времени кровотечения позволяют оценить выраженность возникновения данного побочного эффекта. При изучении влияния соединения Ф-168 и препарата сравнения тирофибана на время кровотечения из хвостовой вены мышей при однократном внутривенном введении, наблюдалось дозозависимое достоверное удлинение данного показателя. Соединение Ф-168 по влиянию на данный параметр превосходило препарат сравнения, что указывает на более выраженный антитромбоцитарный эффект, но с другой стороны – на возможность проявления побочного эффекта в виде кровотечений, что безусловно характерно для антитромбоцитарной терапии. Однако по сравнению с чистой субстанцией Ф-168 инъекционная лекарственная форма статистически значимо в меньшей степени пролонгировала время кровотечения, что позволяет в будущем надеяться на незначительно выраженный побочный эффект в виде кровотечений.

TRAP является пептидом, активирующим рецептор тромбина, который является мощным физиологическим индуктором агрегации, его влияние не ингибируется ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, но подавляется именно блокаторами IIb/IIIa рецепторов [Olivier C.V., 2016]. Действие АДФ в качестве индуктора опосредуется через связывание с P2Y₁₂ рецептором тромбоцитов, при этом происходит изменение формы тромбоцитов и возникают конформационные изменения IIb/IIIa-рецепторного комплекса. Соединение Ф-168 при однократном внутривенном введении интактным крысам ингибировало агрегацию, вызванную активацией P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов на 54,7%, превосходя при этом препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза, что может также указывать на блокирование IIb/IIIa рецепторов. Данные по влиянию соединения Ф-168 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами, представлены в таблице 4.18.

Таблица 4.18.

Влияние соединения Ф-168, тирофибан и ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными индукторами

№ п/п	Индуктор	Ф-168	Тирофибан	Ацетилсалициловая кислота
1.	АДФ	+	+	+
2.	Адреналин	–		
3.	Арахидоновая кислота	–		+
4.	Коллаген (4 мкг/мл)	–	+	+
5.	Коллаген (50 мкг/мл)	+	+	
6.	TRAP	+	+	
7.	PAR1-агонист	+	+	
8.	Агонист тромбоксановых рецепторов U46619	-	+	

Примечание:

+ - наличие эффекта в отношении индуктора

– - отсутствие эффекта в отношении индуктора

В отличие от ацетилсалициловой кислоты при проведении исследований было показано, что соединение Ф-168 при однократном внутривенном введении снижает уровень тромбоксана А₂, но при этом не влияет на уровень 6-кетопростагландина, что указывает на отсутствие у тестируемой субстанции нежелательного воздействия на желудочно-кишечный тракт и антитромбогенные свойства эндотелия.

В результате проведенных фармакокинетических исследований было показано, что соединение циркулирует в крови крыс при внутривенном введении до 12 часов и при этом интенсивно распределяется в органы и ткани, однако не содержится в жировой ткани. Выведение соединения Ф-168 происходит и через почки, и через кишечник в течение 3 суток с момента введения. Также тестируемая субстанция Ф-168 на 65,9% связывается с сывороточным альбумином. Изучение возможных метаболических превращений соединения Ф-168 показало, что в основном, биотрансформация вещества протекает по окислительному и синтетическому путям. Исследование фармакокинетики ГЛФ Ф-168 показало отсутствие статистически значимых различий в кинетических параметрах тестируемых образцов.

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

ГЛАВА 5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО N9-ИМИДАЗО[3,2-а]БЕНЗИМИДАЗОЛА СОЕДИНЕНИЯ RU-891

Ключевые задачи современной кардиологии заключаются в оценке риска острого коронарного синдрома, выявлении предикторов неблагоприятных событий и разработке мер профилактики и лечения пациентов с ишемической болезнью сердца. Пока оптимальная медикаментозная терапия является ключевым методом профилактики острых коронарных событий, но, к сожалению, сохраняется риск неблагоприятного исхода [Кочергин Н.А., 2020; Chen H., 2022]. Обязательным при лечении и профилактике тромбозов является применение антитромбоцитарных препаратов. Однако, применение известных антиагрегантных средств сопровождается рядом серьезных осложнений, среди которых кровотечения, ulcerогенез, явления толерантности (в особенности ацетилсалициловая кислота, клопидогрел), тромбоцитопении, тромбоцитопеническая пурпура, нарушения ЦНС [Ливзан М.А., 2019; Рудой А.С., 2019; Zhou M., 2022].

В данной главе представлено доклиническое исследование нового производного N9-имидазо[3,2-а]бензимидазола, обладающего выраженной антиагрегантной и антитромботической активностью, соединения RU-891 и его готовой лекарственной формы для приема внутрь.

5.1. Изучение влияния соединения RU-891 на стадии функциональной активности тромбоцитов

В настоящее время показано, что повышение агрегации тромбоцитов является важным элементом патогенеза развития, прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний, а также возникновения осложнений ведущих патологий (сахарный диабет, онкологические заболевания, оперативные вмешательства, септические состояния). Механизмы активации тромбоцитов могут быть различными и зависят от состава плазмы крови, изменений функционального состояния и структуры мембран тромбоцитов, активности внутриклеточного сигнального каскада. Значительная роль принадлежит и изменению функционального состояния эндотелия сосудов, а именно его антиагрегантных и антиадгезивных свойств [Козловский В.И., 2013].

Принимая во внимание многостадийность процесса тромбообразования представилось необходимым изучить влияние соединения RU-891 на различные звенья тромбоцитарного гемостаза.

5.1.1. Действие на процессы адгезии тромбоцитов

Молекулами адгезии для кровяных пластинок является фактор Виллебранда и коллаген. При повреждении сосудистой стенки «оголяется» последний и приводит к адгезированию тромбоцитов посредством гликопротеиновых рецепторов VI к поврежденному участку.

Оценку степени адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена проводили по значению импеданса на двухканальном люмиагрегометре Chronolog-700. В контрольных образцах цельной крови величина сопротивления составила 18,3 Ом (таблица 5.1). Изучение влияния соединения RU-891 на способность тромбоцитов к адгезии позволило выявить, что тестируемый образец дозозависимо ингибировал адгезию тромбоцитов на микрофибриллах коллагена. В концентрации 100 мкМ RU-891 достоверно на 29,9% блокировало способность тромбоцитов к адгезии по отношению к значениям, полученным в контроле. Изучение тестируемого образца в концентрации 10 мкМ показало уменьшение его способности ингибировать адгезию тромбоцитов на 9,8%, а в концентрации 1 мкМ соединение RU-891 не влияло на данный процесс (таблица 5.1).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота проявила слабую активность в отношении ингибирования адгезии тромбоцитов, так как в концентрации 100 мкМ блокировала данный процесс всего на 8% (таблица 5.1) и была не активна в концентрациях 10 и 1 мкМ.

Таблица 5.1.

Влияние соединения RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на процессы адгезии тромбоцитов к микрофибриллам коллагена ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	$\Delta\%$ ингибирования адгезии тромбоцитов
1.	Контроль		
2.	RU-891	100	29,9 \pm 3,3*
		10	9,8 \pm 1,9
		1	0
3.	Ацетилсалициловая кислота	100	8,0 \pm 2,6
		10	0
		1	0

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

В результате выполненных исследований показано, что соединение RU-891 статистически значимо блокирует адгезию тромбоцитов на микрофибриллах коллагена только в концентрации

100 мкМ (29,9%, по отношению к контролю). В более низких концентрациях тестируемая субстанция практически не оказывает действия на данный процесс. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в исследованных концентрациях не оказывает выраженного влияния на адгезию тромбоцитов. Следовательно, можно сделать вывод об отсутствии влияния соединения RU-891 на адгезивные гликопротеиновые VI рецепторы кровяных пластинок.

5.1.2. Влияние на активацию тромбоцитов

Активированные через гликопротеин VI тромбоциты активно секретируют различные БАВ с целью вовлечения в процесс циркулирующих тромбоцитов и уплотнения сгустка. Сигнальными молекулами для активации кровяных пластинок служат секретируемые АДФ, АТФ, тромбоксан А₂ и др. АДФ связывается с пуриновыми P2Y₁ рецепторами и способствует значительному приросту уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах, что приводит к их активации, дегрануляции и агрегации. В результате проведенных исследований было показано, что RU-891 в концентрации 1 мкМ недостоверно ингибировало активацию P2Y₁ тромбоцитов в безкальциевой среде на 13,1% (таблица 5.2).

Таблица 5.2.

Влияние соединения RU-891 и вещества сравнения MRS-2179 на степень активации тромбоцитов плазмы кролика в безкальциевой среде, индуцированной 70 нМ АДФ в опытах *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Амплитуда активации тромбоцитов (отн. ед.)	Δ% ингибирования активации тромбоцитов
1.	Контроль	1,16 ± 0,22	
2.	RU-891	1,1 ± 0,03	5,1 ± 2,2
3.	MRS-2179	0,23 ± 0,02*#	80,3 ± 0,23*

*- различия статистически значимы относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,001)

- различия статистически значимы относительно RU-891 (p<0,05).

Примечание: n-число животных в группе

Вещество сравнения MRS-2179, проявляющее свойства селективного антагониста по отношению к P2Y₁-рецепторам тромбоцитов в концентрации 1 мкМ ингибировало активацию тромбоцитов на 80,3%.

Соединение RU-891 не оказывает блокирующего действия на активацию начальных этапов процесса агрегации тромбоцитов, вызванную экспрессией P2Y₁ рецепторов на поверхности кровяных пластинок, в отличие от селективного антагониста данного подтипа рецепторов вещества MRS-2179. Следовательно, можно заключить, что антиагрегантный эффект RU-891 не связан с влиянием на P2Y₁ рецепторы тромбоцитов.

5.1.3. Ингибирование секреции АТФ из гранул хранения тромбоцитов

В активированных тромбоцитах протекает сложный комплекс внутриклеточных реакций, пусковым механизмом для которых служит сигнал, полученный через активацию P2Y рецепторов тромбоцитов, ряда интегринов (Ia/IIa, VI, Ib-IX-V, IIb/IIIa), тромбоксановых рецепторов, серотонина и др. Из плотных гранул хранения тромбоцитов активно начинает секретироваться АТФ, способная активировать и вовлекать в процесс тромбообразования покоящиеся циркулирующие тромбоциты [Медведев И.Н., 2016; Suades R., 2022].

В ходе изучения влияния соединения RU-891 на секрецию АТФ было установлено, что в контрольной группе средняя концентрация АТФ составила 55,8 нг/мл. После инкубации тест-системы с раствором соединения RU-891 в конечной концентрации 100 мкМ уровень секретлируемой АТФ составил 3,8 нг/мл, что на 93,2% достоверно ниже контрольных значений. Дозозависимое исследование влияния соединения RU-891 на данный процесс позволило определить величину IC₅₀, которая составила для соединения RU-891 3,0 мкМ. По данному параметру исследуемое соединение превосходит по активности ацетилсалициловую кислоту в 7,1 раза (таблица 5.3).

Таблица 5.3.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	Уровень АТФ, нг/мл	Δ% ингибирования секреции АТФ	IC ₅₀ , мкМ
1.	Контроль		55,8±3,6		

2.	RU-891	100	3,8±0,6*	93,2±1,1*	3,0
3.		10	15,5±2,4*	72,2±4,4*	
4.		1	37,9±3,9*	32,1±7,0*	
5.	Ацетилсалициловая кислота	100	16,8±2,4*	70,0±4,4*	21,3
6.		10	33,1±4,9*	40,7±8,7*	
7.		1	50,3±1,9	9,9±3,3	

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

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

5.1.4. Снижение уровня Р-селектина в организме крыс

Уровень Р-селектина в тромбоцитах плазмы интактных крыс контрольной группы, получавших растворитель (воду очищенную), составил 34,5 нг/мл (таблица 5.4). Соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении не оказывало влияние на уровень Р-селектина интактных тромбоцитов. Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел также не изменяли уровень Р-селектина в плазме крыс относительно контроля (таблица 5.4).

Таблица 5.4.

Влияние соединения RU-891, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на уровень Р-селектина в интактных тромбоцитах крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень Р-селектина, нг/мл
1.	Контроль (интактные тромбоциты)		34,9±2,2
2.	RU-891	23,0	34,3±0,6

3.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	34,5±1,0
4.	Клопидогрел	9,0	35,5±1,3

При активации тромбоцитов коллагеном уровень Р-селектина достоверно повышался на 21,2% относительно интактных тромбоцитов и составил 44,5 нг/мл (таблица 5.5). При однократном внутривенном введении соединения RU-891 уровень Р-селектина снижался на 27,0% по отношению к контрольным образцам с активированными тромбоцитами. Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел также снижали уровень данного показателя в плазме при активации тромбоцитов коллагеном, уменьшая его на 24,0 и 36,9%, соответственно (таблица 5.5).

Таблица 5.5.

Влияние соединения RU-891, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на уровень Р-селектина в активированных коллагеном тромбоцитах крыс при однократном внутривенном введении в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±SEM) (n=6)

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

[#]- различия статистически значимы относительно контроля (интактные тромбоциты), критерий Манна-Уитни (p<0,05)

^{*}- различия статистически значимы относительно контроля (активированные тромбоциты), критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Р-селектин – белок клеточной адгезии находится в α-гранулах тромбоцитов и после их активации сильными индукторами экспрессируется на поверхности и поэтому служит маркером активации тромбоцитов, как *in vitro*, так и *in vivo*. Активированные тромбоциты взаимодействуют с лейкоцитами крови, способствуя их мобилизации в зону повреждения, в результате чего возникает провоспалительная активация эндотелиальных клеток. Таким образом, тромбоциты не

являются лишь пассивными участниками гемостаза, а выполняют активную биосинтетическую роль, способствуя продукции белков, которые принимают участие в ряде процессов патогенеза тромбоза и воспаления. Достоверное снижение уровня Р-селектина под влиянием RU-891 свидетельствует о способности предупреждать тромбообразование на достаточно ранней стадии.

В ранее проведенных исследованиях также было установлено, что соединение RU-891 в значительной степени подавляет внутриклеточный пул ионов кальция [Кучерявенко А.Ф., 2012; Спасов А.А., 2014].

5.1.5. Влияние на уровень циклооксигеназы-1 в организме крыс

В усилении агрегации тромбоцитов участвуют сопряженные с G-белками пуриновые P2Y-рецепторы к АДФ и активируемые протеазами рецепторы к тромбину (PAR). Активация P2Y₁₂-рецепторов ингибирует активность аденилатциклазы, в результате снижается количество цАМФ, происходит дегрануляция и активация тромбоцитов и в конечном счете формирование тромба [Nadeali Z., 2022]. В активированных тромбоцитах увеличивается активность фосфолипазы A₂, ключевого фермента метаболизма арахидоновой кислоты. Циклооксигеназа 1-го типа (ЦОГ-1) тромбоцитов катализирует превращение арахидоновой кислоты в простагландины, которые затем трансформируются в тромбоксан A₂ под действием тромбоксансинтетазы. Тромбоциты экспрессируют специфические рецепторы к тромбоксану, стимуляция которых приводит к усилению первичной активации клеток, вызванной тромбином или коллагеном [Zhang L., 2022]. Тромбин взаимодействует с тромбоцитами посредством двух рецепторов, активируемых протеазами: PAR-1 и PAR-4. Стимуляция этих рецепторов через различные сигнальные молекулы приводит к активации фосфолипазы β и ингибированию аденилатциклазы. PAR-1 — основной рецептор на тромбоцитах человека, он обладает в 10–100 раз большей аффинностью к тромбину по сравнению с PAR-4 и вызывает более быструю активацию клеток. Считается, что именно опосредованная PAR-1 активация тромбоцитов обеспечивает патологическое тромбообразование, тогда как PAR-4 в основном участвует в поддержании нормального гемостаза [Gupta N., 2022].

Конечный этап образования тромба опосредуется гликопротеиновыми рецепторами Пб/Ша, которые относятся к классу интегринов (αПбβ3) и являются наиболее многочисленными мембранными рецепторами тромбоцитов. Взаимодействие активированных интегринов αПбβ3 с фибриногеном и фактором фон Виллебранда обеспечивает необратимое связывание

тромбоцитов с чужеродными поверхностями и между собой, к стабилизации адгезии, агрегации и ретракции тромба [Михайлова И.Е., 2014].

Учитывая такое разнообразие точек приложения для потенциального антиагрегантного средства, является целесообразным изучение влияния соединения RU-891 на мембранные рецепторы тромбоцитов и синтезируемые проагрегантные вещества.

Уровень ЦОГ-1 в тромбоцитах интактных крыс контрольной группы, получавших воду очищенную, составил 3,1 нг/мл (таблица 5.6). RU-891 при однократном внутрижелудочном введении не влиял на уровень ЦОГ-1 интактных тромбоцитов. В отличие от тестируемой субстанции препарат сравнения ацетилсалициловая кислота достоверно относительно контроля снижала уровень данного показателя до 1,0 нг/мл. (таблица 5.6).

Таблица 5.6.

Влияние соединения RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на уровень ЦОГ-1 в интактных тромбоцитах крыс при однократном внутрижелудочном введении ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ЦОГ-1, нг/мл	$\Delta\%$ ингибирования синтеза ЦОГ-1
1.	Контроль (интактные тромбоциты)		3,1 \pm 0,4	
2.	RU-891	23,0	2,7 \pm 0,2	28,8 \pm 7,0
3.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	1,0 \pm 0,3*	68,8 \pm 8,7*

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

При активации тромбоцитов арахидоновой кислотой уровень ЦОГ-1 достоверно повысился в 1,8 раза относительно интактных тромбоцитов и составил 5,7 нг/мл (таблица 5.7). При однократном внутрижелудочном введении ацетилсалициловой кислоты уровень ЦОГ-1 снижался в 3,8 раза по сравнению с контрольными значениями RU-891 до 1,5 нг/мл. В отличие от препарата сравнения RU-891 не оказывал влияния на уровень ЦОГ-1.

Таблица 5.7.

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

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

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

В результате проведенных исследований действия соединения RU-891 на уровень ЦОГ-1 в интактных и активированных арахидоновой кислотой тромбоцитах крыс было показано отсутствие влияния на данный показатель.

ЦОГ-1 присутствует практически во всех тканях организма человека, в тромбоцитах данный фермент обеспечивает превращение арахидоновой кислоты в тромбоксан A_2 [Belton O., 2003]. Следовательно, отсутствие влияния RU-891 на уровень ЦОГ-1 показывает, что механизм антиагрегантного действия тестируемой субстанции не связан с прямым ингибированием данного фермента.

В отличие от тестируемой субстанции препарат сравнения ацетилсалициловая кислота снижала уровень ЦОГ-1, что соответствует ее механизму действия. В эндотелии сосудов под влиянием данного фермента образуется простагландин I_2 (простациклин) [Belton O., 2003]. Из литературных данных известно, что ацетилсалициловая кислота, уменьшая активность ЦОГ-1, снижает синтез эндотелием простациклина и защитных простагландинов в ЖКТ, что приводит к побочным эффектам в виде гастротоксичности и уменьшению антитромбогенных свойств эндотелия сосудов [Seibert K., 2007]. Таким образом, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении крысам не изменяло уровень активной ЦОГ-1 в интактных и активированных тромбоцитах относительно контрольных значений, в чем состоит преимущество тестируемой субстанции перед известным

антиагрегантным средством и указывает на отсутствие у соединения RU-891 нежелательного воздействия на антитромбогенные свойства эндотелия и желудочно-кишечный тракт.

5.1.6. Заключение

На основании проведенных исследований можно заключить, что механизм антиагрегантного действия соединения RU-891 связан с блокирующим влиянием на пуриновые P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов, а также со способностью снижать синтез тромбоксана A₂. Наличие выраженной антитромбоцитарной активности для соединения RU-891 подтверждает и способность значительно снижать концентрацию внутриклеточного кальция тромбоцитов, необходимого для протекания процессов агрегации кровяных пластинок. Отсутствие влияния соединения RU-891 на ЦОГ-1 позволяет предполагать отсутствие у данного вещества негативных эффектов, характерных для ацетилсалициловой кислоты.

5.2. Фармакокинетические свойства нового производного бензимидазола RU-891.

5.2.1. Фармакокинетические свойства активной фармацевтической субстанции соединения RU-891

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации вещества в плазме крови крыс от времени (рисунок 5.1). Как видно из представленных данных, максимальная концентрация соединения RU-891 (2,93 мкг/мл) наблюдается через 15 минут после введения. Через 2 часа после введения наблюдается повторное повышение концентрации и через 4 часа концентрация снижается до уровня порога определения.

Основные фармакокинетические параметры рассчитаны по зависимости концентрации соединения в плазме крыс от времени (таблица 5.8). Площадь под фармакокинетической кривой составляет $AUC = 4,89 \text{ мкг}\cdot\text{час}/\text{мл}$. Показатель системного клиренса достаточно высок ($Cl = 4,71 \text{ л}/\text{час}\cdot\text{кг}$).

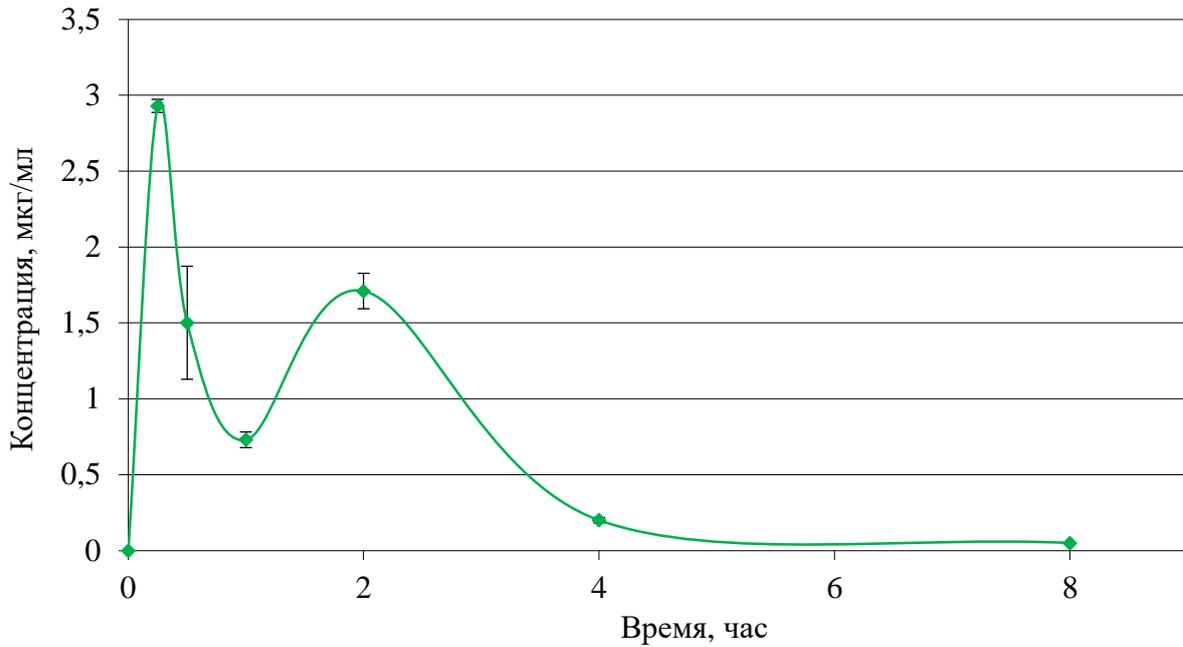


Рисунок 5.1. Содержание соединения RU-891 в плазме крови крыс при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг.

Таблица 5.8.

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

Параметры	Значение в плазме
AUC (мкг*час/мл)	4,89
K_{el} (час ⁻¹)	0,72
$T_{1/2}$ (час)	0,97
MRT (час)	1,48
Cl (л/(час/кг))	4,71
Vd (л/кг)	6,57
F абс	0,84

В ходе изучения распределения соединения RU-891 по тканям было установлено, что в почках содержание вещества в 8 раз больше, чем в плазме крови, максимальное значение концентрации 8,95 мкг/г наблюдается через 15 минут после введения (рисунок 5.3). Тканевая доступность составила 7,95 (таблица 5.9).

Содержание соединения в печени приблизительно в 15 раз выше, чем в крови. Максимальная концентрация (2,41 мкг/г) наблюдается через 2 часа, оставаясь выше порога определения до 12 часов (рисунок 5.4). Тканевая доступность составила 15,15 (таблица 5.9).

В селезенке содержание вещества в 12 раз больше содержания вещества в плазме крови, максимальное значение концентрации 11,51 мкг/г наблюдается через 30 минут после введения (рисунок 5.5). Тканевая доступность составила 12,11 (таблица 5.9).

Содержание соединения RU-891 в мозге приблизительно в 6 раз выше, чем в крови. Максимальная концентрация (1,6 мкг/г) наблюдается через 30 минут, оставаясь выше порога определения до 2 часов (рисунок 5.6). Тканевая доступность составила 6,41 (таблица 5.9).

В сердце содержание вещества в 7,5 раз больше содержания вещества в плазме крови, максимальное значение концентрации 7,69 мкг/г наблюдается через 15 минут после введения (рисунок 5.7). Тканевая доступность составила 7,57 (таблица 5.9).

Содержание соединения RU-891 в легких в 2,8 раз выше, чем в крови. Максимальная концентрация (7,56 мкг/г) наблюдается через 15 минут, оставаясь выше порога определения до 4 часов (рисунок 5.8). Тканевая доступность составила 2,84 (таблица 5.9).

В мышечной ткани и сальнике содержание RU-891 ниже порога обнаружения.

Таблица 5.9.

Фармакокинетические параметры распределения соединения RU-891 в органах и тканях при однократном внутривенном введении крысам в дозе 23 мг/кг

Орган	AUC, мкг×час/мл	Ft
Почки	38,9	7,95
Печень	74,11	15,15
Селезенка	59,23	12,11
Мозг	31,34	6,41
Сердце	37,01	7,57
Легкие	13,89	2,84

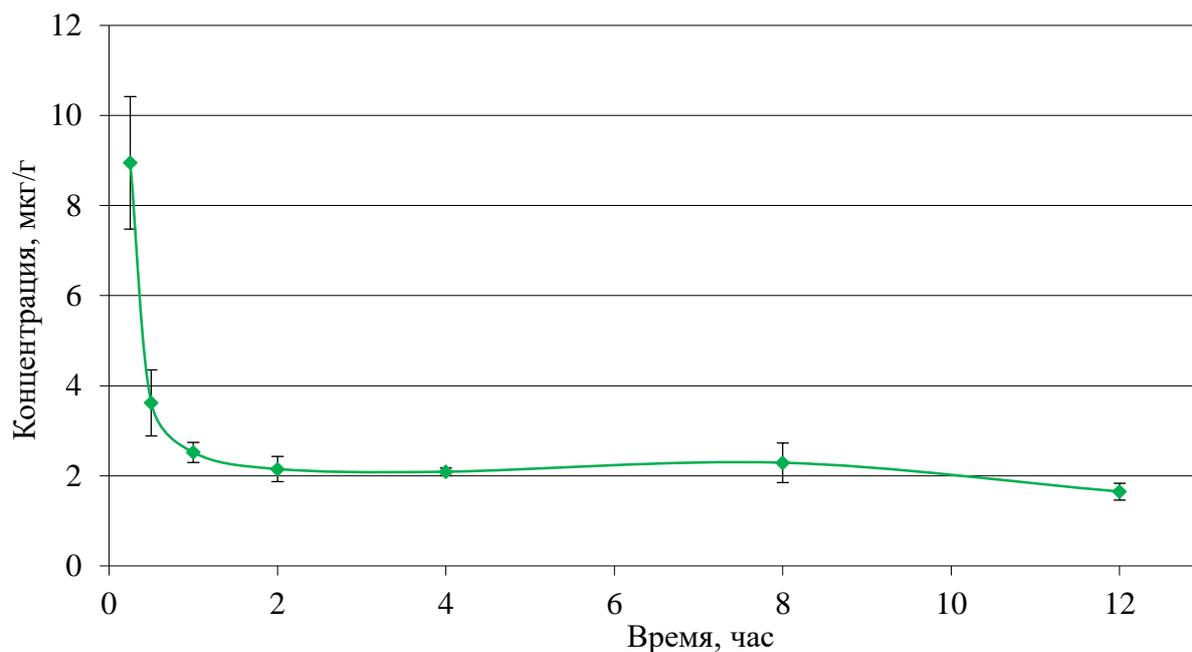


Рисунок 5.3. Содержание соединения RU-891 в почках крыс при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг.

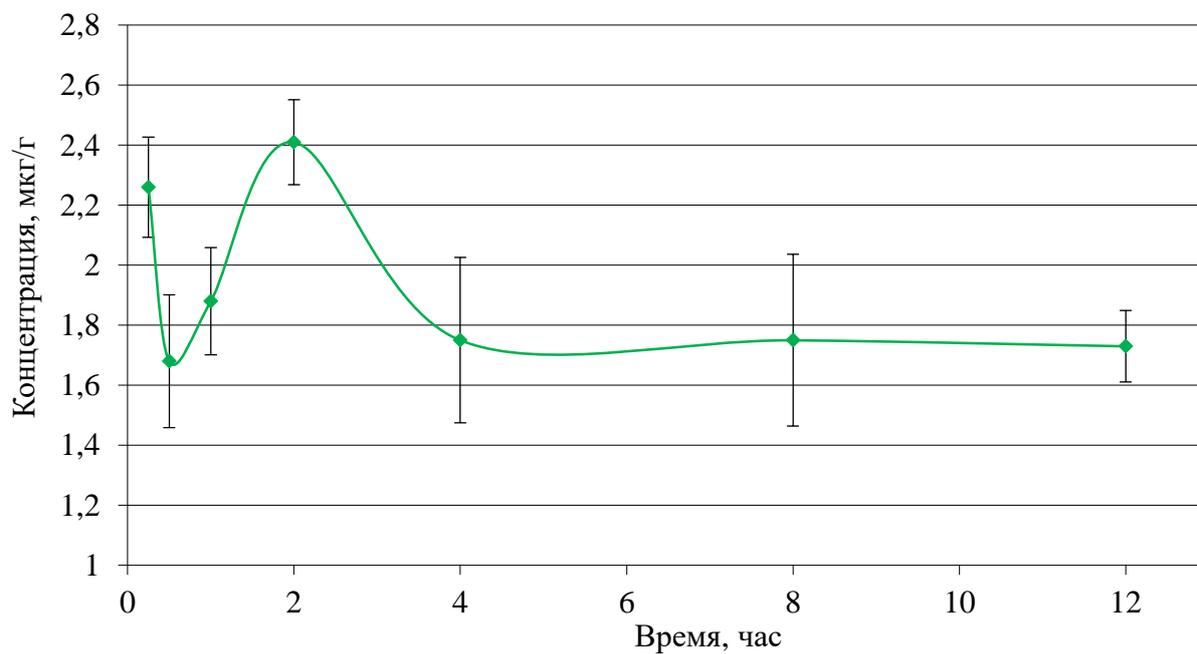


Рисунок 5.4. Содержание соединения RU-891 в печени крыс при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг.

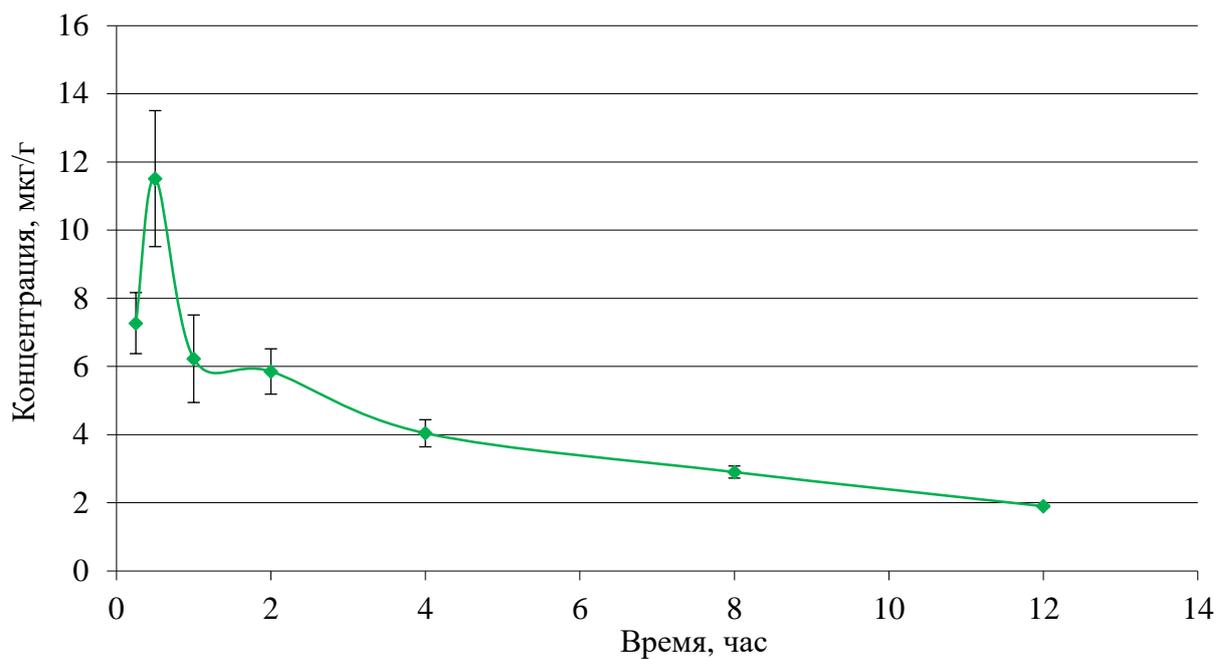


Рисунок 5.5. Содержание соединения RU-891 в селезенке крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозе 23 мг/кг.

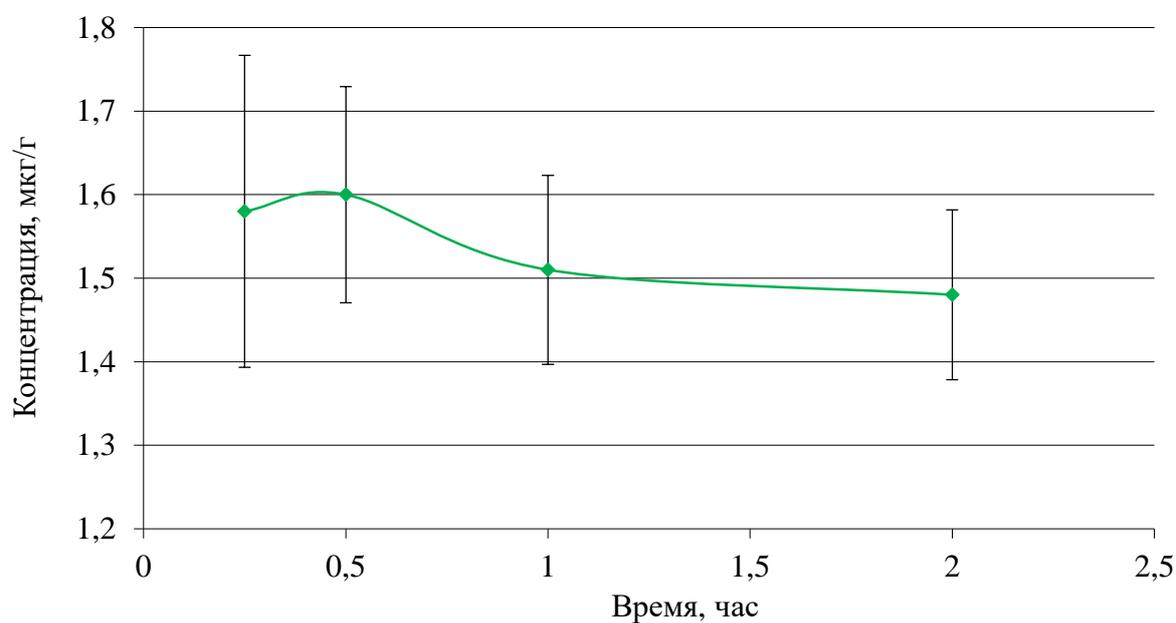


Рисунок 5.6. Содержание соединения RU-891 в мозге крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозе 23 мг/кг.

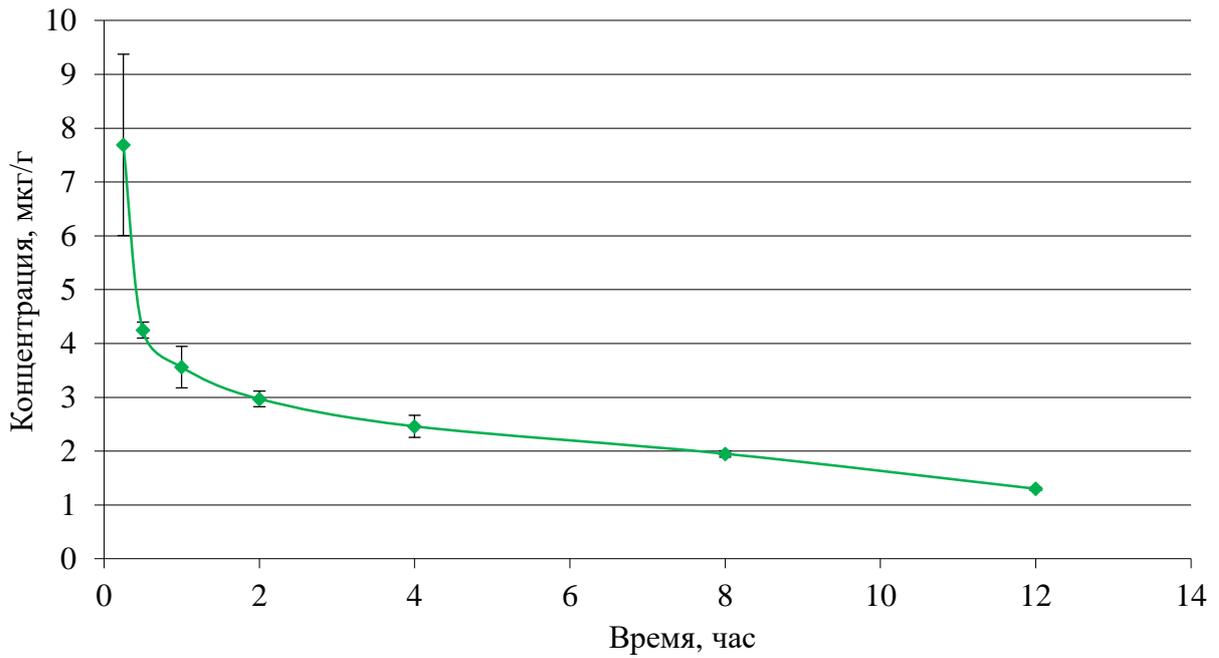


Рисунок 5.7. Содержание соединения RU-891 в сердце крыс при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг.

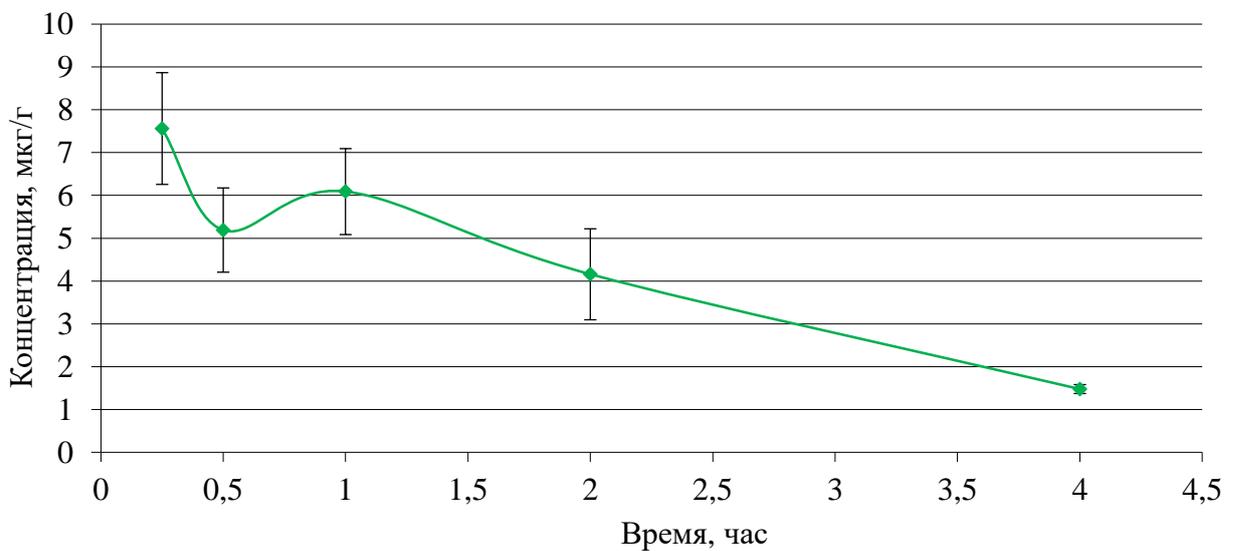


Рисунок 5.8. Содержание соединения RU-891 в легких крыс при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг.

Следует отметить, что изучаемое соединение распределяется в крови и форменных элементах крови следующим образом относительно цельной крови: в плазме содержится 90,37%, в тромбоцитарной массе – 85%, а в эритроцитарной массе- 9,8% (рисунок 5.9).

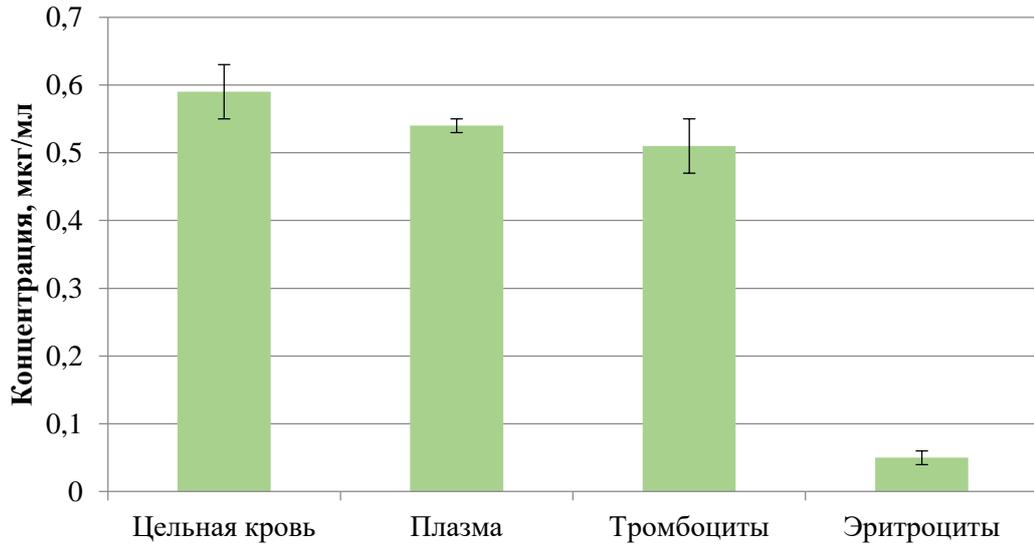


Рисунок 5.9. Распределение соединения RU-891 в крови крыс через 2 часа после однократного внутрижелудочного введения в дозе 23 мг/кг

При однократном внутрижелудочном введении в течение трех суток через почки выводится 13,91 мкг неизменной субстанции, а через кишечник 82,84 мкг (рисунок 5.10 и 5.11), что составляет 0,3% и 1,8% от введенной дозы соответственно. Ренальный клиренс Cl_r составляет на одно животное 2,84 мл/час, внепочечный клиренс Cl_{nr} - 939,16 мл/час.

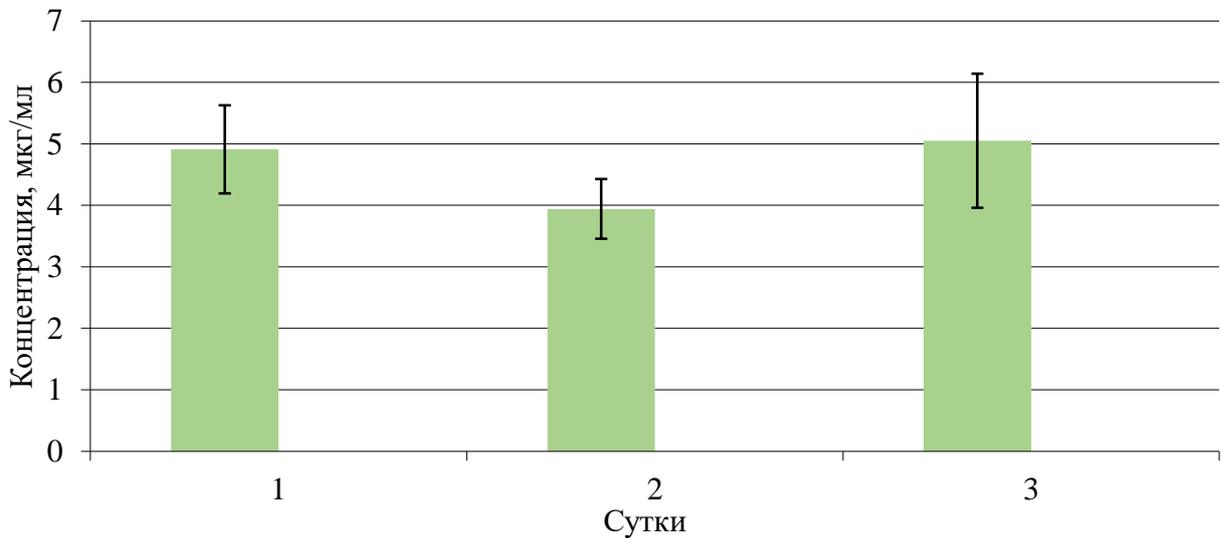


Рисунок 5.10. Содержание соединения RU-891 в моче крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозе 23 мг/кг в течение трех суток исследования

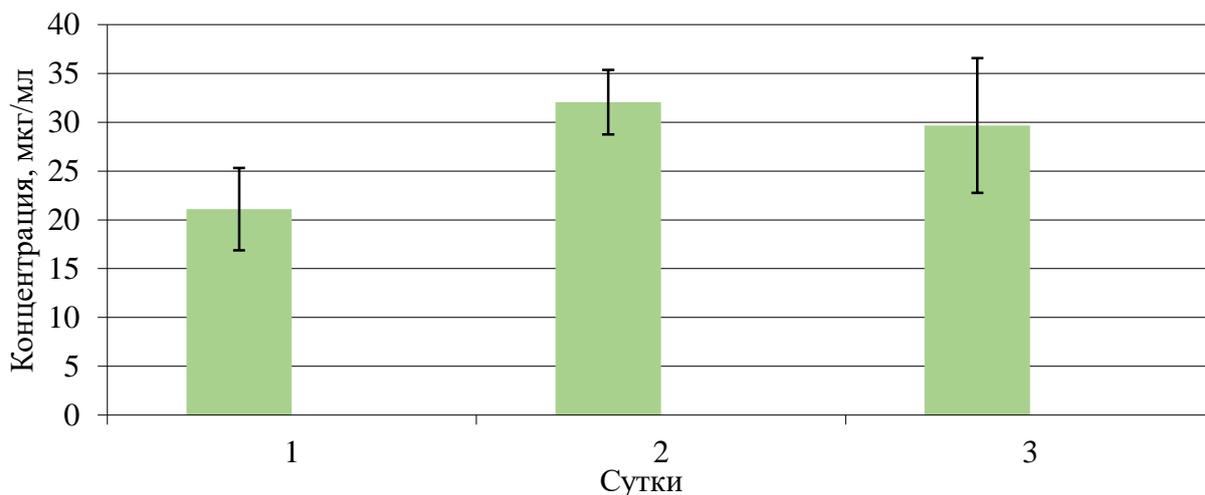


Рисунок 5.11. Содержание соединения RU-891 в кале крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозе 23 мг/кг в течение трех суток исследования.

Таблица 5.10.

Экскреция соединения RU-891 при однократном внутрижелудочном введении в дозе 23 мг/кг

Биологический материал	24 часа	48 часов	72 часа
Моча	4,91±1,6	3,94±1,09	5,05±2,44
Кал	21,1±9,43	32,06±7,38	29,67±15,4

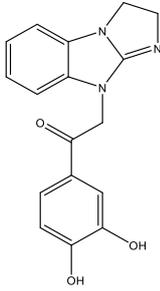
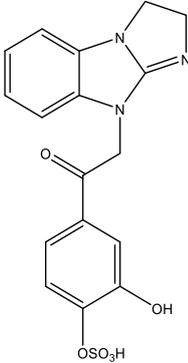
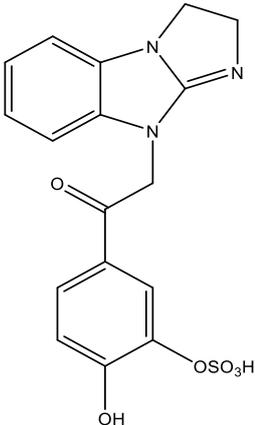
Таким образом, с экскретами выводится незначительная часть неизменной субстанции, менее 3% от введенной дозы, что, скорее всего, связано с выраженной биотрансформацией данного соединения.

Расчетная схема метаболизма соединения RU-891 представлена в таблице 5.11. Согласно данному прогнозу, основным путем метаболизма является окислительный и синтетический. Причем окисление возможно путём гидроксилирования, метилирования и оксидирования бензольных колец.

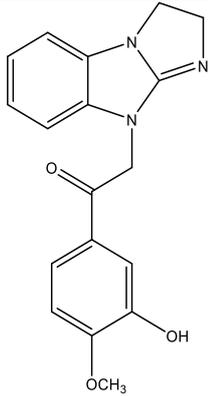
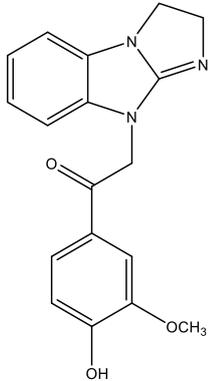
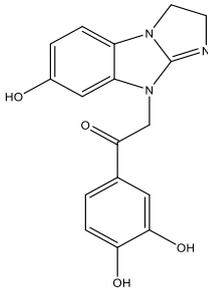
При оценке констант липофильности и диссоциации (таблица 5.11) неизменной структуры соединения RU-891 и его возможных метаболитов, можно предположить кардинальное изменение физико-химических, а с ними, и хроматографических свойств по отношению к неизменной структуре.

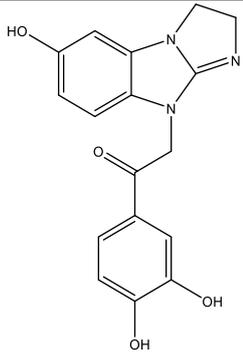
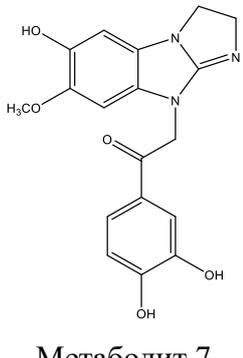
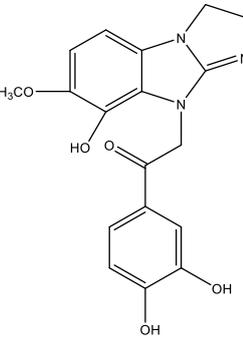
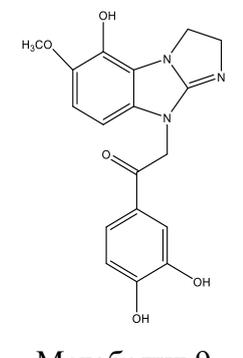
Таким образом, соединение RU-891 подвергается интенсивному метаболизму. Физико – химические свойства возможных метаболитов кардинально отличаются от неизменной структуры.

Физико-химические свойства соединения RU-891 и его возможных метаболитов

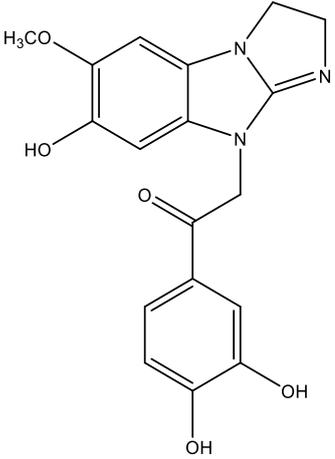
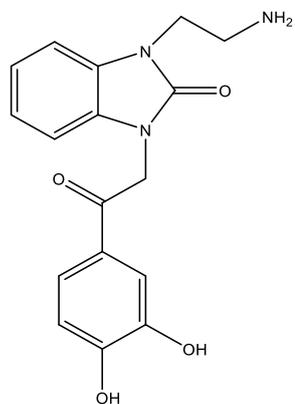
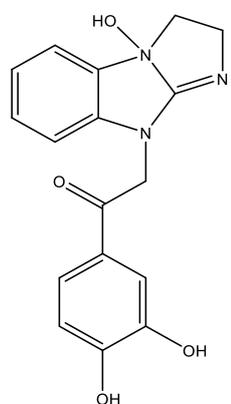
Метаболит	LgP	LgKa	
		Кислотные гр.	
 <p>RU-891</p>	2,68	Кислотные гр.	9,73
			12,66
		Базисные гр.	4,37
			1,53
 <p>Метаболит 1</p>	0,43	Кислотные гр.	1,55
			9,64
		Базисные гр.	4,37
			1,81
 <p>Метаболит 2</p>	0,41	Кислотные гр.	1,55
			10,02
		Базисные гр.	4,37
			1,81

продолжение таблицы 5.11.

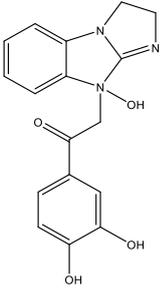
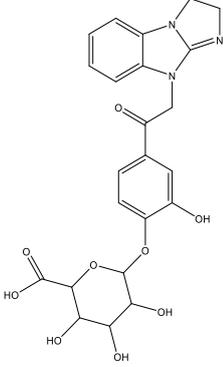
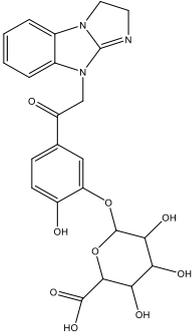
 <p>Метаболит 3</p>	3,21	Кислотные гр.	10,21
		Базисные гр.	4,37
			1,43
 <p>Метаболит 4</p>	3,21	Кислотные гр.	9,82
		Базисные гр.	4,37
			1,43
 <p>Метаболит 5</p>	2,27	Кислотные гр.	9,73
		Базисные гр.	9,79
			12,66
			5,26
		1,16	

продолжение таблицы 5.11.			
 <p>Метаболит 6</p>	2,27	Кислотные гр.	9,63
			9,73
			12,66
		Базисные гр.	4,00
2,42			
 <p>Метаболит 7</p>	2,62	Кислотные гр.	9,63
			9,73
			12,66
		Базисные гр.	4,80
2,11			
 <p>Метаболит 8</p>	2,75	Кислотные гр.	9,73
			9,97
			12,66
		Базисные гр.	4,80
1,47			
 <p>Метаболит 9</p>	2,75	Кислотные гр.	9,73
			9,79
			12,66
		Базисные гр.	4,31
1,96			

продолжение таблицы 5.11.

 <p>Метаболит 10</p>	2,62	Кислотные гр.	9,73
			9,79
			12,66
		Базисные гр.	4,95
			1,96
 <p>Метаболит 11</p>	0,57	Кислотные гр.	9,67
			12,66
		Базисные гр.	9,19
			-4,68
 <p>Метаболит 12</p>	2,03	Кислотные гр.	9,73
			12,66
		Базисные гр.	0,93
			-0,04

окончание таблицы 5.11.

 <p>Метаболит 13</p>	2,03	Кислотные гр.	9,72
12,66			
Базисные гр.		3,77	
		-2,88	
 <p>Метаболит 14</p>	0,57	Кислотные гр.	2,50
9,94			
14,00			
14,45			
18,21			
Базисные гр.		4,37	
	1,81		
-2,18			
 <p>Метаболит 15</p>	0,57	Кислотные гр.	2,50
10,33			
14,00			
14,45			
18,21			
Базисные гр.		4,37	
	1,81		
-2,18			

После обработки проб мочи и кала кислотой, щелочью, арилсульфатазой и глюкоронидазой, концентрация соединения RU-891 осталась фактически без изменений после щелочного и кислотного гидролиза и возросла более чем в 5 раз после ферментативного гидролиза (рисунок 5.12 и 5.13).

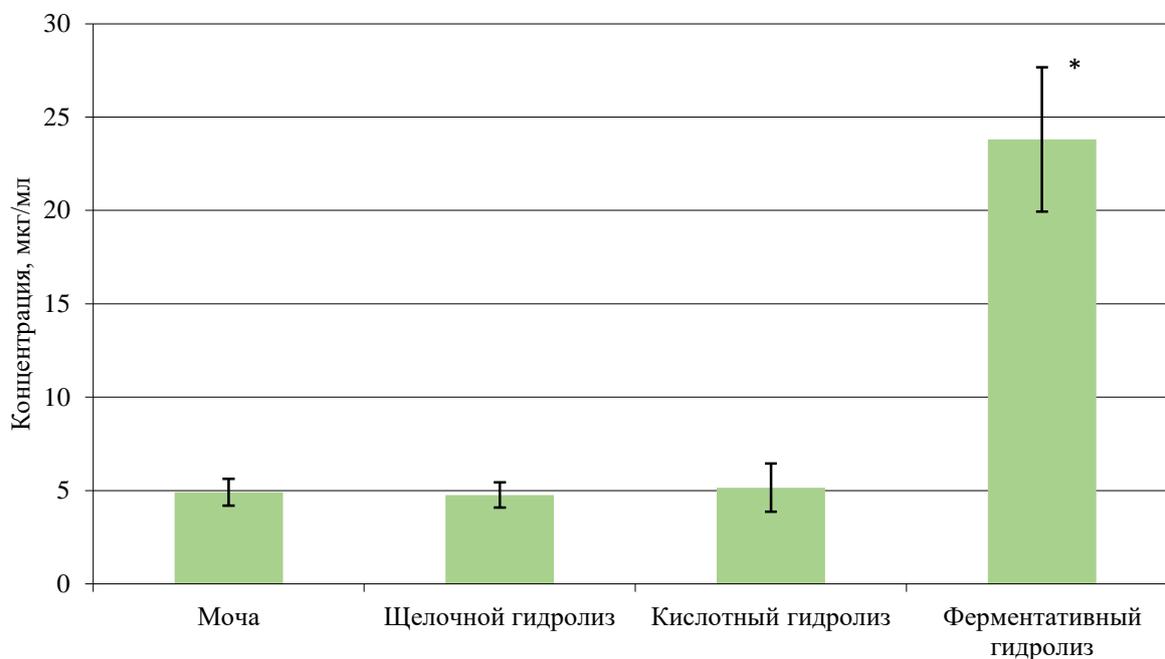


Рисунок 5.12. Содержание соединения RU-891 в моче крыс после гидролиза

Потмечание:

*- различия статистически значимы относительно групп без гидролиза, с щелочным и кислотным гидролизом, критерий one-way ANOVA ($p < 0,05$)

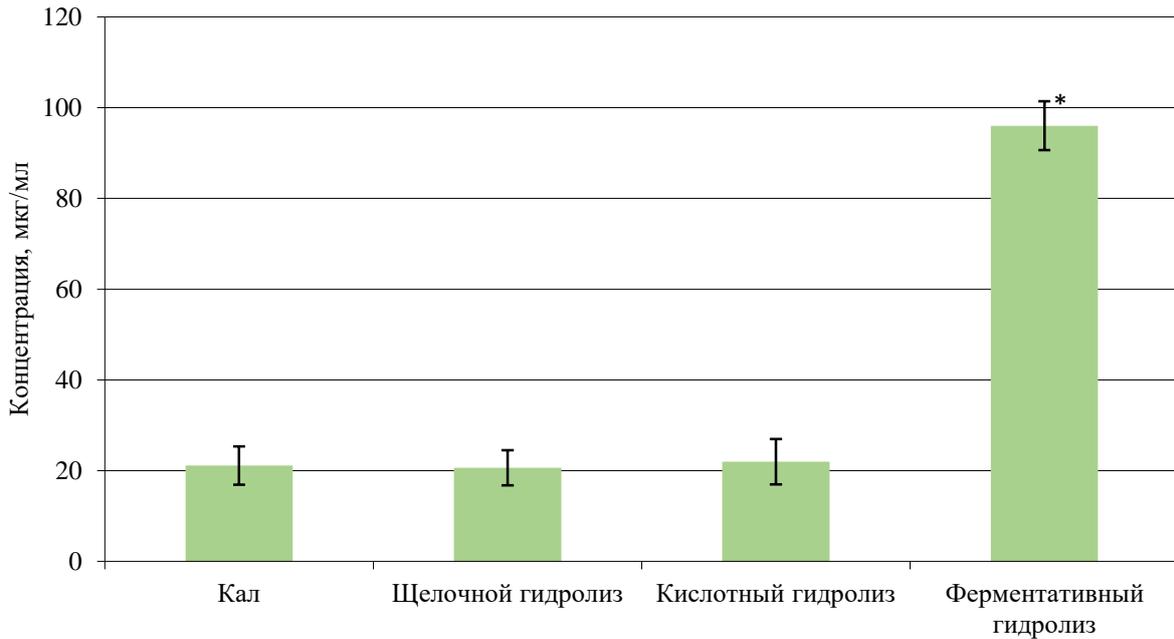


Рисунок 5.13. Содержание соединения RU-891 в кале крыс после гидролиза

Примечание:

*- различия статистически значимы относительно групп без гидролиза, с щелочным и кислотным гидролизом, критерий one-way ANOVA ($p < 0,05$)

Таким образом, соединение RU-891 подвергается выраженной биотрансформации, что подтверждается малым содержанием неизмененного вещества в экскретах относительно введенной дозы. Основные пути биотрансформации синтетические и окислительные. В экскрементах содержится в 5 раз больше конъюгатов с глюкуроновой кислотой и серной кислотой, чем неизменной субстанции исследуемого соединения.

На основании данных по изучению связывания соединения RU-891 с белками плазмы установлено, что процент связывания с сывороточным альбумином составляет 50,5% (таблица 5.12).

Таблица 5.12.

Связывание соединения RU-891 с сывороточным альбумином

№ пробы	Белковосвязанная фракция, %	Свободная фракция, %	Средний процент связывания с белком
1	46,74	53,25	50,5
2	42,7	57,21	
3	57,68	42,31	

4	51,38	48,61	
5	54,02	45,97	

При многократном введении установлено, что площадь под фармакокинетической кривой возрастает на 3,89% (рисунок 5.14).

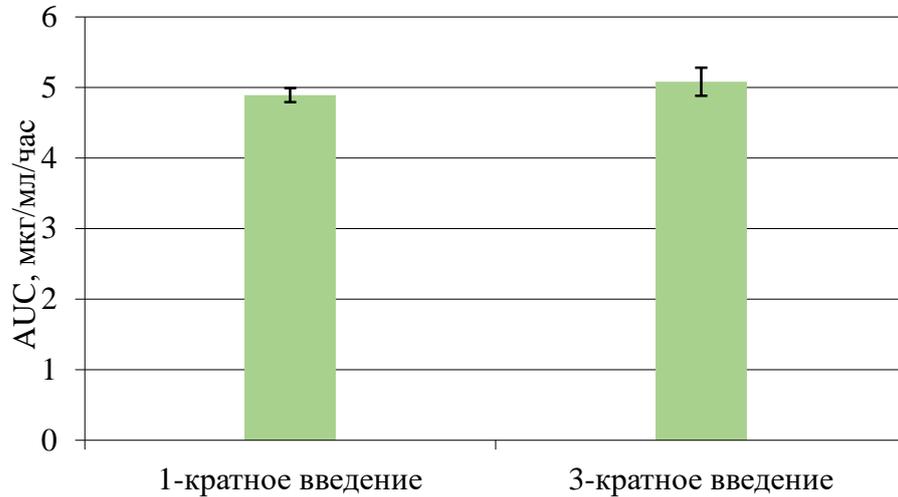


Рисунок 5.14. Зависимость площади под фармакокинетической кривой от кратности введения соединения RU-891 в дозе 23 мг/кг.

Таким образом, при 3-х кратном введении не наблюдается значительного возрастания концентраций в крови крыс, что позволяет судить об отсутствии кумуляции данного соединения.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что соединение RU-891 циркулирует в крови крыс до 8 часа исследования. Интенсивно распределяется в органы и ткани с высокой степенью васкуляризации и липофильностью. Метаболизм изучаемого вещества ярко выражен – образуется 15 метаболитов – и идет, в основном, по окислительному и синтетическому путям. Соединение RU-891 на 50,5% связывается с сывороточным альбумином. При многократном введении выраженной кумуляции не выявлено.

5.2.2. Биоэквивалентность лекарственной формы для приема внутрь

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации вещества в плазме крови кроликов от времени (рисунок 5.15). Как видно из представленных данных, максимальная концентрация соединения RU-891 и готовой лекарственной формы соединения RU-891 наблюдается через 15

минут после введения. Дальнейшее снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации.

Фармакокинетическая кривая при введении ГЛФ RU-891 представлена в сравнении с фармакокинетической кривой, полученной при введении субстанции соединения RU-891 (рисунок 5.15).

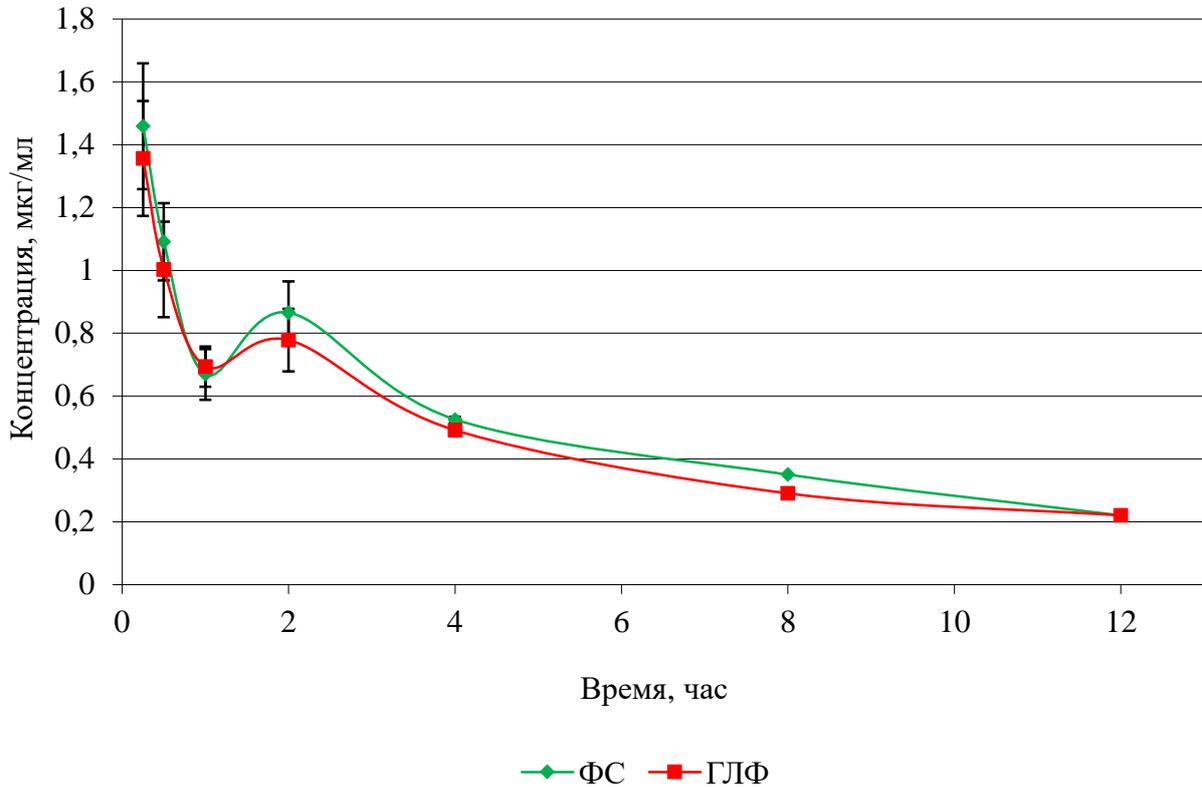


Рисунок 5.15. Содержание соединения RU-891 в крови кроликов после введения ГЛФ RU-891 по сравнению с субстанцией соединения RU-891 после внутрижелудочного введения в дозе 23 мг/кг. Примечание: ФС - субстанция соединения RU-891, ГЛФ - готовая лекарственная форма

Таблица 5.13.

Фармакокинетические параметры при внутрижелудочном введении соединения RU-891 и ГЛФ RU-891 кроликам в дозе 23 мг/кг ($M \pm SEM$)

Тестируемый образец	Фармакокинетические параметры				
	AUC, мкг/мл/час	$T_{1/2}$, час	MRT, час	cl, л/час/кг	V_d , л/кг
RU-891	5,06±0,16	2,59±0,27	2,67±0,12	4,55±0,15	17,07±2,21
ГЛФ RU-891	4,72±0,15	2,6±0,31	2,66±0,14	4,87±0,15	18,28±2,21
Относительная биодоступность					93,38

5.2.3. Заключение

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

5.2. Антитромбогенные свойства соединения RU-891

Многие осложнения сердечно-сосудистых заболеваний связаны с формированием тромбоэмболических осложнений: кардиоэмболические инсульты и системные эмболии при фибрилляции предсердий и у пациентов с искусственными клапанами сердца, тромбозы глубоких вен и тромбоз эмболия легочной артерии. Основной причиной таких осложнений являются нарушения в состоянии свертывания крови с формированием внутрисосудистых тромбозов [Вавилова Т.В., 2020]. Сохраняющийся высокий риск тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний является основанием для поиска высокоэффективных антитромбоцитарных средств [Бойцов С.А., 2021]. В связи с этим было проведено исследование антитромбогенных свойств соединения RU-891.

5.3.1. Антитромботическая активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) и электрическим током

При обработке сонных артерий крыс раствором хлористого железа (III) происходит образование тромба, показателем которого является время полной окклюзии сосуда, что приводит к остановке кровотока [Pan N., 2022].

На первом этапе была изучена антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутрижелудочном введении крысам в дозах ED₅₀, полученных при изучении антиагрегантной активности в опытах *in vivo*, которые составили 23,0; 72,3 и 9,0 мг/кг соответственно.

Среднее время окклюзии сонной артерии в контрольной группе животных, которым вводилась вода очищенная, составило 17,5 мин. (таблица 5.14). При введении животным исследуемых веществ, происходило увеличение данного показателя. Так, в дозе 23,0 мг/кг соединение RU-891 достоверно пролонгировало время образования тромба до 25,9 мин., что на 47,8% больше значений, полученных в контроле. Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 34,4 мг/кг и клопидогрел в дозе 9,0 мг/кг увеличивали время наступления полной окклюзии сосуда на 33,6 и 6,3%, соответственно (таблица 5.14).

На втором этапе дозы соединения RU-891 и препаратов сравнения были уменьшены или увеличены в зависимости от проявленного эффекта. При исследовании антитромботической активности соединения RU-891 в дозе 46,0 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение времени наступления полной окклюзии сонной артерии крыс до 32,3 мин., что на 84,7% больше значений, полученных в контроле, а в дозе 11,5 мг/кг время образования тромба пролонгировалось на 17%. ED₅₀ антитромботической активности соединения RU-891 при этом составила 26,8 мг/кг (таблица 5.14).

Таблица 5.14.

Антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Исследуемое вещество	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль	-	17,5±0,5	-	-
2.	RU-891	46,0	32,3±0,7*	84,8±3,9*	26,8
		23,0	25,9±0,7*	48,1±3,8*	
		11,5	20,5±0,4*	17,1±2,4*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	68,8	29,3±1,0*	67,6±5,7*	51,0
		34,4	23,4±0,7*	33,8±4,1*	
		17,2	20,4±0,5*	16,7±2,9*	
4.	Клопидогрел	9,0	18,5±0,5	5,7±3,1	127,5
		45,0	19,7±0,7	12,4±3,8	
		90,0	23,7±0,6*	35,2±3,2*	
		135,0	27,0±0,5*	54,3±3,0*	

Примечание:

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

При увеличении дозы ацетилсалициловой кислоты в два раза до 68,8 мг/кг время полной окклюзии сосуда увеличивалось на 67,3%, а при уменьшении в два раза до 17,2 мг/кг на 16,3%. ED₅₀ антитромботической активности ацетилсалициловой кислоты была равна 51,0 мг/кг (таблица 5.14).

Препарат сравнения клопидогрел проявил низкую антитромботическую активность в дозе ED₅₀, поэтому в дальнейшем он был исследован в дозах 45; 90 и 135 мг/кг, в результате чего увеличивалось время образования тромба до 19,7; 23,7 и 27,0 мин., соответственно. При этом ED₅₀ антитромботической активности клопидогрела составила 127,5 мг/кг (таблица 5.14).

Таким образом, изученное соединение и препараты сравнения по выраженности антитромботической активности с учетом ED₅₀ можно расположить в следующем порядке: RU-891 > ацетилсалициловая кислота > клопидогрел. При этом по показателю данного вида активности соединение RU-891 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 4 раза, а клопидогрел – в 4,8 раза.

На втором этапе была изучена антитромботическая активность готовой лекарственной формы соединения RU-891. Контрольные значения времени образования тромбов составили 18,7 минут. При однократном внутрижелудочном введении ГЛФ RU-891 в дозе 26,8 мг/кг происходило увеличение времени наступления полной окклюзии сонной артерии крыс до 29,7 минут (таблица 5.15), что на 58,6 % превосходило значения, полученные в контроле. Следовательно, ГЛФ RU-891 также проявила высокую антитромботическую активность на описанной модели артериального тромбоза.

Таблица 5.15.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин.	% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль		18,7±0,3	

2.	ГЛФ RU-891	26,8	29,7±0,6*	58,6±3,0*
3.	Ацетилсалициловая кислота	51,0	27,9±0,5*	49,3±2,8*
4.	Клопидогрел	127,5	29,2±0,6*	56,0±3,2*

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

В отличие от чистой субстанции ГЛФ RU-891 на данной модели артериального тромбоза оказывала более выраженное антиромботическое действие, пролонгируя время образования тромба на 58,6%.

Инициация процессов тромбообразования раствором хлорида железа (III) приводит к окислительному повреждению эндотелия сосудов (реакция Хабера-Вейса). Другая модель тромбоза сонной артерии-электрическим током-связана с ключевой ролью активации тромбоцитарного звена гемостаза в начальных механизмах его развития [Спасов А.А., 2016].

При воздействии электрического тока на сонную артерию контрольной группы животных, которым вводилась вода очищенная, среднее время окклюзии сонной артерии составило 16,0 мин. Введение RU-891 и препаратов сравнения в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности однократно внутривенно за два часа до воздействия тромботического агента в различной степени предупреждало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс. Так, в дозе 23 мг/кг соединение RU-891 статистически значимо пролонгировало время образования тромба до 31,7 мин, что на 97,9% больше значений полученных в группе контрольных животных. Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел в дозах 72,0 и 9,0 мг/кг также увеличивали время наступления полной окклюзии сонной артерии на 25,3 и 23,2% соответственно (таблица 5.16).

При дальнейшем исследовании для расчета ED₅₀ антиромботической активности дозы RU-891 и препаратов сравнения были уменьшены или увеличены в зависимости от эффекта, проявленного в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности.

Соединение RU-891 при снижении дозы в два раза - 11,5 мг/кг увеличивало время образования тромба до 26,3 мин., что на 64,6% больше контрольных значений. Дальнейшее уменьшение дозы до 5,5 мг/кг увеличивало время образования тромба по сравнению со значениями, полученными в контрольной группе животных на 17,7%. ED₅₀ антиромботической активности соединения RU-891 на данной модели тромбоза при этом составила 11,0 мг/кг (таблица 5.16).

Ацетилсалициловая кислота при увеличении дозы до 68,8 мг/кг пролонгировала время наступления полной окклюзии сонной артерии до 27,7 мин., что на 72,9 % превосходит значение данного показателя в группе контроля. При уменьшении дозы до 17,2 мг/кг исследуемый

препарат увеличивал время образования тромба на 20,8%. ED₅₀ антитромботической активности ацетилсалициловой кислоты была равна 39,4 (таблица 5.16).

Клопидогрел также, как и предыдущие вещества оказывал дозозависимое антитромботическое действие. Так в дозах 18,0 и 4,5 мг/кг время наступления окклюзии сонной артерии увеличивалось по сравнению с контрольными значениями на 63,5 и 27,1%. В результате ED₅₀ клопидогрела составила 12,4 мг/кг.

Таблица 5.16.

Антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль	-	16,0±0,3		-
2.	RU-891	23,0	31,7 ±0,5*	97,9±3,1	11,0
		11,5	26,3±0,4*	64,6±2,6	
		5,5	18,8±0,3*	17,7±1,9	
3.	Ацетилсалициловая кислота	68,8	27,7±0,4*	72,9±2,6	39,4
		34,4	25,3±0,3*	58,3±2,1	
		17,2	19,3±0,7*	20,8±4,5	
4.	Клопидогрел	18,0	26,2±0,5*	63,5±3,0	12,4
		9,0	23,2±0,6*	44,8±3,8	
		4,5	20,3±0,7*	27,1±4,2	

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

Таким образом, по антитромботической активности на модели данного артериального тромбоза, при однократном внутривенном введении соединение RU-891 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 7,2 раза и было сравнимо с клопидогрелем.

На втором этапе исследования была изучена антитромботическая активность ГЛФ RU-891. В контрольной группе животных, которым вводился растворитель, среднее время окклюзии сонной артерии составило 14,6 мин. Введение ГЛФ RU-891 в терапевтической дозе 23,0 мг/кг

однократно внутривенно за два часа до воздействия тромботического агента предупреждало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс. При этом тестируемая готовая лекарственная форма RU-891 статистически значимо пролонгировала время образования тромба до 27,0 мин, что на 85,0% больше значений полученных в группе контрольных животных (таблица 5.17).

Таблица 5.17.

Антитромботическая активность ГЛФ RU-891 на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутривенном введении ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время полной окклюзии	$\Delta\%$ увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Контроль	-	14,6 \pm 0,2	-
2.	ГЛФ RU-891	23,0	27,0 \pm 0,2*	85,0 \pm 5,6*
3.	RU-891	23,0	31,7 \pm 0,5*	97,9 \pm 3,1*

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

В результате изучения влияния соединения RU-891 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), установлена его высокая антитромботическая активность при однократном внутривенном способе введения, превосходящая таковую препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Полученные данные, проявления выраженных антитромботических свойств у изученной субстанции подтверждают, что в основе его механизма действия лежит угнетение процессов агрегации тромбоцитов. Это подтверждает также факт, что воспроизведенные в эксперименте модели артериальных тромбозов являются тромбоцит-зависимыми, так как в их инициации ключевую роль играют именно тромбоциты.

ГЛФ RU-891 при исследовании специфической фармакологической активности на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, продемонстрировала высокую антитромботическую активность, пролонгируя время полной окклюзии сосуда на 85,0%.

5.3.2. Влияние на выживаемость мышей в условиях генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза

В результате проведенных экспериментов в группе контрольных животных наблюдалась гибель 100% мышей, что соответствует результатам, полученным другими исследователями [Guarneri L., 1988; Furie B., 2006]. При этом были отмечены характерные признаки нарушения дыхательной функции легких: наблюдалось увеличение частоты и поверхностный характер дыхания, выраженный экзофтальм и изменение цвета радужной оболочки глаз. Также наблюдался парез задних конечностей: мыши не двигались даже в ответ на толчки, не были способны отдергивать задние лапы при сильном нажатии. Визуально наблюдались тетанические судороги, животные принимали характерную позу, при которой задние лапы были выпрямлены и отведены назад. В течение 1-2 минут после введения тромботических агентов животные погибали. Данные исследований антитромботической активности тестируемых образцов при внутрижелудочном введении мышам представлены в таблице 5.18.

Соединение RU-891 в дозе 23 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении предотвращала гибель 80% животных по сравнению со 100% гибелью в контрольной группе. Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 34,4 мг/кг увеличивала количество выживших животных до 40%, а клопидогрел – до 50% (таблица 5.18). Однако исследованные препараты сравнения уступали по способности предотвращать гибель животных на данной модели артериального тромбоза соединению RU-891 в 2 и 1,6 раза, соответственно. Часть животных, которые погибали на фоне введения тестируемых образцов, при визуальном наблюдении после поступления в их организм тромботических агентов, были более активны, чем животные контрольной группы. У них наблюдалось уменьшение выраженности двигательных нарушений, при этом внешние проявления генерализованного тромбоза развивались постепенно (в течение 3-5 минут) в отличие от контрольной группы (1-2 минуты).

Таблица 5.18.

Влияние соединения RU-891, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутрижелудочном введении в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности в опытах *in vivo* на выживаемость белых беспородных мышей на модели коллаген (0,5 мг/кг) - адреналинового (0,06 мг/кг) тромбоза у мышей

N п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Число тестируемых животных	Число погибших животных	Выжившие животные, %
1.	Контроль		20	20	0
2.	RU-891	23,0	10	2	80*
3.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	10	6	40*
4.	Клопидогрел	9,0	10	5	50*

*($p < 0,05$) различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных, критерий Фишера.

При макроскопическом обследовании тканей легких выявлены кровоизлияния очагового и сливного характера. Преобладали альвеолы средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, адгезированные к сосудистой стенке и расположенные в просвете сосуда. Определялось выраженное расширение тромбированных капилляров межальвеолярных перегородок. Отмечались очаговые повреждения сосудистой стенки капилляров и респираторного эпителия. В венах и венулах обнаруживались красные тромбы, а в отдельных артериолах – тромбы (рисунок 5.16).

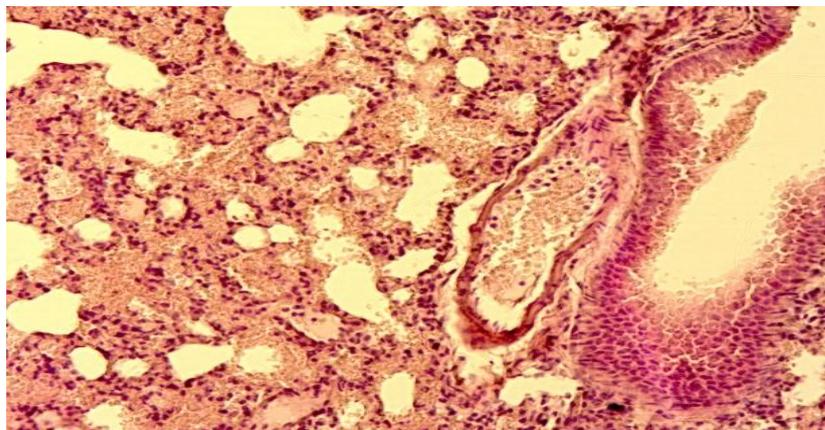


Рисунок 5.16. Тромбообразование в срезах гистологических образцов легких мышей контрольной группы при однократном внутрижелудочном введении физ. раствора, вызванное введением смеси коллагена и адреналина (Тромбы с адгезией к сосудистой стенке и обтурацией просвета сосудов). Окраска гематоксилином и эозином об.х10

При проведении морфометрического исследования срезов легких контрольных животных выявлено, что средняя площадь тромба на срезах составила 626888,75 мкм² (таблица 5.19).

У мышей, получавших однократно внутрижелудочно препарат сравнения 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 (рисунок 5.17).

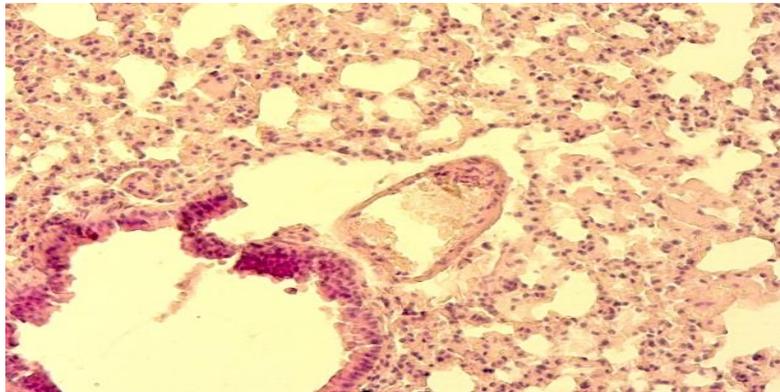


Рисунок 5.17. Тромбообразование в срезах гистологических образцов легких мышей при однократном внутрижелудочном введении ацетилсалициловой кислоты на модели адреналин-коллагенового тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином об.х10

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, выявлено, что средняя площадь тромба составила 235103,01 мкм², т.е. была ниже на 62,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица 5.19).

При исследовании легких мышей, получавших клопидогрел, встречались полнокровные сосуды с периваскулярным отеком, визуализировались единичные тромбы в венах, как правило, адгезированные к сосудистой стенке. Кровоизлияния отсутствовали. Выявлялись небольшие единичные тромбы, с частичной обтурацией просвета сосуда. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека (рисунок 5.18).

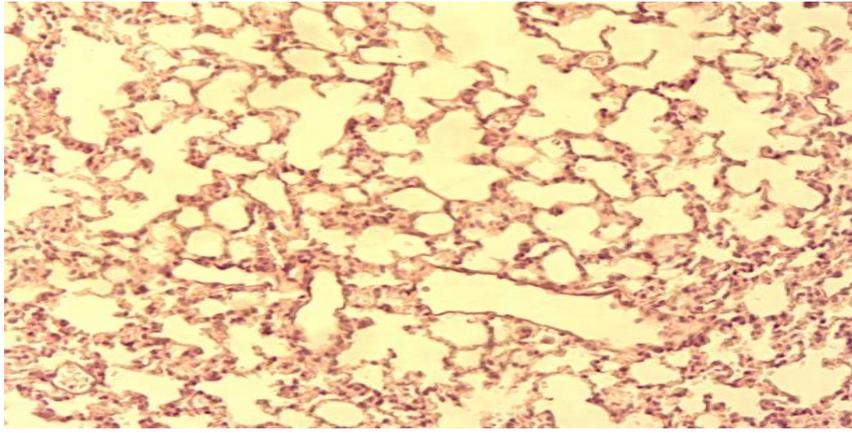


Рисунок 5.18. Тромбообразование в срезах гистологических образцов легких мышей при однократном внутривенном введении клопидогрела на модели адреналин-коллагенового тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином об.х10

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших клопидогрел, выявлено, что средняя площадь тромба на срезах составила $179710,19 \text{ мкм}^2$, т.е. была ниже на 71,3% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (таблица 5.19).

У животных, получавших соединение RU-891, встречались полнокровные сосуды с периваскулярным отеком. В легких мышей преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Обнаруживалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия и отека, явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки, в просвет некоторых альвеол, явления стаза и очаговые мелкие кровоизлияния. Выявлялась единичные тромбы в венах и венулах (рисунок 5.19).

При проведении морфометрического исследования срезов легких животных, получавших соединение RU-891, выявлено, что средняя площадь тромба на срезах снижалась на 81,6% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем и составила $115375,82 \text{ мкм}^2$ (таблица 5.19).

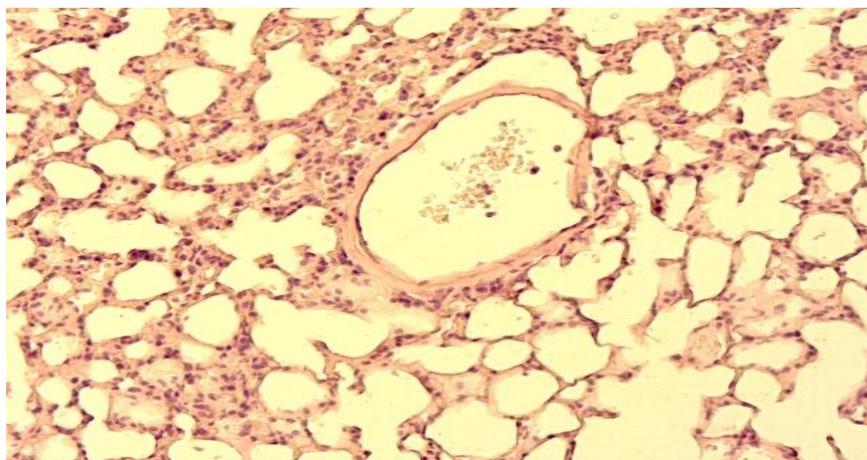


Рисунок 5.19. Тромбообразование в срезах гистологических образцов легких мышей при однократном внутрижелудочном введении RU-891 на модели адреналин-коллагенового тромбоза. Окраска гематоксилином и эозином об.х10

Таблица 5.19.

Влияние соединения RU-891 и препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на морфометрические параметры тромбов в сосудах легких мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза (M±m)

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

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

В результате изучения влияния соединения RU-891 на процессы тромбообразования, вызванные повреждением стенки артерий введением тромботических агентов (генерализованный адреналин-коллагеновый тромбоз), установлена его высокая способность предотвращать гибель животных в эксперименте при однократном внутрижелудочном введении, превосходящая ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2 и 1,6 раза соответственно. В инициации данной модели тромбоза ключевую роль играют именно тромбоциты. Следовательно, полученные данные подтверждают, что способность соединения RU-891 предотвращать тромбообразование связана с угнетением процесса агрегации тромбоцитов.

Данные морфологического исследования легких мышей при однократном внутрижелудочном введении соединения RU-891 на модели системного адреналин-коллагенового тромбоза также подтверждают способность данной субстанции предотвращать возникновение артериальных тромбозов. Так, соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении снижает среднюю площадь тромбов на срезе легкого в 5,4 раза по отношению к контролю и превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения - ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел.

5.3.3. Антитромбогенное действие на модели тромбоза нижней полой вены

В проведенных исследованиях по изучению антитромбогенной активности соединения RU-891 при однократном внутривенном введении была показана высокая активность данного вещества на различных моделях артериальных тромбозов. Однако, проблема тромбообразования затрагивает и венозную систему. Поэтому, представилось целесообразным исследовать данную активность соединения RU-891 на модели тромбоза нижней полой вены крыс. Исследование антитромботической активности соединения RU-891 на модели венозного тромбоза показало, что исследуемое вещество способно предотвращать венозные тромбозы.

В группе контрольных животных после перевязки нижней полой вены через сутки наблюдалось образование тромбов, средняя масса которых составила 99,9 мг. В опытной группе животных, которым вводилось соединение RU-891 средняя масса тромбов, была статистически значимо ниже относительно значений, полученных в контроле в 3,6 раза.

Средняя масса тромбов, изъятых из вен животных, получавших ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел, также была статистически значимо меньше контрольных значений в 1,5 и 1,7 раза, соответственно (таблица 5.20). Следовательно, соединение RU-891 при однократном внутривенном введении животным в терапевтической дозе проявило высокую антитромботическую активность и достоверно превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,4 и 2,1 раза, соответственно.

Таблица 5.20.

Антитромботическая активность соединения RU-891 и препаратов сравнения при однократном внутривенном введении крысам на модели тромбоза нижней полой вены крыс в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Масса тромба, мг
1	Ложно-оперированные крысы	-	0
2	Контрольная группа	-	99,9±7,8
3	RU-891	23,0	27,2±9,5* [#]
4	Ацетилсалициловая кислота	34,4	65,4±3,9*
5	Клопидогрел	9,0	58,7±1,4*

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

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

В результате была установлена высокая антитромботическая активность исследуемого вещества в терапевтической дозе на модели венозного тромбоза при однократном внутрижелудочном способе введения. Соединение RU-891 уменьшает среднюю массу венозных тромбов в 3,6 раза по сравнению со значениями, полученными в контроле и при этом, значимо превосходит по антитромботической активности препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,4 и 2,2 раза соответственно.

Таким образом, соединение RU-891 предотвращает патологические процессы, связанные не только с тромбообразованием в артериях, но и в нижней полой вене.

5.3.4. Антитромботическая активность в условиях экспериментального инфаркта миокарда

При обработке артерий крыс раствором хлористого железа (III) происходит образование тромба, показателем которого является время полной окклюзии сосуда, что приводит к остановке кровотока [Palomo I., 2008].

В группе интактных животных время наступления полной окклюзии сосуда составило 18,2 минуты, что соответствует данным, полученным другими исследователями [Randal J., 2007] (таблица 5.21). В группе животных с экспериментальным инфарктом миокарда, время образования тромба достоверно сокращалось до 14,3 мин., что свидетельствует о значительном увеличении тромбогенного потенциала крови при формировании данной патологии.

Соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда статистически значимо пролонгировало время наступления полной окклюзии сонной артерии до 21,2 мин., что на 48,0 % больше, чем в группе контрольных животных с данной патологией (таблица 5.21).

Таблица 5.21.

Антитромботическая активность соединения RU-891 препаратов сравнения при однократном внутрижелудочном введении на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором хлорида железа (III) в условиях экспериментального инфаркта миокарда ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	$\Delta\%$ пролонгирования времени образования тромба
1.	Контроль		18,2±0,6	
2.	Контроль (инфаркт)		14,3±0,7 [#]	
3.	RU-891	23,0	21,2±0,8 ^{*&}	48,0±5,5 ^{*&}
4.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	17,5±0,6 [*]	22,4±3,9 [*]
5.	Клопидогрел	9,0	20,7±0,9 [*]	44,5±6,2 [*]

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

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

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

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

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

В условиях экспериментального инфаркта миокарда, когда резко возрастает тромbogenный потенциал крови, антитромботическая активность соединения RU-891 была идентична активности на животных без сопутствующей патологии.

ГЛФ RU-891 при однократном внутривенном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда достоверно пролонгировала время наступления полной окклюзии сонной артерии до 21,7 мин., что на 60,5% больше, чем в группе контрольных животных с данной патологией (таблица 5.22).

Таблица 4.22.

Антиромботическая активность ГЛФ RU-891 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50 %-ным раствором хлорида железа (III) в условиях экспериментального инфаркта миокарда (M±SEM) (n=6)

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

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

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

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

При исследовании антиромботической активности ГЛФ RU-891 в условиях инфаркта миокарда было показано, что в контрольной группе животных с экспериментальной патологией полная окклюзия сонной артерии, вызванная повреждением тромботическим агентом - раствором хлоридом железа (III) - наступала статистически значимо быстрее, чем в группе крыс

без сопутствующей патологии. Это свидетельствует о повышенном тромбогенном потенциале крови у животных с экспериментальным инфарктом миокарда. ГЛФ RU-891 в условиях патологии продемонстрировала высокую антитромботическую активность при однократном внутривенном введении статистически не значимо превосходя активность чистой субстанции RU-891 в 1,3 раза в аналогичных условиях эксперимента.

5.3. Оценка влияния соединения RU-891 на систему гемостаза методом тромбоэластографии

Тромбоэластография - интегративный метод оценки состояния системы гемостаза, широко используемый в практике для оценки и коррекции антиагрегантной и антикоагулянтной терапии, а также с целью экстренной диагностики возможных кровотечений, дефицитов тромбоцитарного и/или плазменного звена гемостаза. Соединение RU-891 при однократном внутривенном введении в дозе 23 мг/кг вызывало следующие изменения показателей тромбоэластограммы (таблица 5.23):

-показатель R, означающий время от начала постановки пробы до образования первых нитей фибрина (момент от начала записи до расхождения краев ТЭГ на 1 мм) увеличивался на 46,6%, однако время от начала образования первых нитей фибрина до достижения сгустком амплитуды 20 мм (K) под влиянием соединения RU-891 увеличивалось. Угол касательной к кривой тромбоэластограммы (Ag), показывающий скорость образования фибрина и его функциональное состояние достоверно уменьшался относительно контрольной группы животных на 37,7%. Также достоверно на 21% снижалась максимальная амплитуда (MA), характеризующая функциональную активность тромбоцитов. Мера прочности (G) и эластичности (E) сгустка под влиянием RU-891 уменьшались на 69,1 и 28,0 %, соответственно.

Под влиянием препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела изменения всех вышеуказанных параметров не были статистически значимыми за исключением максимальной амплитуды, которая снижалась на 17,1 и 19,7%, соответственно, что подтверждает антиагрегантную активность данных лекарственных средств (таблица 5.23).

При проведении записи тромбоэластограммы в экспериментальных группах после достижения максимальной амплитуды через 30 минут не наблюдалось лизиса сгустка, что свидетельствует об отсутствии у тестируемых образцов фибринолитических свойств (таблица 5.23).

Таблица 5.23.

Влияние соединения RU-891, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутривенном введении на параметры тромбоэластограммы крыс (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	R (мин)	K (мин)	Ag (град.)	MA (мм)	G	E	LY (%)
1	Контроль	-	6,3±0,6	1,6±0,3	66,7±3,6	76,1±2,8	16,5±2,1	72,4±3,3	2,7±0,2
2	RU-891	23,0	11,8±2,9*#	3,5±0,8*	41,6±5,2*#@	60,1±1,4*	5,1±1,8*	36,0±7,9*#	2,8±0,7
3	Ацетилсалициловая кислота	34,4	5,1±0,5	2,4±0,3	62,6±3,2	63,1±2,8*	9,0±1,1*	62,4±3,0	4,4±1,9
4	Клопидогрел	9,0	8,3±1,5	3,0±0,4*	57,9±1,9*	61,1±1,8*	8,6±0,9*	53,5±7,8	2,8±0,9

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

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

@- различия статистически значимы относительно клопидогрела, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

В результате исследования влияния соединения RU-891 на показатели тромбоэластограммы было выявлено, что тестируемая субстанция и препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел статистически значимо относительно контрольных значений снижали показатель максимальной амплитуды, характеризующий функциональную активность тромбоцитов, что подтверждает наличие у них антиагрегантной активности. При этом вещество RU-891 превосходило по активности препараты сравнения. Также, с антиагрегантным эффектом соединения RU-891 связано уменьшение значения меры прочности и эластичности сгустка. При этом тестируемая субстанция по влиянию на прочность сгустка недостоверно превосходила препараты сравнения, а по действию на показатель эластичности сгустка превышала ацетилсалициловую кислоту и статистически не значимо – препарат сравнения клопидогрел.

Также соединение RU-891 угнетало процессы образования тромбина и фибрина, так как увеличивало время от начала постановки пробы до образования первых нитей фибрина. Об этом также свидетельствует уменьшение угла касательной к кривой тромбоэластограммы под влиянием тестируемой субстанции, которое свидетельствует о снижении скорости образования сгустка.

Сопоставив результаты проведенных исследований можно отметить, что RU-891 оказывает влияние на свертываемость крови при этом, действуя не только на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, но и на вторую фазу гемостаза, что проявляется угнетением процессов образования тромбина и формированием кровяного сгустка. Вместе с тем препараты сравнения не оказывали влияния на гипокоагуляционное звено гемостаза. Конечным этапом в данном исследовании была оценка влияния на систему фибринолиза, которая позволила заключить, что исследуемое соединение и препараты сравнения не обладают фибринолитическими свойствами.

5.4. Влияние соединения RU-891 на время кровотечения

Антитромбоцитарная терапия связана с высоким риском развития кровотечений. В связи с этим необходимо было провести оценку влияния исследуемого соединения на данный показатель. Результаты исследований по изучению влияния вещества RU-891 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на удлинение времени кровотечения при однократном внутривенном введении представлены в таблице 5.24.

Контрольное значение времени кровотечения из хвостовой вены мышей составило 161,7 секунд. Соединение RU-891 в дозе 23 мг/кг достоверно пролонгировало время кровотечения на

65,9% по сравнению с контрольными значениями. Время кровотечения из хвостовой вены под влиянием данной субстанции составило 268,3 секунды.

Таблица 5.24.

Влияние соединения RU-891 и препаратов сравнения на удлинение времени кровотечения из хвостовой вены мышей при однократном внутривенном введении в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vivo* (M±SEM) (n=10)

Вещество	Доза, мг/кг	Время кровотечения, с	Δ% пролонгирования времени кровотечения
Контроль		161,7±24,6	
RU-891	23,0	268,3 ±16,3 ^{#*}	65,9±10,1
Ацетилсалициловая кислота	34,4	303,9±25,8 ^{#*}	87,9±16,0
Клопидогрел	9,0	511,0±67,1 [*]	216,0±41,5

*- различия статистически значимы по отношению к контролю (one-way ANOVA с поправкой Бонферрони, p<0,0001)

#- различия статистически значимы по отношению к препарату сравнения клопидогрел (one-way ANOVA с поправкой Бонферрони, p<0,0001)

Примечание: n-число животных в группе

Ацетилсалициловая кислота в дозе 34,4 мг/кг также статистически значимо удлиняла время кровотечения относительно данного показателя, полученного в контроле на 87,9%. Другой препарат сравнения клопидогрел в дозе 9,0 мг/кг пролонгировал время кровотечения на 216,0 %.

Таким образом, изученные вещества по влиянию на продолжительность кровотечения из хвостовой вены мыши можно расположить в следующем порядке: клопидогрел > ацетилсалициловая кислота > соединение RU-891.

При изучении влияния соединения RU-891 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей при однократном внутривенном введении, наблюдалось удлинение данного показателя при введении всех веществ, что в принципе подтверждает наличие у них антиагрегантной активности. Однако, по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелем, время кровотечения под влиянием образца RU-891 пролонгировалось в меньшей степени, что позволяет предположить в будущем наличие у него слабовыраженных побочных эффектов в виде кровотечений.

5.5. Хроническая токсичность соединения RU-891

Исследование хронической токсичности⁴ активной субстанции RU-891 проведено в рамках государственного контракта № 14.N08.12.0160 от «2» июня 2017 г. при 6-ти месячном внутрижелудочном введении крысам обоего пола в дозах: 23 мг/кг (экспериментально доказанная терапевтическая доза), 230 мг/кг (10-ти кратная терапевтическая доза) и 460 мг/кг (20-ти кратная терапевтическая доза).

Установлено отсутствие патологических изменений в органах и системах крыс, получавших 6-ти месячным курсом RU-891 в дозах 23 мг/кг, 230 мг/кг и наличие повреждающего влияния указанной субстанции на функции печени и почек при курсовом введении в дозе 460 мг/кг.

В дозах 23 и 230 мг/кг тестируемая субстанция не оказывала влияние на поведенческую активность, электрокардиограмму, периферическую кровь и детоксицирующие функции печени и почек, поскольку дозозависимые изменения, зафиксированные на 3-й и 6-й месяцы эксперимента у этих животных, не выходили за рамки физиологической нормы и были обратимы через месяц после отмены введения исследуемой субстанции. У животных, получавших соединение RU-891 в дозе 460 мг/кг, были зафиксированы изменения со стороны периферической крови, а также детоксицирующей функции печени и почек, которые частично были обратимы в исследованиях после отмены введения данной субстанции.

В проведенных исследованиях выявлено, что общее состояние и поведение животных, получавших 6-ти месячным курсом соединение RU-891 в дозах 23 мг/кг, 230 мг/кг и 460 мг/кг (1-я, 2-я и 3-я опытные группы, соответственно) существенно не изменялось относительно группы контрольных животных. Вместе с тем, тенденции негативных изменений, были зафиксированы у крыс в 3-й опытной группе, у которых на 4-5 месяцы хронического эксперимента снижалась подвижность, угнетались реакции на внешние раздражители, ухудшалось состояние шерстного покрова (становился тусклым, неопрятным). Данные эффекты были обратимы и практически нивелированы до состояния контрольных животных в период отмены введения RU-891. Отмечено, что динамика изменений массы тела была положительной во все периоды хронического эксперимента, однако, при этом относительно контроля были обнаружены половые различия в темпах прироста массы тела. Так у самцов наблюдалась тенденция к повышению прироста массы тела, а у самок - тенденция снижения в 1-й и 2-й опытных группах и увеличение в 3-й опытной группе прироста массы тела относительно контрольных значений.

⁴ проведены с помощью сотрудников лаборатории токсикологии НЦИЛС ВолгГМУ под руководством д.б.н. Л.И. Бугаевой

Выявленные тенденции у животных в 1-й и 2-й опытных группах были обратимы и практически нивелировались до контрольных значений в период отмены введения соединения RU-891. Тенденции незначительного прироста массы тела у крыс 3-й опытной группы сохранялись и через месяц после отмены введения соединения RU-891.

По результатам тестирования в «открытом поле», у крыс в опытных группах установлено отсутствие негативного влияния исследуемой субстанции на поведенческую активность животных.

В серии специфических исследований установлено, отсутствие влияния RU-891 на электрокардиограмму животных, системное артериальное давление, частоту дыхания и ректальную температуру. По результатам функциональных исследований установлено отсутствие влияния на детоксицирующую и поглотительно-выделительную функции печени. Зафиксированное по окончании 6-ти месячного хронического эксперимента в тесте «гексеналовый сон» увеличение длительности наркотического сна у крыс самок и самцов во всех опытных группах полностью нивелировалось до значений контрольных величин через месяц после отмены введения животным тестируемой субстанции.

В нагрузочных пробах с бромсульфалеином установлено отсутствие существенного влияния соединения RU-891 на поглотительно - выделительную функцию у крыс 1-й и 2-й опытных групп. Однако в 3-й опытной группе животных, получавших 460 мг/кг RU-891, отмечены эффекты угнетающего влияния данной на данный параметр, которые несколько восстанавливались через месяц после отмены тестируемой субстанции.

В нагрузочном тесте с феноловым красителем у крыс 1-й и 2-й опытных групп не прослеживалось статистически значимых изменений. При этом у них повышалась выделение красителя с мочой, что свидетельствовало о снижении реабсорбции. Данные эффекты были нивелированы после отмены введения субстанции крысам. У крыс, получавших соединение RU-891 в дозе 460 мг/кг (3-я опытная группа), способность выведения красителя почками была выше контрольных показателей (более выражено у самцов) как на период окончания 6-ти месячного эксперимента, так и через месяц после отмены введения.

При выполнении гематологических исследований в периферической крови не обнаружено изменений, выходящих за рамки физиологической нормы. При этом в красной крови животных опытных групп выявлялась тенденция повышения общего количества эритроцитов, без существенных изменений в количестве гемоглобина и, в связи с этим- незначительное снижение цветного показателя эритроцитов, которое наиболее отчетливо проявлялось у животных во 2-й и 3-й группах. После отмены соединения RU-891 изменения нивелировались до контрольных значений.

При проведении биохимических исследований крови не отмечено статистически значимых изменений со стороны показателей плазмы крови и мочи. Все регистрируемые параметры у животных опытных групп обоего пола не выходили за рамки референсных значений [Vestrick R.J., 2007].

По результатам некропсии крыс, проведенной по окончании 6-ти месячного курса введения соединения RU-891 в дозах 23 мг/кг; 230 и 460 мг/кг, а также через месяц после отмены введения, не зарегистрировано каких-либо патологических изменений в архитектонике расположения внутренних органов и их окрасе. В 3-й опытной группе, получавшей RU-891 в дозе 460 мг/кг, выявлялось лишь незначительное увеличение печени (коэффициенты массы у самцов повышались на 12,5%, а у самок - на 10,5% ($p < 0,05$) и наличие сглаженности ее краев. Со стороны почек у животных 1-й и 2-й опытных групп изменений относительно группы контроля выявлено не было. Однако у крыс, получавших RU-891 в дозе 430 мг/кг (3-я опытная группа), отмечалось изменение их окраски до бледного коричнево-оливкового цвета, без существенных изменений размеров и коэффициентов масс.

При выполнении гистологических исследований препаратов выделенных органов не обнаружено патологических изменений в легких, тимусе, сердце, отделах ЖКТ, селезенке, половых органах. Прослеживалось лишь увеличение кровенаполнения сосудов исследуемых органов. Обратимые изменения 3-й опытной группы были выявлены в структурах головного мозга, печени и почках. Эти изменения в головном мозге проявлялись полнокровием сосудов без признаков отека, в печени – наличие слабовыраженных дистрофических изменений, а в почках – полнокровие сосудов, набухание эпителия дистальных канальцев и скопление в них жидкости.

На основании проведенных исследований и патоморфологического анализа состояния внутренних органов сделано заключение об отсутствии патологического влияния соединения RU-891 в дозах 23 мг/кг и 230 мг/кг на основные гомеостатические структуры крыс при 6-ти месячном внутрижелудочном введении. В дозе 460 мг/кг также не обнаружено патологического влияния на основные функции органов и систем, вместе с тем изменения, зафиксированные с помощью функциональных исследований и патоморфологического анализа могут свидетельствовать о возможном наличии повреждающего влияния на печень и почки, как на «органы-мишени».

Из проведенных исследований следует вывод, что в токсикологическом плане соединение RU-891 при 6-ти месячном внутрижелудочном введении крысам в дозах 23 мг/кг и 230 мг/кг является безопасным. С другой стороны, в дозе 460 мг/кг соединение при 6-ти месячном внутрижелудочном введении крысам проявляет незначительное токсическое действие, которое полностью нивелируется после отмены тестируемой субстанции.

ГЛФ RU-891 вводили кроликам внутривенно в дозах: 11 мг/кг (экспериментально доказанная терапевтическая доза, пересчитанная с крысы на кроликов); 110 мг/кг (промежуточная доза) и 220 мг/кг (высшая доза, превышающая терапевтическую в 20 раз) посредством атравматического металлического зонда в течение 6-ти месяцев. В хроническом эксперименте следили за общим состоянием животных, приростом массы тела, пищевой и питьевой активностью, проводили электрокардиографические, гематологические, биохимические и патоморфологические исследования.

В наблюдениях за животными отмечено, что общее состояние животных, получавших в течение 6-ти месяцев ГЛФ RU-891 в дозах 11 мг/кг (1-я опытная группа); 110 мг/кг (2-я опытная группа) и 220 мг/кг (3-я опытная группа) существенно не различалось с состоянием животных контрольной группы. За период 6-ти месячного хронического эксперимента и одного месяца отмены у животных не выявлялось гибели и межгрупповых различий в поведении, пищевой и питьевой активности, а также и реакций на внешние раздражители.

Установлено, что динамика изменений массы тела у кроликов 1-й и 2-й опытных групп была положительной на протяжении всего хронического эксперимента и практически не различалась с приростом массы тела контрольных животных. Прирост массы тела у кроликов 3-й опытной группы был также положительным, но при этом относительно контроля прослеживалась тенденция повышения прироста массы тела у самцов и снижение прироста массы тела – у самок. Данные эффекты были частично обратимы в течение месяца после отмены введения ГЛФ RU-891 кроликам самцам, но статистически значимый сниженный прирост массы тела на данный период также фиксировался у кроликов самок.

По результатам электрокардиографических исследований не выявлено существенного влияния ГЛФ RU-891 при 6-ти месячном введении в дозах 11 мг/кг; 110 и 220 мг/кг на параметры ЭКГ самцов и самок кроликов всех опытных групп, по отношению к контролю, что позволяет сделать заключение об отсутствии у исследуемой лекарственной формы RU-891 повреждающего влияния на физиологическую активность сердца.

При проведении гематологических исследований на 1-й; 3-й; 6-й и 7-й месяцы хронического эксперимента не обнаружено влияния соединения RU-891 в исследуемых дозах на состояние периферической крови. Так, через месяц после ежедневного введения исследуемой лекарственной формы, изменений в периферической крови кроликов опытных групп практически не было зарегистрировано, за исключением статистически незначимого повышения времени свертывания крови у животных во 2-й и 3-й опытных группах. В исследованиях, проведенных на 3-й и 6-й месяцы хронического эксперимента, у животных в опытных группах отмечалось умеренное, в пределах физиологической нормы, повышение количества эритроцитов и различные колебания уровня гемоглобина, существенно не сказавшиеся на цветном показателе

эритроцитов. На данный период, со стороны свертывающей системы у животных в опытных группах фиксировалось статистически значимое повышение времени свертывания крови, в более выраженной форме у кроликов в 3-й опытной группе, но практически без существенных изменений содержания в крови тромбоцитов. Выявленные эффекты были обратимы и не регистрировались у животных в опытных группах в исследованиях через один месяц после отмены введения ГЛФ RU-891, что свидетельствует об отсутствии патологического влияния на периферическую кровь. В последующих исследованиях по результатам биохимических исследований у кроликов в опытных группах не было обнаружено изменений относительно контроля в показателях плазмы крови и мочи. Все регистрируемые показатели, как у самцов, так и у самок всех опытных группах не выходили за рамки физиологической нормы, что может свидетельствовать об отсутствии патологического влияния испытуемого образца на основные виды обмена. Также было установлено отсутствие влияния лекарственного препарата при 6-месячном введении и в период отмены введения на частоту дыхания самцов и самок кроликов всех опытных групп.

Патоморфологическими макроскопическими исследованиями, проведенными по окончании 6-ти месячного введения ГЛФ RU-891 в дозе 11 мг/кг и через 1 месяц после его отмены, не отмечено изменений в коэффициентах масс головного мозга, сердца, тимуса, легких, селезенки, почек, надпочечников печени и гонад. Патоморфологическими исследованиями, проведенными по окончании 6-ти месячного введения ГЛФ RU-891 в дозах 110 и 220 мг/кг и через 1 месяц после его отмены, также не выявлено существенных изменений в коэффициентах масс головного мозга, сердца, тимуса, легких, селезенки, надпочечников и гонад. При этом у животных в данных опытных группах обнаруживалось дозозависимое повышение коэффициентов масс печени и почек. В исследованиях, проведенных после отмены введения ГЛФ RU-891, различия в коэффициентах массы почек и печени были полностью нивелированы с контролем у животных во 2-й опытной группе, но оставались несколько выше значений контроля у животных в 3-й опытной группе.

Микроскопическими исследованиями препаратов тканей органов животных, получавших 6-ти месячным курсом ГЛФ RU-891 в дозе 11 мг/кг и 110 мг/кг, патологических изменений не зарегистрировано, за исключением дистрофических процессов в печени и сужение канальцев проксимального и дистального отделов почек в дозе 110 мг/кг. Однако данные изменения были полностью обратимы в течение одного месяца отмены введения ГЛФ RU-891. Микроскопическими исследованиями препаратов тканей органов у животных, получавших 6-ти месячным курсом лекарственного препарата RU-891 в дозе 220 мг/кг, также не было обнаружено патологических изменений, за исключением явлений выраженной зернистой дистрофии, но без признаков некроза в печени и полнокровие сосудов, набухание эпителия проксимальных и

дистальных канальцев почек с незначительным сужением их просвета и скоплением жидкости. Выявленные изменения также фиксировались и на препаратах данных органов, исследуемых после отмены введения ГЛФ RU-891, но в значительно меньшей степени, что свидетельствует о частичной их реабилитации.

Таким образом, в плане доклинической оценки общетоксических свойств, ГЛФ RU-891 в дозах 11 мг/кг и 110 мг/кг при 6-месячном внутрижелудочном введении кроликам является не токсичной и безопасной, поскольку не вызывает необратимых изменений в общем состоянии, поведении, гематологических параметрах, биохимических показателях крови и мочи, функциональной активности сердца. Гибель животных в период введения и отмены ГЛФ RU-891 в дозе 220 мг/кг не наблюдалась.

5.6. Расчет и обоснование дозы для проведения I фазы клинических исследований

Клинические исследования — это необходимая часть процесса разработки любого нового препарата или расширения показаний для применения лекарства, уже известного врачам. Клинические исследования невозможно заменить исследованиями *in vitro* или на лабораторных животных, включая приматов. Организм лабораторных животных отличается от человеческого по фармакокинетическим характеристикам (всасывание, распределение, метаболизм и выведение лекарственного препарата), а также по реакции органов и систем на лекарство.

Расчёт дозы для человека проводился согласно Методическим рекомендациям по определению безопасной дозы лекарственного препарата для проведения I фазы клинических исследований у взрослых волонтеров [Миронов А.Н., 2012] и Общим требованиям к разработке протоколов клинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н., 2012]. Согласно этим методическим рекомендациям и руководствам, для каждого фармакологического вещества должна быть определена наибольшая доза, которая не вызывает существенных изменений в состоянии гомеостаза подопытных животных - доза без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ). По результатам изучения хронической токсичности соединения RU-891 (гидробромид 9-(3,4-дигидроксифенацил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол) на крысах дозы 23 и 230 мг/кг при ежедневном внутрижелудочном введении в течение 6 месяцев у них не оказывали влияния на основные гомеостатические параметры. По результатам изучения хронической токсичности ГЛФ RU-891 на кроликах дозы 11 и 110 мг/кг при ежедневном внутрижелудочном введении в течение 6 месяцев не оказывали влияния на основные гомеостатические параметры.

Т.е. ДБНОЭ соединения РУ-891 для крыс при внутрижелудочном введении составляет 230 мг/кг, ДБНОЭ ГЛФ РУ-891 для кроликов при внутрижелудочном введении составляет 110 мг/кг.

Эквивалентная доза для человека (ЭДЧ) в мг/кг, т.е. доза для человека, которая, с учётом площади поверхности тела, предположительно, обеспечит такой же эффект, как и наблюдаемый у крыс в той же дозе, рассчитывалась путём деления ДБНОЭ для крыс на коэффициент пересчёта (K_n) для крыс. $ЭДЧ = ДБНОЭ \text{ (для крыс)} / K_n \text{ (для крыс)} = 230 \text{ мг/кг} / 6 = 38,3 \text{ мг/кг}$. Практически тот же результат получается при другом рекомендованном способе вычисления ЭДЧ – умножении дозы для крыс на коэффициент 0,17: $ЭДЧ = 230 \text{ мг/кг} \times 0,17 = 39,1 \text{ мг/кг}$.

Исходя из пересчёта дозы с крыс на человека, в среднем округлённо получаем ЭДЧ 38,7 мг/кг.

Максимальная рекомендованная начальная доза (МРНД), т.е. наибольшая начальная доза для изучения новых потенциальных лекарственных средств в клинических исследованиях I фазы у здоровых добровольцев, вычислялась путём деления на коэффициент безопасности (КБ), равный 10, чтобы иметь запас безопасности между ЭДЧ и МРНД: $38,7 \text{ мг/кг} / 10 = 3,87 \text{ мг/кг}$. Она соответствует разовой дозе препарата при средней массе человека 70 кг и должна быть равна дозировке в таблетке, т.е. 270 мг.

Расчет МРНД при пероральном введении:

- ДБНОЭ лекарственной формы для крыс при внутрижелудочном введении по результатам токсикологических исследований составляет 230 мг/кг;
- $ЭДЧ = ДБНОЭ \text{ (крысы)} 230 \text{ мг/кг} / K_n \text{ (для крыс)} 6 = 38,7 \text{ мг/кг}$;
- $МРНД = ЭДЧ 38,3 \text{ мг/кг} / КБ 10 = 3,87 \text{ мг/кг}$;
- $МРНД \text{ (для человека 70 кг)} = 3,87 \times 70 = 270,0 \text{ мг}$.

5.7. Заключение

Проведенное исследование позволяет сделать вывод о наличии выраженной антиагрегантной и антитромботической активности у соединения РУ-891. Учитывая многостадийность процесса тромбообразования было изучено влияние соединения РУ-891 на адгезию тромбоцитов, активацию и их дегрануляцию.

При исследовании адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена было установлено, что в присутствии соединения РУ-891 данный процесс значительно не отличался от такового в

контрольных пробах, что указывает на отсутствие влияния исследуемого образца на данный процесс.

Важным этапом функциональной активности тромбоцитов является их активация (сферуляция). Этот процесс связан со стимуляцией P2Y₁ рецептора на мембране тромбоцита. В дальнейшем происходит комплекс внутриклеточных реакций, стимулирующих дегрануляцию и секрецию тромбоцитами биологически-активных веществ, в частности молекул АТФ и ионов кальция [Burnstock G., 2017]. По влиянию на P2Y₁ рецепторы тромбоцитов в концентрации 100 мкМ соединение RU-891 в 15,7 раза уступает селективному антагонисту указанного подтипа пуриновых рецепторов соединения MRS-2179.

Секреция тромбоцитами веществ способствующих потенцированию процессов агрегации наблюдается при стимуляции не только P2Y₁, но и ряда других рецепторов. Но, в каждом случае процессы активации рецепторного ландшафта кровяных пластинок будут сводиться к дегрануляции, изменению цитоскелета тромбоцитов и их агрегации. Обладая антиагрегантными свойствами вещество в той или иной степени будет подавлять описанные процессы. Так, под действием соединения RU-891 наблюдается снижение уровня секретируемой тромбоцитами АТФ в 7,1 раза по сравнению с действием ацетилсалициловой кислоты, а также секретируемого Р-селектина. В исследованиях, проведенных ранее, установлено, что соединение RU-891 способствует значительному снижению концентрации внутриклеточного кальция в тромбоцитах [Кучерявенко А.Ф., 2012; Спасов А.А., 2014]. Все это указывает на выраженную антитромбоцитарную активность исследуемого соединения.

В исследованиях, проведенных профессором А.Ф. Кучерявенко, была показана способность соединения RU-891 блокировать P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов и снижать уровень тромбоксана А₂, при этом не изменять уровень простаглицлина сосудистой стенки [Кучерявенко А.Ф., 2012]. Синтез тромбоцитами молекул тромбоксана А₂ многостадийный процесс, заключающийся в превращении арахидоновой кислоты. Дополнительно было изучено влияние соединения RU-891 на ключевой фермент в этом процессе – ЦОГ-1. Показано, что исследуемое вещество не изменяло уровень активной ЦОГ-1 в интактных и активированных тромбоцитах, в сравнении с ацетилсалициловой кислотой. В этом состоит преимущество тестируемой субстанции перед известным антиагрегантным средством и указывает на отсутствие у соединения RU-891 нежелательного воздействия на антитромбогенные свойства эндотелия и способность поражать желудочно-кишечный тракт. Это также может свидетельствовать о более селективном механизме антиагрегантного действия соединения RU-891 на уровне тромбоксансинтетазы.

Исходя из данных, полученных ранее (таблица 5.25) [Кучерявенко А.Ф., 2012] и дополненных в этом исследовании, можно заключить, что соединение RU-891 обладает двойным

механизмом антиагрегантного действия, связанным с блокированием P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов и снижением синтеза тромбоксана A₂.

Таблица 5.25.

Влияние соединения RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами [Кучерявенко А.Ф., 2012]

№ п/п	Индукторы агрегации тромбоцитов	Концентрация индуктора	IC ₅₀ , мкМ	
			RU-891	Ацетилсалициловая кислота
1.	АДФ	5 мкМ	66,8	81,0
2.	Адреналин	5 мкМ	6,85	-
3.	Арахидоновая кислота	50 мкМ	9,60	25,64
4.	Коллаген	4 мкг/мл	14,30	-
5.	ФАТ	10 мкМ	440	-
6.	A23187	3 мкМ	9,96	-
7.	U46619	3 мкМ	26,25	47,17

В ходе изучения фармакокинетических свойств соединения RU-891 и его готовой лекарственной формы установлено, что чистая субстанция циркулирует в крови крыс до 8 часа исследования. Интенсивно распределяется в органы и ткани с высокой степенью васкуляризации и липофильностью. Метаболизм изучаемого вещества ярко выражен – образуется 15 метаболитов – и идет, в основном, по окислительному и синтетическому путям. Соединение RU-891 на 50,5% связывается с сывороточным альбумином. При многократном введении выраженной кумуляции не выявлено. ГЛФ RU-891 биоэквивалентна субстанции соединения RU-891, относительная биодоступность составляет 93,38%. Сопоставимость фармакокинетических параметров позволяет сделать выводы, о том, что вспомогательные вещества, входящие в состав ГЛФ RU-891 не влияют на фармакокинетические свойства и достоверно не изменяют фармакокинетических параметров.

Оценка антитромбогенных свойств соединения RU-891 позволяет заключить, что данное вещество обладает выраженной способностью предотвращать тромбообразование, как в артериальном, так и в венозном русле. По степени выраженности антитромботической активности на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) с учетом показателя ED₅₀ исследуемые образцы

можно расположить в следующем порядке: соединение RU-891>ацетилсалициловая кислота>клопидогрел. При этом по показателю данного вида активности соединение RU-891 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 4 раза, а клопидогрел – в 4,8 раза. При изучении ГЛФ RU-891 на данной модели тромбоза было показано более выраженное антитромботическое действие в сравнении с чистой субстанцией. По антитромботической активности на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, при однократном внутрижелудочном введении соединение RU-891 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 7,2 раза и было сравнимо с клопидогрелем.

В результате изучения влияния соединения RU-891 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), установлена его высокая антитромботическая активность при однократном внутрижелудочном способе введения, превосходящая таковую препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Полученные данные проявления выраженных антитромботических свойств у изученной субстанции подтверждают, что в основе его механизма действия лежит угнетение процессов агрегации тромбоцитов.

Часто встречающимся осложнением повышенного тромбообразования в венозной системе является тромбоэмболия. При введении в хвостовую вену мышей смеси адреналина и коллагена происходят немедленные процессы тромбообразования и миграция сгустков в легочную ткань (тромбоэмболия легочных артерий). Данное состояние сопровождается высокой степенью летальности. Соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении предотвращало гибель 80% животных по сравнению со 100% гибелью в контрольной группе. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота увеличивала процент выживших животных до 40%, а клопидогрел – до 50%. Также, при гистологической оценке тканей легких мышей было показано, что соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении снижает относительную и среднюю площадь тромбов на срезе легкого в 5,4 раза по отношению к контролю и превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения - ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел.

Способность соединения RU-891 предотвращать тромбообразование в венозном русле подтверждает то, что при действии данного вещества происходит достоверное снижение массы тромбов в нижней полой вене, после ее суточной перевязки. Исследуемое соединение уменьшает среднюю массу венозных тромбов в 3,6 раза по сравнению со значениями, полученными в контроле и при этом, достоверно превосходит по антитромботической активности препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,4 и 2,1 раза соответственно.

В качестве экспериментальной патологии, сопровождающейся увеличением тромбогенного потенциала крови, для оценки антитромботических свойств соединения RU-891 была выбрана модель инфаркта миокарда. В контрольной группе животных с экспериментальной патологией полная окклюзия сонной артерии, вызванная повреждением тромботическим агентом - раствором хлоридом железа (III) - наступала статистически значимо быстрее, чем в группе крыс без сопутствующей патологии. Это свидетельствует о повышенном тромбогенном потенциале крови у животных с экспериментальным инфарктом миокарда. Антитромботическая активность соединения RU-891 была идентична активности на животных без сопутствующей патологии, в то время как, ГЛФ RU-891 оказалась в 1,3 раза активнее в данных условиях, чем чистая субстанция.

В результате интегральной оценки влияния соединения RU-891 на показатели тромбоэластограммы было выявлено, что тестируемая субстанция и препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел статистически значимо относительно контрольных значений снижали показатель максимальной амплитуды, характеризующий функциональную активность тромбоцитов, что подтверждает наличие у них антиагрегантной активности. При этом было показано, что соединение RU-891 и препараты сравнения не обладают фибринолитическими свойствами.

Одним из частых осложнений антиагрегантной терапии являются кровотечения. На фоне применения известных антитромбоцитарных средств степень проявления данного побочного эффекта различна. Однако, наличие случаев скрытых желудочных и кишечных кровотечений говорит о необходимости поиска и создания высокоэффективного антиагрегантного средства с минимальной степенью риска такого осложнения. По сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелем, время кровотечения под влиянием образца RU-891 пролонгировалось в меньшей степени относительно контроля, что позволяет предположить в будущем наличие у него слабовыраженных побочных эффектов в виде кровотечений.

При изучении хронической токсичности было показано, что в токсикологическом плане соединение RU-891 при 6-ти месячном внутрижелудочном введении крысам в дозах 23 мг/кг и 230 мг/кг является безопасным. С другой стороны, в дозе 460 мг/кг оно проявляет незначительное токсическое действие, которое полностью нивелируется после отмены тестируемой субстанции. В плане доклинической оценки общетоксических свойств ГЛФ RU-891 в дозах 11 мг/кг и 110 мг/кг при 6-месячном внутрижелудочном введении кроликам является не токсичной и безопасной, поскольку не вызывает необратимых изменений в общем состоянии, поведении, гематологических параметрах, биохимических показателях крови и мочи, функциональной активности сердца.

Таким образом, комплекс проведенных исследований по изучению механизма антиагрегантного действия соединения RU-891 и его антитромбогенных свойств позволяет заключить, что данное вещество является высокоэффективным корректором повышенного тромбогенного потенциала крови, с достаточно широким диапазоном условного терапевтического индекса (УТИ 68,6), что подтверждает безопасность применения данного вещества. Двойной механизм антиагрегантного действия (блокатор P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов и ингибитор синтеза тромбоксана A₂) делает более предпочтительным применение соединения RU-891 в качестве средства профилактики острых тромботических событий.

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

ГЛАВА 6. АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ТИАДИАЗИНА СОЕДИНЕНИЯ L-36

Многими исследователями подтверждено, что производные тиадиазина являются достаточно перспективным скаффолдом, на основе которого возможно создание молекул с широким спектром фармакологической активности. Показано, что ряд производных 1,2,4-триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тиадиазина обладает нейро- и кардиопротективным действием, антидепрессивными свойствами [Sarapultsev A., 2021], противоопухолевой, антимицробной, обезболивающей и противовоспалительной активностью, антиоксидантными свойствами, противовирусным действием, ингибирующим влиянием на ряд ферментативных систем, а также противотуберкулезной активностью [Aggarwal R., 2022]. В исследовании Kiesel B.F. и соавт. также была проведена оценка безопасности производных тиадиазина, демонстрирующая принадлежность производных тиадиазина к классу низкотоксичных соединений [Kiesel B.F., 2016].

Антиагрегантные свойства соединений на основе тиадиазина также описаны рядом исследований [Scarborough R.M., 2001; Vasil'eva T.M., 2009]. Полученны результаты, которые показывают, что некоторые производные пиразино[2,3-*c*][1,2,6]тиадиазина демонстрируют значительное ингибирование агрегации тромбоцитов, подобно ацетилсалициловой кислоте, и что антитромбоцитарные свойства могут быть опосредованы вмешательством в метаболизм арахидоновой кислоты [Campillo N., 1999].

В данной главе представлено исследование антиагрегантных и антитромбогенных свойств нового производного тиадиазина соединения L-36 (5-фенил-2-морфолино-6*H*-1,3,4-тиадиазин).

6.1. Влияние соединения L-36 на стадии функциональной активности тромбоцитов

При различных нарушениях в системе гемостаза, в эндотелии сосудов, в гормональной системе происходит изменение основных свойств тромбоцитов [Колесникова И.В., 2009; Танащян М.М., 2018]. Меняется их способность к адгезии, активации и секреции, а также к агрегации [Кузник Б.И., 2010; Мирсаева Г.Х., 2015].

На первом этапе исследований было проведено изучение влияния соединения L-36 на процессы адгезии, активации и секреции тромбоцитов.

6.1.1. Действие на адгезивные свойства тромбоцитов

Коллаген является одним из основных адгезивных белков для тромбоцитов. Тромбоциты могут напрямую связываться с обнаженным коллагеном (при дисфункции эндотелия) через два основных рецептора, т.е. интегрин $\alpha 2\beta 1$ и гликопротеин VI [Nuyttens В.Р., 2011]. Такое взаимодействие мембранных рецепторов адгезии тромбоцитов и коллагена сосудистой стенки является начальным этапом формирования тромбоцитарного тромба, запускающим дальнейшие стадии: активацию, секрецию и агрегацию тромбоцитов [Hosseini E., 2018].

Исследование влияния соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на процессы адгезии тромбоцитов проводилось с помощью люми-агрегометра Chronolog-700 импедансным методом детекции. Тест-система представляла собой сборку из пластиковой одноразовой кюветы, цельной крови, разведенной 1:1 физиологическим раствором натрия хлорида и электродов, погруженных в образец крови. При изучении адгезивных свойств тромбоцитов было установлено, что интактные тромбоциты (контроль) адгезируют на микрофибриллах коллагена со значением импеданса 18,7 Ом. Добавление в тест-систему соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты в концентрации 100 мкМ способствовало снижению импеданса до 14,0 ($p < 0,05$) и 14,2 Ом ($p < 0,05$), соответственно. При изучении тестируемых образцов в концентрациях 10 и 1 мкМ не было зафиксировано достоверно отличающихся от контроля значений импеданса (рисунок 6.1).

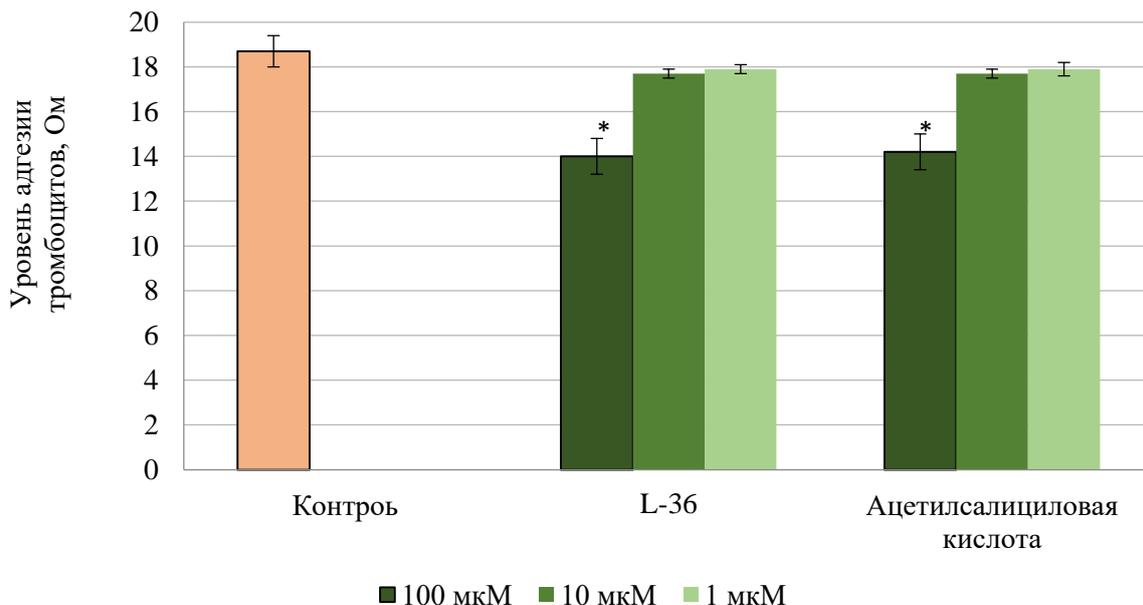


Рисунок 6.1. Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на адгезию тромбоцитов

Примечание:

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

Таким образом, было показано, что соединение L-36 и ацетилсалициловая кислота проявляют блокирующее влияние на процессы адгезии тромбоцитов только в концентрации 100 мкМ, при этом процент ингибирования составил 25,2 ($p < 0,05$) и 24,2% ($p < 0,05$), соответственно (таблица 6.1).

Таблица 6.1.

Антиадгезивные свойства соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена		
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ
1	L-36	25,2±4,4*	5,5±1,3	4,5±1,1
2	Ацетилсалициловая кислота	24,2±4,0*	5,4±1,0	4,5±1,4

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

В ходе изучения влияния тестируемых образцов на процессы адгезии тромбоцитов установлено, что антиадгезивные свойства они проявляют только в высоких концентрациях. Такая активность позволяет исключить действие соединения L-36 на гликопротеин VI тромбоцитов.

6.1.2. Влияние на процессы активации тромбоцитов

Активация тромбоцитов может осуществляться различными молекулами [Khodadi E., 2020]. Данный процесс осуществляется через стимуляцию $P2Y_1$ рецептора молекулами АДФ и АТФ, секретлируемыми из уже активированных тромбоцитов, а также из поврежденных клеток тканей организма [Tomaiuolo M., 2017]. Методом малоуглового светорассеяния было исследовано влияние селективного антагониста $P2Y_1$ рецептора тромбоцитов вещества MRS-2179 и соединения L-36 на активацию тромбоцитов *in vitro*. Показано, что вещество сравнения MRS-2179 в концентрации 1 мкМ блокировало активацию тромбоцитов кролика на 91,0% ($p < 0,05$) (таблица 6.2), что подтверждает его антагонистические свойства в отношении $P2Y_1$ рецептора тромбоцитов. При инкубации богатой тромбоцитами плазмы кроликов с 1 мкМ соединения L-36 не наблюдалось значительного снижения сферизации кровяных пластинок.

Исследуемое соединение блокировало процессы активации на 10,3% в сравнении с контрольной группой (таблица 6.2).

Таблица 6.2.

Влияние соединений L-36 и MRS-2179 на активацию тромбоцитов, вызванную стимуляцией P2Y₁ рецепторов тромбоцитов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

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

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

n-количество проб в каждой группе

Проведенное исследование позволяет сделать вывод о влиянии исследуемого соединения на самый ранний этап процесса тромбообразования-стадию активации. Тестируемый образец под шифром L-36 не оказывает выраженного ингибирующего действия в отношении активации тромбоцитов, что позволяет предположить отсутствие у данного соединения P2Y₁-блокирующих свойств.

6.1.3. Ингибирование секреции АТФ из гранул хранения тромбоцитов

Общим ответом тромбоцитов на любые агонисты является секреция гранул. Тромбоциты содержат три основных типа гранул: α-гранулы (белки адгезии, такие как фибриноген, фактор Виллебранда, факторы свертывания крови и фибринолитические факторы, цитокины, факторы роста и рецепторы адгезии), плотные гранулы (нуклеотиды, такие как АДФ, АТФ и ГТФ, серотонин, гистамин, пиродифосфаты, двухвалентные катионы и т.д.) и лизосомы (множество протеолитических ферментов) [Estevez B., 2017; Kirwan D.E., 2021]. Секреция гранул играет решающую роль в усилении активации тромбоцитов, в рекрутировании циркулирующих тромбоцитов в агрегаты и важна для стабилизации тромба. Таким образом, его можно рассматривать как механизм ауторегулирования тромбообразования. Секреция гранул также

играет важную роль в воспалении, атеросклерозе, заживлении ран, ангиогенезе и злокачественных новообразованиях [Li Z., 2010].

На двухканальном люми-агрегометре было определено, что уровень секреции АТФ из плотных гранул интактных тромбоцитов составил 65,4 нМ (таблица 6.3). После инкубации цельной крови с 100 мкМ соединения L-36 наблюдалось падение уровня секреции АТФ на 92,0% ($p < 0,05$). Снижение конечной концентрации соединения L-36 до 10 мкМ способствовало ингибированию пула АТФ из плотных гранул до 18,2 нМ, что на 72,2% ($p < 0,05$) ниже уровня контрольных значений. В концентрации 1 мкМ исследуемое вещество на 24,6% ($p < 0,05$) способствовало снижению секреции гранул хранения. Такое дозозависимое проявление активности позволило рассчитать значение IC_{50} , которое для соединения L-36 составило 4,1 мкМ (таблица 6.3). Синтезируемый в активированном тромбоците тромбоксан A_2 способствует активации других кровяных пластинок через G-белок-сопряженные тромбоксановые рецепторы, а также способствует секреции внутриклеточных депо хранения тромбоцитов, по механизму ауторегуляции [Yun S.H., 2016]. Таким образом, ацетилсалициловая кислота также в некоторой степени способствует торможению секреции гранул хранения через подавление синтеза тромбоксана A_2 . В концентрации 100 мкМ препарат сравнения ингибировал пул АТФ на 58,2% ($p < 0,05$). Дальнейшее уменьшение исследуемых концентраций ацетилсалициловой кислоты до 10 и 1 мкМ сопровождалось угнетением секреции АТФ на 26,0 ($p < 0,05$) и 4,9%, соответственно. Показатель IC_{50} при этом составил 57,8 мкМ.

Таблица 6.3.

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

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

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

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

n-количество проб в каждой группе

Подавление секреции содержимого гранул тромбоцитов является несомненным подтверждением антиагрегантных свойств соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты. Однако, проведенное исследование показало, что по уровню активности (величина IC_{50}) соединение L-36 превосходит препарат сравнения в 14,1 раза.

6.1.4. Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод об отсутствии влияния соединения L-36 на процессы адгезии и активации тромбоцитов. Вместе с тем, выраженная способность снижать секрецию АТФ из гранул хранения тромбоцитов указывает на наличие антиагрегантного потенциала. При этом, по уровню активности в отношении секреции АТФ соединение L-36 превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 14,1 раза.

6.2. Механизм антиагрегантного действия соединения L-36

Богатые тромбоцитами тромбы образуются, когда тромбоциты агрегируют друг с другом вследствие сложных механизмов, которые регулируются взаимодействием агонистов тромбоцитов с их специфическими рецепторами [Passacuale G., 2011]. Антитромбоцитарные препараты, применяемые в терапевтических целях, принадлежат к разным классам, каждый из которых действует по своему механизму, например, ингибиторы циклооксигеназы, ингибиторы фосфодиэстеразы, ингибиторы тромбина и блокаторы рецепторов тромбина, антагонисты рецепторов $P2Y_{12}$, которые получили большое распространение в последние десятилетия, а также блокаторы гликопротеиновых $IIb/IIIa$ рецепторов тромбоцитов для внутривенного применения [Cacciari V., 2019]. Такое разнообразие потенциальных мишеней для воздействия явилось основанием для более детального изучения механизма антиагрегантного действия соединения L-36.

6.2.1. Действие на P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов

P2Y₁₂ - G-белок-сопряженный рецептор тромбоцитов для молекул АДФ, играет центральную роль в функции тромбоцитов [Cattaneo M., 2011]. АДФ-опосредованная активация рецептора P2Y₁₂ необходима для усиления агрегации тромбоцитов и, таким образом, образования тромбов. О значимости рецепторов к регуляторным пуринам свидетельствуют факты широкого и эффективного применения блокаторов рецепторов P2Y₁₂ в неотложной кардиологии [Баринов Э.Ф., 2014]. В многочисленных клинических исследованиях было показано, что длительное ингибирование рецептора P2Y₁₂ предотвращает серьезные неблагоприятные кардиальные события. В исследованиях *in vitro* было показано, что рецептор P2Y₁₂ индуцирует внутритромбоцитарную передачу сигналов и приводит к стабилизации активной конформации рецептора фибриногена IIb/IIIa [Crescence L., 2021].

В ходе изучения влияния соединения L-36 на P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов было показано, что в дозе ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo*, данное вещество блокировало P2Y₁₂-опосредованную агрегацию тромбоцитов на 17,0% (таблица 6.4). Блокатор указанного подтипа пуриновых рецепторов клопидогрел в эквимолярной дозе способствовал ингибированию P2Y₁₂-опосредованной агрегации тромбоцитов на 67,8% (p<0,05).

Таблица 6.4.

Влияние соединения L-36 и клопидогрела на P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов *in vivo* (M±SEM) (n=6)

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

*-доза, эквимолярная дозе соединения L-36

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

n-количество животных в каждой группе

Стимуляция P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов происходит в значительно более низки концентрациях АДФ (200 нМ), в сравнении со стандартным методом изучения агрегации тромбоцитов. Это позволяет дифференцировать метод малоуглового светорассеяния с применением низких концентраций АДФ как более селективный [Деркачев Э.Ф., 1998]. Препарат

сравнения проявил статистически высокий уровень активности на данной модели эксперимента, что подтверждает механизм его действия. Исследуемое соединение выраженной активности не продемонстрировало, что позволяет сделать вывод об отсутствии у соединения L-36 P2Y₁₂-блокирующих свойств.

6.2.2. Антиагрегантная активность на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов

Тромбоциты могут быть активированы широким спектром агонистов, которые подразделяются на сильные и слабые. Образовавшийся из арахидоновой кислоты тромбоксан A₂ является сильным агонистом, стимулирующим процессы агрегации через активацию тромбоксановых рецепторов тромбоцитов [Баринов Э.Ф., 2016]. U46619 является аналогом тромбоксана A₂, соответственно селективно оказывает стимулирующее действие на тромбоксановые рецепторы тромбоцитов [Zhang Y., 2017]. При обработке интактных тромбоцитов агонистом U46619 наблюдалось увеличение амплитуды агрегации тромбоцитов до 45,7 отн.ед. Инкубация тест-системы с 100 мкМ соединения L-36 способствовала достоверному снижению амплитуды агрегации кровяных пластинок на 12,8% (p<0,05).

Таблица 6.5.

Влияние соединения L-36 в концентрации 100 мкМ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную селективным агонистом тромбоксановых рецепторов тромбоцитов U46619 (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Амплитуда агрегации тромбоцитов, отн.ед.	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов
1	Контроль	45,7±0,5	
2	L-36	39,8±1,5*	12,8±2,8*

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

Согласно литературным данным блокатор тромбоксановых рецепторов тромбоцитов ридогрел выражено ингибирует агрегацию кровяных пластинок, стимулированную агонистом U46619, с показателем IC₅₀ 1,2 мкМ [Hoet B., 1990].

Таким образом, селективный антагонист тромбоксановых рецепторов значительно превосходит по активности соединение L-36, что указывает на незначительное влияние исследуемого вещества на данные рецепторы.

6.2.3. Влияние на уровень тромбосана В₂

Тромбосан А₂ является важным метаболитом арахидонового каскада, образующимся через циклооксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты. Последняя подвергается воздействию ЦОГ-1 и происходит образование простагландина G₂ (P_gG₂), который в свою очередь подвергается воздействию внутриклеточных пероксидаз, что приводит к образованию P_gH₂. Последний подвергается метаболизму при участии ряда синтаз, в том числе тромбосансинтазы, которая катализирует синтез ТхА₂ [Lopez L.R., 2014]. Это достаточно нестабильное биологически активное вещество, время жизни которого всего 10 секунд, является мощным агонистом для близлежащих тромбоцитов, активируя их воздействием на тромбосановые рецепторы мембраны кровяных пластинок. Стабильным метаболитом ТхА₂ является тромбосан В₂ (ТхВ₂), который длительное время циркулирует в крови и экскретируется с мочой [van der Plas A., 2018]. Измерение тромбосана В₂ (ТхВ₂) в сыворотке является показательным тестом, который позволяет оценить влияние ацетилсалициловой кислоты на активность ЦОГ-1 в тромбоцитах. Измерение ТхВ₂ может служить потенциальным биомаркером риска развития тромботических состояний [Szczyko M., 2021].

В таблице 6.6. представлены данные по изучению влияния соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень ТхВ₂. В контрольной группе животных уровень ТхВ₂ после стимуляции тромбоцитов арахидоновой кислотой составил 170,9 пкг/мл. При исследовании препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты наблюдалось выраженное дозозависимое снижение концентрации ТхВ₂, что обусловлено механизмом действия данного средства. В дозе ED₅₀ антиагрегантной активности ацетилсалициловая кислота способствовала снижению синтеза ТхВ₂ на 41,8%. В дозах 17,2 и 68,8 мг/кг уровень исследуемого показателя снижался на 18,4 и 66,4% соответственно. Значение ED₅₀ для ацетилсалициловой кислоты при этом составило 48,8 мг/кг (таблица 6.6).

Под влиянием соединения L-36 в дозе ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* наблюдалось статистически значимое снижение концентрации ТхВ₂ до 75,2 пкг/мл, что на 56,0% ниже значений, полученных в контроле. Для расчета показателя ED₅₀ было проведено дозозависимое изучение ингибирующего влияния соединения L-36 на синтез ТхВ₂. При увеличении дозы исследуемого соединения до 55,6 мг/кг концентрация стабильного метаболита снижалась на 94,4% и составила 9,6 пкг/мл. В группе животных, получавших соединение L-36 в дозе 14,0 мг/кг средняя концентрация ТхВ₂ составила 112,1 пкг/мл, что соответствует 34,4% ингибирования относительно группы контроля. Значение ED₅₀ для соединения L-36 составило 24,4 мг/кг (таблица 6.6).

Влияние соединения L-36 на уровень TxB₂ в тромбоцитах, стимулированных арахидоновой кислотой *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень TxB ₂ , пкг/мл	Δ% снижения уровня TxB ₂	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль		170,9±3,6		
2.	L-36	14,0	112,1±1,4*	34,4±0,8*	24,4
3.		27,8	75,2±9,1*	56,0±5,3*	
4.		55,6	9,6±1,0*	94,4±0,6*	
5.	Ацетилсалициловая кислота	17,2	139,4±3,5*	18,4±2,1*	48,8
6.		34,4	99,4±2,1*	41,8±1,2*	
7.		68,8	57,4±2,7*	66,4±1,6*	

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

Проведенное исследование позволяет заключить, что тестируемое соединение L-36 обладает выраженной активностью в отношении синтеза тромбоксана A₂, что может обуславливать антиагрегантную активность данной молекулы. По влиянию на данный процесс соединение L-36 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 2 раза.

6.2.4. Влияние на уровень эндотелина-1

Дисфункция эндотелия является часто встречающимся осложнением основных заболеваний (сахарный диабет, ишемические повреждения, септические состояния и др.). Эндотелиальная дисфункция характеризуется сдвигом активности эндотелия в сторону уменьшения вазодилатации, провоспалительного состояния и протромбических свойств [Rajendran P., 2013; Bernard I., 2020]. Показательным биомаркером эндотелиальной дисфункции является эндотелин-1 [Петриков А.С., 2013; Калинин Р.Е., 2019]. Эндотелин-1 является ведущей молекулой, регулирующей функцию сосудов, а также отягощающим фактором сердечно-сосудистых заболеваний при эндотелиальной дисфункции [Hsieh H.L., 2021].

Липополисахарид в дозе 2 мг/кг при внутривенном введении способствует развитию дисфункции эндотелия [Piechota-Polańczyk A., 2012; Abdul Y., 2020]. Поэтому выбор ЛПС-токсина в качестве инициатора эндотелиальной дисфункции является обоснованным. В ходе эксперимента установлено, что при однократном внутривенном введении раствора липополисахарида (позитивный контроль) наблюдается достоверное увеличение концентрации эндотелина-1 в плазме крыс в 15,8 раза относительно интактных животных, что говорит о развитии дисфункции эндотелия (таблица 6.7). У интактных животных при однократном внутрижелудочном введении соединения L-36 не наблюдалось статистически значимого снижения концентрации эндотелина-1 и его увеличения, что может указывать на отсутствие у исследуемого вещества повреждающих свойств, характерных для ряда НПВС. В группе животных, получавших однократно соединение L-36 в дозе 27,8 мг/кг, на фоне ЛПС-индуцированной интоксикации (сепсис) наблюдалось снижение концентрации эндотелина-1 на 34,8% ($p < 0,05$) относительно позитивного контроля. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота не проявил выраженного ингибирующего влияния на продукцию эндотелина-1, что согласуется с данными других исследователей [Hurlen M., 2001; Saeed A., 2011].

Таблица 6.7.

Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень эндотелина-1, в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности, при однократном внутрижелудочном введении ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Концентрация эндотелина-1 в плазме крыс, пкг/мл
1	Контроль (интакт)		0,92±0,13
2	Контроль + ЛПС (позитивный)		14,53±0,47*
3	L-36 (интакт)	27,8	0,78±0,04
4	L-36 + ЛПС		9,47±0,42 [#]
5	Ацетилсалициловая кислота (интакт)	34,4	0,83±0,03
6	Ацетилсалициловая кислота + ЛПС		14,30±0,29 [#]

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

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

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

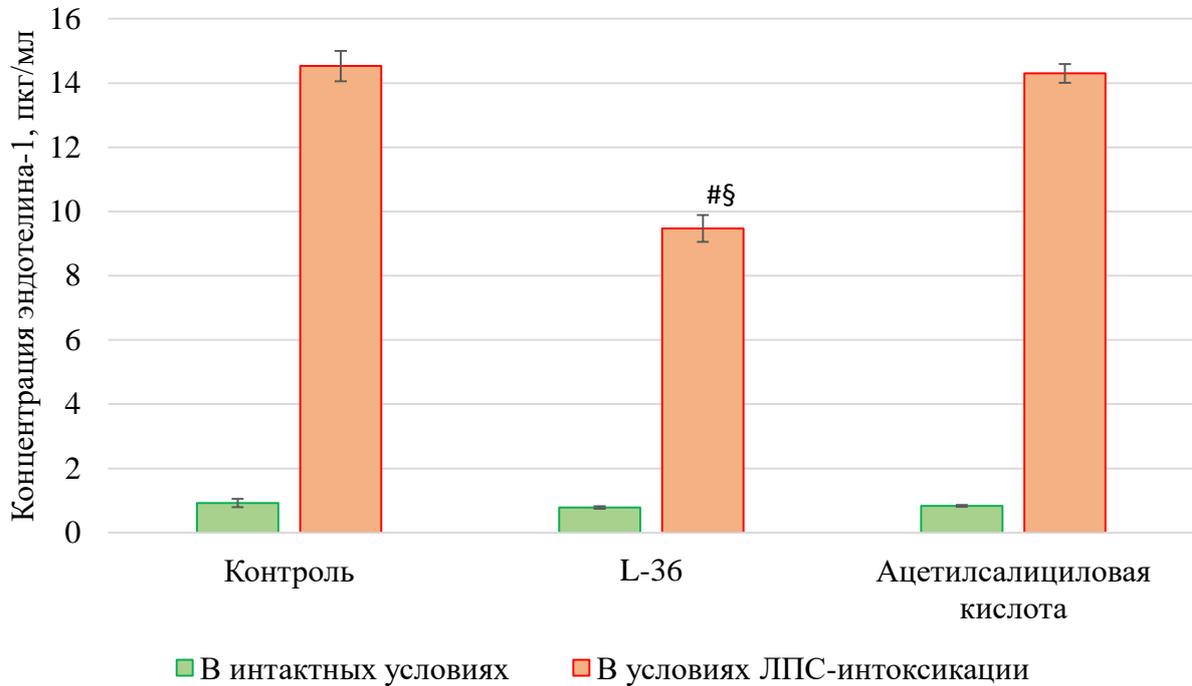


Рисунок 6.2. Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень эндотелина-1 у интактных животных и в условиях ЛПС-индуцированной дисфункции эндотелия.

Примечание:

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

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

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

6.2.5. Влияние на фактор фон Виллебранда

Фактор Виллебранда (vWF), ключевой компонент системы гемостаза, синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах и высвобождается в кровь в виде высокомолекулярных мультимерных гликопротеинов. Молекулы vWF присоединяются к местам повреждения поверхности сосудов и разворачиваются при высоких скоростях сдвига кровотока. На развернутой молекуле vWF экспонируются участки, взаимодействующие с рецепторами на мембране тромбоцитов (гликопротеины Ib-IX-V). После связывания с нитями vWF тромбоциты активируются, к ним дополнительно присоединяются близлежащие циркулирующие в сосудах тромбоциты, и в итоге происходит тромбообразование [Авдонин П.П., 2021]. В настоящее время vWF также является одним из общепризнанных маркеров нарушений функции эндотелия, связанных с увеличением выработки эндотелием веществ с протромботической активностью, при повреждении эндотелия он секретируется в субэндотелий и плазму крови. Связь повышения концентрации vWF в крови со степенью повреждения сосудистого эндотелия была доказана в модельных экспериментах на крысах при эндотоксинемии и механическом повреждении эндотелия еще в 1989 г. Reldy и соавт. При состояниях, сопровождающихся острым или хроническим повреждением эндотелия, уровень vWF в крови значительно повышается [Шуваева В.Н., 2020].

На модели ЛПС-индуцированной интоксикации у крыс было установлено, что количественное содержание vWF в плазме животных с гиперцитокинемией достоверно увеличивается на 56,2% ($p < 0,05$) относительно интактной группы животных (таблица 6.8). Такое повышение концентрации vWF подтверждает развитие дисфункции эндотелия в ответ на внутривенное введение липополисахарида. Учитывая наличие на поверхности мембран тромбоцитов гликопротеина Ib-IX-V, резкое увеличение содержания в плазме крови vWF говорит также о повышенном риске тромбообразования на фоне ЛПС-интоксикации. При однократном внутрижелудочном введении крысам соединения L-36 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты не было зафиксировано достоверных изменений уровня vWF у интактных животных. Так, в группе животных, получавших исследуемое соединение, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации vWF на 9,5% (таблица 6.8, рисунок 6.3). Ацетилсалициловая кислота способствовала снижению изучаемого показателя на 6,0% (таблица 6.8, рисунок 6.3). На фоне смоделированной ЛПС-интоксикации однократное введение соединения L-36 приводило к статистически значимому снижению уровня vWF на 56,5% ($p < 0,05$) в сравнении со значениями, полученными в группе позитивного контроля

(таблица 6.8, рисунок 6.3). Препарат сравнения в условиях интоксикации способствовал снижению концентрации исследуемого маркера на 13,7% (таблица 6.8, рисунок 6.3).

Таблица 6.8.

Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень фактора фон Виллебранда (vWF) в плазме крови интактных крыс и в условиях ЛПС-индуцированной интоксикации (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Концентрация vWF в плазме крыс, нг/мл
1	Контроль (интакт)		88,3±8,8
2	Контроль ЛПС (позитивный)		137,9±12,2*
3	L-36 (интакт)	27,8	79,9±2,8
4	L-36 (ЛПС)		60,0±6,6 ^{#§}
5	Ацетилсалициловая кислота (интакт)	34,4	83,0±1,6
6	Ацетилсалициловая кислота (ЛПС)		119,0±12,1

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

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

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

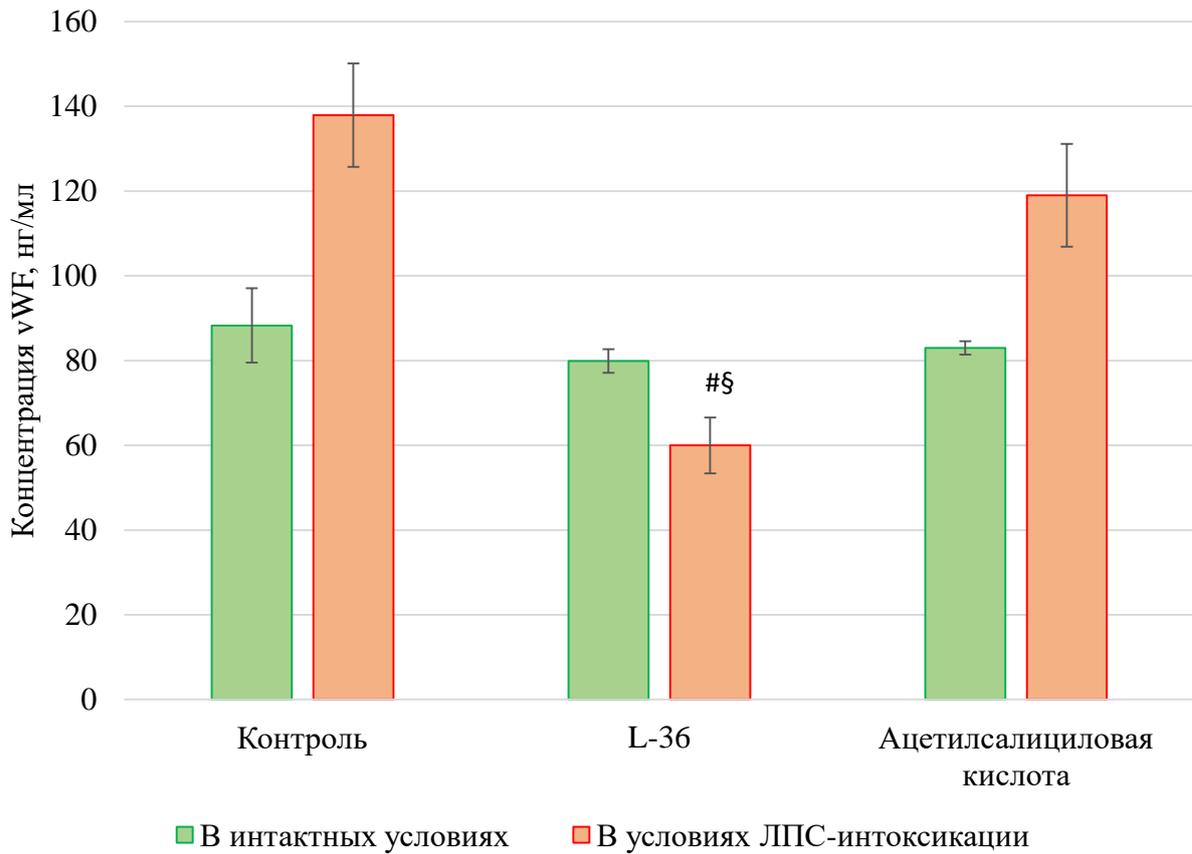


Рисунок 6.3. Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на уровень vWF у интактных животных и в условиях ЛПС-интоксикации.

Примечание:

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

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

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

6.2.6. Действие на уровень внутриклеточного кальция

Тромбообразование представляет собой многоэтапный процесс, включающий адгезию тромбоцитов к стенке поврежденного сосуда, привлечение циркулирующих тромбоцитов для формирования агрегата тромбоцитов, активацию свертывающего каскада крови с образованием фибрина для укрепления сгустка и, наконец, ретракцию сгустка. Каждая из этих стадий активации тромбоцитов запускается повышением концентрации цитозольного кальция в тромбоцитах [Cabrega D., 2020]. При активации тромбоцитов происходит резкое увеличение уровня внутриклеточного кальция, как за счет поступления ионов кальция outside-in посредством $P2X_1$ рецепторов, так и благодаря дегрануляции внутриклеточных депо хранения тромбоцитов [Dupuis A., 2020].

В ходе изучения концентрации внутриклеточного кальция тромбоцитов на первом этапе была выполнена оценка повышения общего уровня кальция в суспензии отмытых тромбоцитов в кальциевой среде в ответ на стимуляцию тромбином. Средний уровень кальция в контрольных пробах составил 250,9 нМ (таблица 6.9). Препарат сравнения верапамил способствовал достоверному снижению общего уровня кальция в концентрации 100 мкМ до 45,8 нМ, что на 81,7% ($p < 0,05$) ниже значений контроля. При инкубации суспензии тромбоцитов с 10 и 1 мкМ верапамила наблюдалось снижение концентрации ионов кальция до 127,4 (49,2% ($p < 0,05$)) и 228,1 нМ (9,1%), соответственно. Значение IC_{50} для верапамила составило 12,4 мкМ (таблица 6.9). При изучении влияния соединения L-36 на уровень кальция в кальциевой среде было установлено, что данный образец в концентрации 100 мкМ приводит к достоверному снижению общего пула ионов кальция на 94,1% ($p < 0,05$). Дальнейшее снижение концентрации исследуемого образца до 10 и 1 мкМ способствовало ингибированию концентрации ионов кальция на 56,6% ($p < 0,05$) и 17,4% ($p < 0,05$), соответственно. Показатель IC_{50} для соединения L-36 при этом составил 7,0 мкМ. По данному показателю исследуемое вещество превосходит по активности препарат сравнения верапамил в 1,8 раза.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	Уровень кальция, нМ	Δ% снижения уровня кальция	IC ₅₀ , мкМ
1.	Контроль		250,9±9,2		
2.	L-36	100	14,8±3,2*	94,1±1,3*	7,0
3.		10	108,9±6,6*	56,6±2,6*	
4.		1	207,2±7,9*	17,4±3,2*	
5.	Верапамил	100	45,8±8,4*	81,7±3,3*	12,4
6.		10	127,4±7,9*	49,2±3,1*	
7.		1	228,1±5,6	9,1±2,2	

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

На втором этапе исследования с целью детализации влияния тестируемых образцов на уровень внутриклеточного кальция тромбоцитов была проведена оценка концентрации ионов кальция в безкальциевой среде. Это позволит более точно оценить влияние соединения L-36 на прирост ионов кальция внутри активированных тромбоцитов без учета пути outside-in. В ответ на стимуляцию тромбином увеличение концентрации ионов кальция в интактных тромбоцитах происходило до 103,3 нМ (таблица 6.10). Препарат сравнения верапамил не оказал влияния на изменение концентрации внутриклеточного кальция в безкальциевой среде, что обусловлено его механизмом действия (таблица 6.10). Инкубация тест-системы с 100 мкМ соединения L-36 способствовала снижению уровня внутриклеточного кальция до 7,7 нМ, что на 92,6% (p<0,05) ниже значений, полученных в контроле. Такое выраженное ингибирование внутриклеточного пула ионов кальция послужило основанием для исследования данного соединения в концентрациях 10 и 1 мкМ. При добавлении в суспензию отмытых тромбоцитов раствора соединения L-36 в конечной концентрации 10 мкМ наблюдалось увеличение концентрации кальция до 47,1 нМ в ответ на стимуляцию тромбином, что на 54,4% (p<0,05) ниже показателей группы контроля. В концентрации 1 мкМ тестируемый образец L-36 способствовал ингибированию секреции внутриклеточного кальция тромбоцитов на 7,2%. Дозозависимое влияние на пул ионов кальция из внутриклеточных депо хранения позволило рассчитать показатель IC₅₀, который составил 9,3 мкМ (таблица 6.10).

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

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

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

Изменение концентрации внутриклеточного кальция в безкальциевой среде свидетельствует о непосредственном влиянии соединения L-36 на функциональную активность тромбоцитов. Относительно препарата сравнения, исследуемый образец L-36 способствовал дозозависимому ингибированию внутриклеточного пула ионов кальция. Влияние на секрецию кальция свидетельствует о способности соединений подавлять функциональную активность тромбоцитов на ранних этапах – активации [Irfan M., 2021].

6.2.7. Заключение

В ходе изучения потенциального механизма антиагрегантного действия соединения L-36 можно заключить, что данное вещество не оказывает влияния на пуриновые рецепторы тромбоцитов. В отношении процессов агрегации тромбоцитов, стимулированных селективным агонистом тромбоксановых рецепторов, также не выявлено достоверного влияния. Однако, соединение L-36 в 2 раза превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту по способности снижать синтез тромбоксана A₂, а также способствовало дозозависимому снижению внутриклеточного пула ионов кальция. Это позволяет предположить, что механизм антиагрегантного действия соединения L-36 связан с влиянием на путь метаболизма арахидоновой кислоты. Выраженное влияние на уровни эндотелина-1 и фактор фон Виллебранда

в условиях системной воспалительной реакции позволяет сделать вывод о наличии эндотелиопротективного действия у соединения L-36.

6.3. Анализ *in silico* механизма антиагрегантного действия соединения L-36

Основной целью настоящего исследования явился анализ *in silico* методом докинга сравнительной аффинности соединения-лидера L-36 с высокой антиагрегантной активностью и референсных препаратов ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена в отношении циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы, с целью выработки обоснованных предположений относительно возможного таргетного механизма антиагрегантного действия соединения L-36.

Проведенное исследование включало следующие основные этапы:

1. Построение методами молекулярной механики и квантовой химии оптимизированных 3D-моделей нового соединения-лидера с высокой антиагрегантной активностью L-36 и препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена;

2. Нахождение валидных 3D-моделей белков-мишеней, релевантных особенностям антиагрегантного действия L-36 – циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы;

3. Определение аминокислот, образующих сайты связывания указанных биомишеней;

4. Ансамблевый докинг оптимизированных 3D-моделей L-36, ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена в сайты связывания валидных 3D-моделей циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы, определение энергии докинга;

5. Расчет констант связывания и сравнительных показателей аффинности L-36, ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена в отношении циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы.

Структурные формулы ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена, полученные из базы данных DrugBank [DrugBank, 2022], вместе со структурной формулой соединения L-36 приведены на рисунке 5.4.



Рисунок 6.4. Структурные формулы изучаемых антиагрегантных соединений.

Для структур вещества L-36, ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена методами молекулярной механики с помощью программы MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, 2021], отдельно для каждого соединения, были построены по 10 конформеров с наименьшей энергией. Построенные конформеры были оптимизированы с помощью программы MOPAC2012 [MOPAC, 2021] с использованием полуэмпирического квантово-химического метода PM7. Среди оптимизированных конформеров были отобраны для каждого соединения по одному конформеру с наименьшей общей энергией. Пример оптимизированной 3D-структуры соединения L-36 приведен на рисунке 6.5.

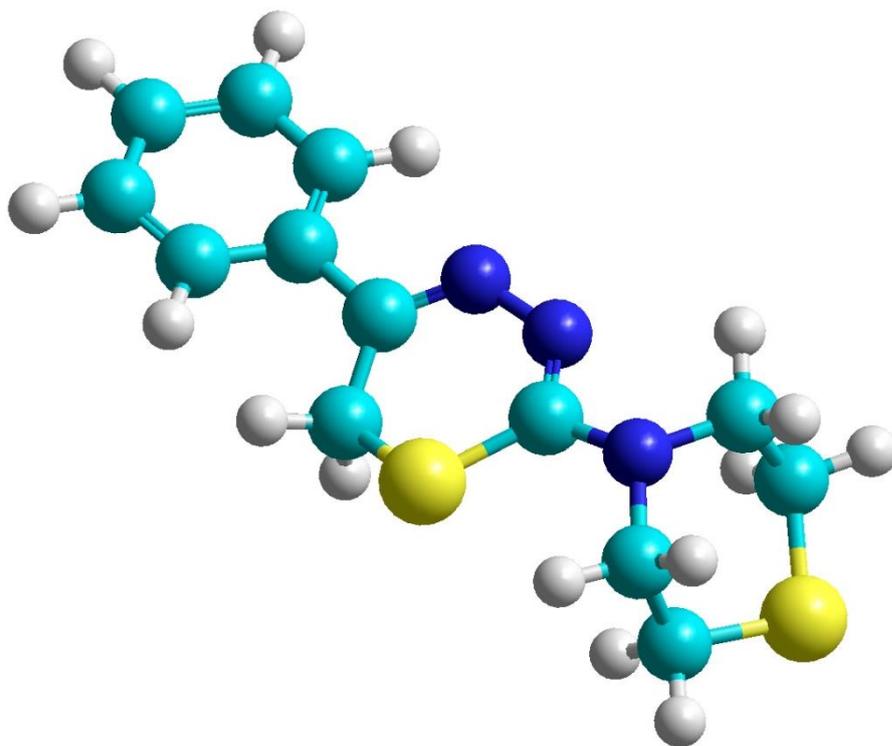


Рисунок 6.5. Оптимизированная 3D-модель соединения L-36.

При выборе валидных 3D-моделей циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы были проанализированы все 3D-модели *Homo sapiens*, реферированные в базе знаний UniProt [UniProt, 2022] – в первую очередь экспериментальные рентгеноструктурные, доступные в базе данных PDBe [PDBe, 2022] и затем теоретические, доступные в базе данных AlfaFold [AlphaFold, 2022]. Для циклооксигеназы-1 была найдена одна экспериментальная 3D-модель с PDB-кодом 6Y3C. Для циклооксигеназы-2 были найдены семь экспериментальных 3D-моделей, среди которых была отобрана одна с PDB-кодом 5KIR. Данная модель включала лиганд Vioxx (рофекоксиб), для которого достоверно известен обратимый характер связывания со специфическим сайтом ЦОГ-2.

Для тромбоксансинтетазы не было найдено ни одной экспериментальной 3D-модели, поэтому в дальнейших расчетах была использована построенная по гомологии теоретическая модель с кодом AF-P24557-F1-model.

Выявление специфических сайтов связывания в трех указанных биомишенях было выполнено с помощью программы PrankWeb 1.0 [Jendele, 2019]. Ключевые аминокислоты специфических сайтов связывания циклооксигеназы-1, циклооксигеназы-2 и тромбоксансинтетазы, найденные с использованием их валидных 3D-моделей, приведены в таблице 6.11.

Таблица 6.11.

Ключевые аминокислоты специфических сайтов связывания биомишеней, релевантных антиагрегантной активности соединения L-36

№	Биомишень, 3D-модель	Ключевые аминокислоты сайта
1	COX1, 6Y3C	88THR 89HIS 92LEU 99TRP 111LEU 114LEU 115VAL 119ARG 204PHE 208PHE 226GLY 347TYR 348VAL 351LEU 352SER 354TYR 356LEU 358LEU 380PHE 384TYR 386TRP 517PHE 521MET 522ILE 523GLU 525GLY 526ALA 529SER 530LEU 532GLY 533LEU
2	COX2, 5KIR	74VAL 75HIS 77ILE 78LEU 84PHE 85TRP 98ILE 101TYR 102VAL 105SER 116ARG 191PHE 185PHE 213GLY 334TYR 335VAL 338LEU 339SER 341TYR 343PHE 345LEU 361ASN 363ILE 367PHE 371TYR 373TRP 499ARG 502ALA 503ILE 504PHE 508MET 509VAL 510GLU 512GLY 513ALA 515PHE 516SER 517LEU 519GLY 520LEU

3	TBXAS1, AF-P24557- F1-model	110ARG 115LEU 116GLU 117PHE 120VAL 124VAL 125LEU 126PHE 136ARG 143PHE 216PHE 217PHE 218GLU 220CYS 247ASN 278PHE 337ILE 338PHE 340ILE 341ALA 342GLY 344GLU 345ILE
---	-----------------------------------	---

Ансамблевый докинг оптимизированных 3D-моделей соединения L-36, ацетилсалициловой кислоты и дазоксибена в специфические сайты трех валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней COX1, COX2 и TBXAS1 осуществлялся с помощью программ PyRx 0.8 [PyRx, 2021] и AutoDock Vina 1.1.2 [Trott, 2010], с учетом полученных данных о ключевых аминокислотах сайтов связывания и покрывающих сайты 3D-моделей пространств для докинга. Пример построения в программе PyRx пространства для докинга, покрывающего сайт связывания, приведен на рисунке 6.6.

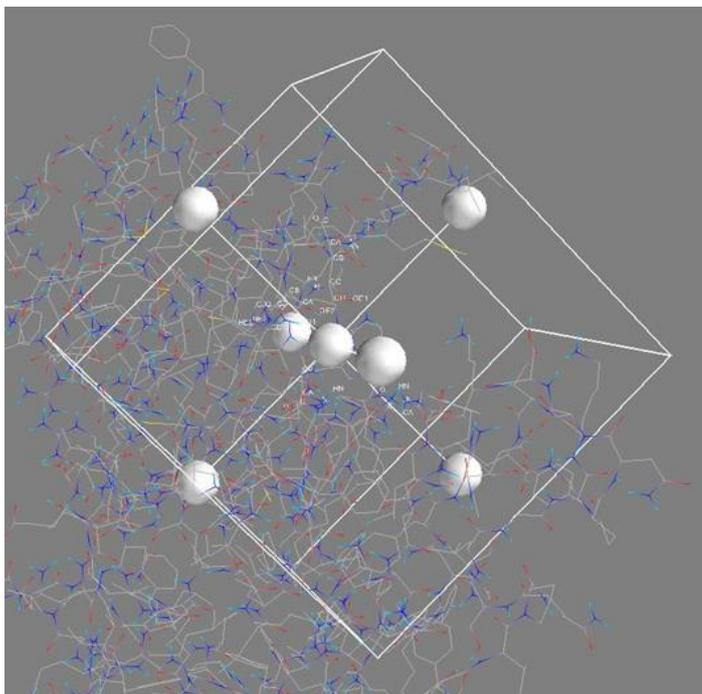


Рисунок 6.6. Построение с помощью программы PyRx 0.8 пространства для докинга, покрывающего сайт связывания белка-мишени

Отдельно для каждой из трех 3D-моделей биомишеней и для каждой 3D-структуры трех лигандов докинг выполняли по пять раз, каждый раз в новом расчете, с рассмотрением 10 энергетически наиболее выгодных конформаций лиганда в сайте биомишени. По полученным 50 значениям для докируемого соединения определяли минимальную энергию его докинга ΔE для данного вида биомишени. Докинг соединения L-36 был выполнен в сайты всех трех релевантных биомишеней. Докинг препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты был выполнен в сайты

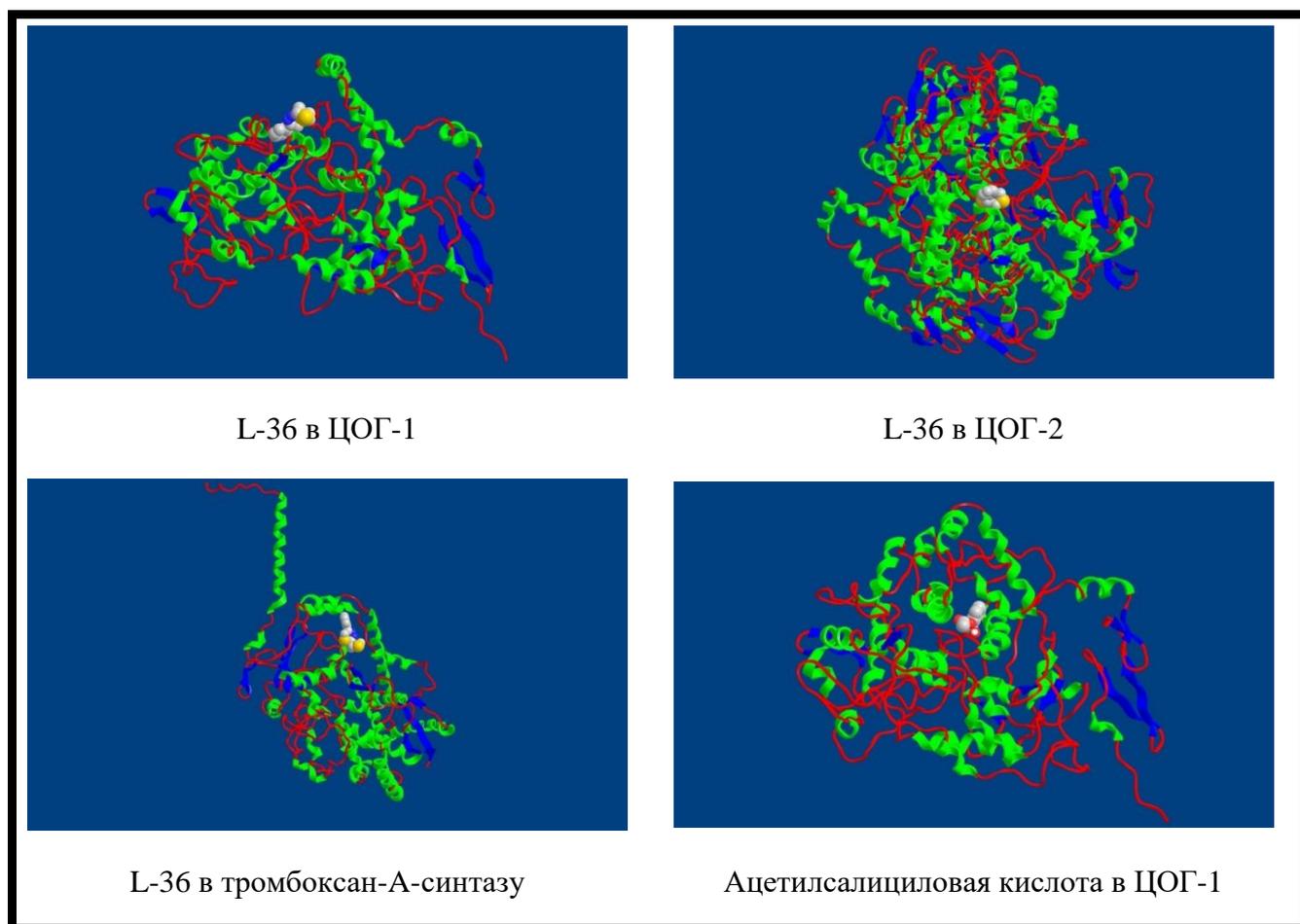
циклооксигеназы-1 и циклооксигеназы-2. Докинг препарата сравнения дазоксибена был выполнен в сайт тромбоксансинтетазы. Всего, таким образом, был обработан массив из 300 значений энергий докинга. Визуализированные 3D-модели белков-мишеней с докированными в них соединениями представлены на рисунке 6.7.

Вычисленные минимальные значения энергии докинга ΔE приведены в таблице 6.11.

Таблица 6.11.

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

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



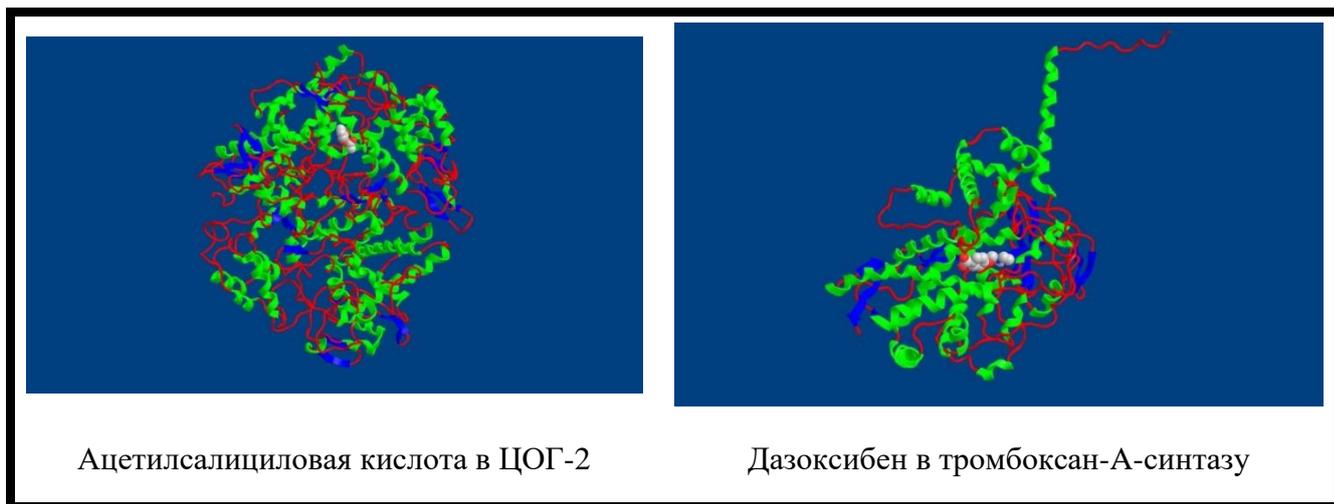


Рисунок 6.7. 3D-модели белков-мишеней с докированными в них соединениями

Для соединения L-36 и двух препаратов сравнения по значениям энергий докинга ΔE были вычислены константы связывания K со всеми белками-мишенями. Результаты расчетов приведены в таблице 6.12.

Таблица 6.12.

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

Биомишень	K, nM		
	L-36	Ацетилсалициловая кислота	Дазоксибен
Циклооксигеназа-1	42290	30231	—
Циклооксигеназа-2	9336	9336	—
Тромбосансинтаза	18271	—	11043

В таблице 6.13. приведены расчетные значения относительной аффинности соединения L-36 сравнительно с референсными препаратами.

Таблица 6.13.

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

Биомишень	K_{L-36}/K_{Ref}
Циклооксигеназа-1	1.40
Циклооксигеназа-2	1.00

Тромбоксан-А-синтаза	1.65
$K_{COX1\ L-36}/K_{COX2\ L-36}$	4.53

Наиболее аффинен L-36 к циклооксигеназе-2 и по данному критерию сопоставим с ацетилсалициловой кислотой. Следующей по аффинности к L-36 является тромбоксансинтетаза. Наименее аффинен L-36 к циклооксигеназе-1.

Сравнение констант связывания показывает, что L-36 в 4.53 раза менее аффинен к циклооксигеназе-1, чем к циклооксигеназе-2. В среднем по трем оценкам аффинности L-36 менее активен по сравнению с референсными препаратами. Антиагрегантное действие соединения L-36 предположительно определяется обратимым ингибированием циклооксигеназы-2, совместно с обратимым ингибированием тромбоксансинтетазы. В отношении циклооксигеназы-2 соединение L-36 примерно в 4 раза более активно, чем в отношении циклооксигеназы-1.

6.4. Антитромбогенные свойства соединения L-36

Существует несколько источников тромботического риска: острый коронарный синдром, после коронарного стентирования (активация местного тромботического риска по результатам стента), проявления хронических атеросклеротических заболеваний, сосудистые осложнения сахарного диабета, наследственные тромбофилии, онкоассоциированные тромбозы и др. [Saito Y., 2020; Thiele H., 2021]. Цереброваскулярные нарушения нередко являются следствием повышенного тромбообразования в сосудах головного мозга [Мирзоян Р.С., 2020]. Однако, используя имеющиеся на данный момент средства, сохраняется риск развития серьезных осложнений. В связи с различной эффективностью антиагрегантной терапии во многих клинических исследованиях подчеркивается значимость оценки ее эффективности и безопасности. Адекватное антитромбоцитарное воздействие обеспечивается не у всех пациентов, получающих антиагрегантные препараты. Для обозначения неэффективности терапии антиагрегантами используются термины: резистентность (в том числе генетическая нечувствительность [Космачева Е.Д., 2020]) к антиагрегантной терапии; высокая остаточная реактивность тромбоцитов. У пациентов наблюдаются вторичные рецидивирующие тромботические события, обильные кровотечения [Пряхин И.С., 2020]. Все это указывает на необходимость создания высокоэффективных антитромботических средств с минимальным риском подобных осложнений.

В данном разделе описаны антитромбогенные свойства нового производного тиадиазина соединения L-36 на различных моделях тромбоза, а также приведена оценка риска развития кровотечений на фоне применения данного вещества.

6.4.1. Антитромбогенная активность на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) и воздействием элетрического тока

Артериальные тромбозы являются важным фактором, который определяет исход заболеваний сердечно-сосудистой системы, формируются при высокой скорости кровотока в результате повреждения сосудистой стенки и состоят преимущественно из скоплений тромбоцитов, фиксированных между собой фибриновыми нитями (белые тромбы) [Quillard T., 2017]. Поэтому в рамках изучения специфической активности потенциальных антиагрегантных средств необходимо исследовать их антитромботическое действие на различных моделях артериальных тромбозов.

При обработке сонной артерии крыс раствором хлорида железа (III) происходит образование тромба, показателем которого является время полной окклюзии сосуда (остановка кровотока).

На первом этапе была изучена антитромботическая активность субстанции соединения L-36 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты при пероральном введении крысам в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo*. Среднее время окклюзии сонной артерии в контрольной группе животных, которым вводилась вода очищенная, составило 19,2 мин. При этом субстанция соединения L-36 в дозе 14,0 мг/кг способствовала удлинению времени образования тромба на 16,0%, в дозе 27,8 мг/кг – на 46,3% больше значений, полученных в контрольной группе животных. Дальнейшее увеличение дозы вещества L-36 до 55,6 мг/кг приводило к пролонгированию времени окклюзии каротидной артерии на 72,0%. Дозозависимое изучение антитромботической активности субстанции L-36 позволило рассчитать показатель ED₅₀, который составил 36,5 мг/кг (таблица 6.14). Препарат сравнения - ацетилсалициловая кислота в дозе 34,4 мг/кг повышала данный показатель до 20,8 мин., что на 16,8% больше показателя контрольной группы (таблица 6.14). Увеличение дозы ацетилсалициловой кислоты до 68,8 и 137,6 мг/кг приводило к статистически значимому пролонгированию времени наступления полной окклюзии сонной артерии на 35,7 и 63,6% соответственно. При этом ED₅₀ ацетилсалициловой кислоты составила 110,3 мг/кг (таблица 6.14).

Таким образом, субстанция соединения L-36 на данной модели артериального тромбоза проявила выраженную антитромботическую активность и по показателю ED₅₀ превосходила препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 3 раза.

Таблица 6.14.

Антитромботическая активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели артериального тромбоза сонной артерии крысы, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) при однократном внутривенном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии, мин	Δ% пролонгирования времени окклюзии сонной артерии	ED ₅₀ , мг/кг
1	Контроль		19,2±0,3		
2	L-36	14,0	22,3±0,5	16,0±2,8	36,5
		27,8	28,1±1,7*	46,3±8,8*	
		55,6	33,0±1,1*	72,0±5,5*	
3	Ацетилсалициловая кислота	34,4	20,8±1,3	16,8±7,1	110,3
		68,8	26,3±0,9*	35,7±4,7*	
		137,6	32,7±2,4*	63,6±16,4*	

*-различия статистически значимы по отношению к контролю (критерий one-way ANOVA, p≤0,01)

На втором этапе исследования было проведено моделирование тромбоза сонной артерии крыс электрическим током. Данная модель тромбоза позволяет воспроизвести максимально приближенное острое повреждение эндотелия, наблюдаемое в клинической практике [Marcinczyk N., 2021]. После воздействия постоянного электрического тока на сонную артерию крыс было зафиксировано среднее время окклюзии сосуда в группе контрольных животных, которое составило 14,7 мин. (таблица 6.15). Однократное внутривенное введение соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* способствовало пролонгированию времени полной окклюзии сонной артерии на 62,1 (p<0,05) и 33,2% (p<0,05) соответственно. Изучение соединения L-36 в дозах 14,0 и 55,6 мг/кг позволило выявить дозозависимое удлинение времени остановки кровотока в сонной артерии на 29,3 (p<0,05) и 91,6% (p<0,05), соответственно. Значение ED₅₀ для соединения L-36 на данной модели тромбоза составило 24,8 мг/кг (таблица 6.15). Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота

также проявил дозозависимое антитромботическое действие. Показатель ED₅₀ для референса составил 62,5 мг/кг (таблица 6.15).

Таблица 6.15.

Антитромботическая активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутрижелудочном введении (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии, мин	Δ% пролонгирования времени окклюзии сонной артерии	ED ₅₀ , мг/кг
1	Контроль		14,7±0,6		
2	L-36	14,0	19,0±0,6*	29,3±3,9*	24,8
3		27,8 ¹	23,8±0,9*	62,1±6,4*	
4		55,6	28,2±1,1*	91,6±7,3*	
5	Ацетилсалициловая кислота	17,2	15,9±0,3*	8,3±2,2*	62,5
		34,4 ¹	19,6±0,4*	33,2±2,8*	
		68,8	22,5±0,5*	53,1±3,3*	

1-дозы ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo*

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

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

6.4.2. Выживаемость мышей при моделировании адреналин-коллагенового тромбоза легких

Данные исследований антитромботической активности изученных веществ в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности при однократном внутрижелудочном введении представлены в

таблице 6.16. Субстанция соединения L-36 предотвращала гибель 70% животных по сравнению со 100% гибелью в контрольной группе. Ацетилсалициловая кислота уступала по активности соединению L-36, выживаемость животных при ее введении составила 40%. Часть животных, которые погибали на фоне введения соединений, при визуальном наблюдении после поступления в их организм тромботических агентов, были более активны, чем животные контрольной группы. У них наблюдалось уменьшение выраженности двигательных нарушений, при этом внешние проявления генерализованного тромбоза развивались постепенно (в течение 10-20 минут) в отличие от контрольной группы (1-2 минуты).

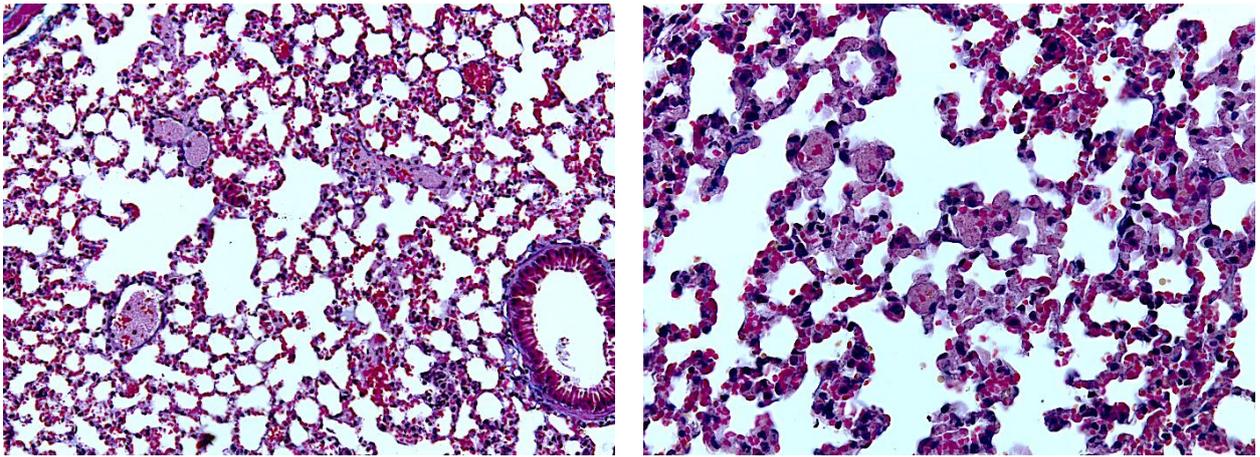
Таблица 6.16.

Выживаемость мышей на модели адреналин-коллагенового тромбоза при однократном внутрижелудочном введении соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты

№ п/п	Тестируемое соединение	Доза, мг/кг	Количество животных в группе	% выживаемости
1.	Контроль		10	0
2.	L-36	27,8	10	70,0*
3.	Ацетилсалициловая кислота	34,4	10	40,0*

*- различия статистически значимы по отношению к контролю, точный критерий Фишера ($p < 0,05$)

Микроскопическое исследование легочной ткани контрольных животных через 24 часа после индуцирования адреналин-коллагенового тромбоза показало, что в органе преобладали нарушения кровообращения, реализованные кровоизлияниями очагового характера, венозным полнокровием, геморрагическим экссудатом в стенках и просветах альвеол. В значительной части сосудов микроциркуляторного русла выявляли эритроцитарные сладжи. При изучении парафиновых срезов легочной ткани, окрашенных по Carstairs, были обнаружены многочисленные фибрин-содержащие тромбы, которые обтурировали просветы крупных сосудов (рисунок 6.8-А) и просветы сосудов микроциркуляторного русла легочной ткани (рисунок 6.8-Б).



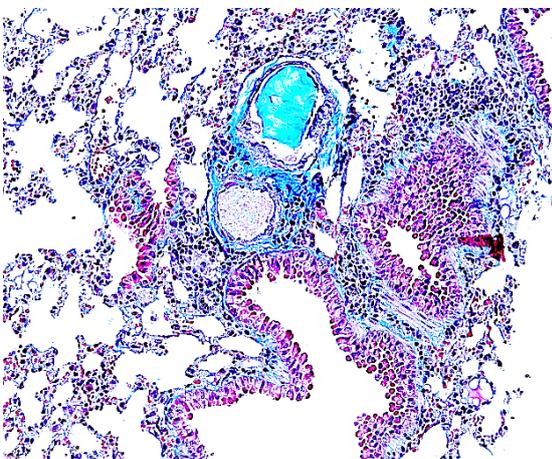
А

Б

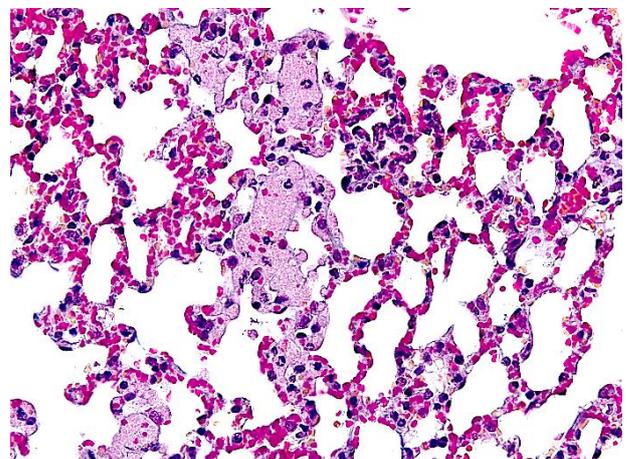
Рисунок 6.8. Легочная ткань контрольного животного через 24 часа после моделирования адреналин-коллагенового тромбоза.

Трихромная окраска по Carstair. Общее увеличение $\times 200$ (А); $\times 400$ (Б)

У мышей, получавших ацетилсалициловую кислоту на фоне адреналин-коллагенового тромбоза, в легочной ткани отмечали выраженные признаки дистелектаза: эмфизематозно расширенные альвеолы чередовались со спавшими альвеолами. В просвете части альвеол присутствовал преимущественно геморрагический экссудат, а часть сосудов была перекрыта сладжированными эритроцитам. Отмечали выраженное утолщение межальвеолярных перегородок, обусловленное экссудативными явлениями серозного и серозно-геморрагического характера. При изучении парафиновых срезов легочной ткани, окрашенных по Carstair, в просвете сосудов были обнаружены коллагеновые депозиты (рисунок 6.9-А). В большинстве случаев агрегированные нити фибрина откладывались в просвете сосудов микроциркуляторного русла легочной ткани (рисунок 6.9-Б).



А



Б

Рисунок 6.9. Легочная ткань животного, получавшего ацетилсалициловую кислоту, через 24 часа после введения на модели адреналин-коллагенового тромбоза.

Трихромная окраска по Carstair. Общее увеличение $\times 200$ (А); $\times 400$ (Б).

Микроскопическое исследование легочной ткани у мышей, получавших вещество L-36, показало, что признаки нарушения кровообращения выражались преимущественно кровоизлияниями очагового характера, венозным полнокровием, а также диапедезом эритроцитов в межальвеолярные перегородки. При этом гистоархитектоника легочной ткани подопытных животных соответствовала нормальным гистологическим критериям. Окрашивание парафиновых срезов легочной ткани подопытных мышей трихромной окраской по Carstair показало, что у большинства животных тромбы, в состав которых входили нити фибрина, встречались в единичном экземпляре. В основном просветы сосудов обтурировали сладжированные эритроциты (рисунок 6.10-А). Так же разрозненные фибриновые депозиты откладывались в просвете альвеол в составе смешанного экссудата (рисунок 6.10-Б).

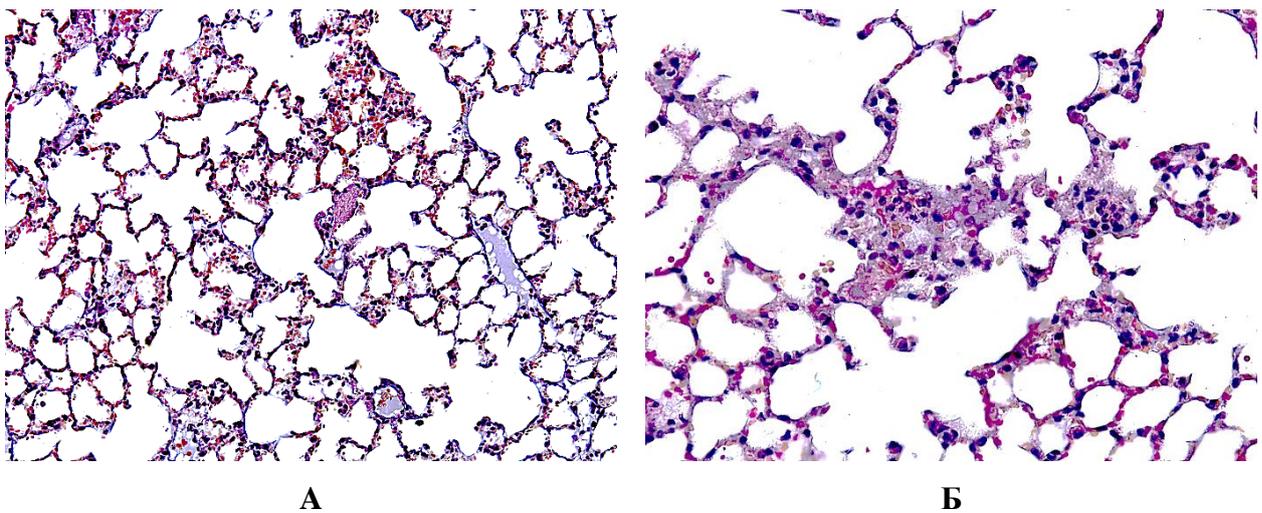


Рисунок 6.10. Легочная ткань животного, получавшего соединение L-36, через 24 часа после моделирования адреналин-коллагенового тромбоза.

Трихромная окраска по Carstair. Общее увеличение $\times 200$ (А); $\times 400$ (Б).

Таким образом, согласно результатам патоморфологического исследования, введение вещества L-36 нивелировало основные признаки нарушения кровообращения в легочной ткани, обусловленные введением тромбующей смеси адреналина и коллагена. При этом, терапевтическая эффективность вещества L-36 относительно ацетилсалициловой кислоты была выше. Это подтверждает и тот факт, что процент выживаемости на данной модели тромбоза в

группе животных, получавших соединение L-36, был в 1,8 раза выше, чем в группе животных, получавших ацетилсалициловую кислоту.

6.4.3. Антитромбогенное действие на модели тромбоза нижней полой вены

В венозной системе частота встречаемости и риск фатальных осложнений процессов тромбообразования не уступает артериальным [Qu S.W., 2021]. Венозная тромбоэмболия становится все более признанной причиной заболеваемости и смертности среди госпитализированных пациентов, в том числе молодых лиц [Abood K.K., 2019]. Применение антитромбогенных средств также является ключевым аспектом терапии венозных тромбозов [Streiff M.B., 2016]. При моделировании тромбоза нижней полой вены крыс было установлено, что средняя масса тромбов, экстрагированных из сосуда, составила 109,5 мг (таблица 6.17). В группе животных, получавших соединение L-36, масса тромбов составила в среднем 29,3 мг, причем у 2 крыс из 6 при проведении тромбэктомии не было обнаружено сгустков, обтурирующих просвет сосуда. В значительно меньшей степени проявила активность ацетилсалициловая кислота. Средняя масса тромбов на фоне препарата сравнения составила 72,3 мг.

Таблица 6.17.

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

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

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

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

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

6.4.4. Заключение

На основании данных по изучению антитромботической активности было установлено, что соединение L-36 превосходит по действию препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного хлоридом железа (III) – в 3 раза, электрическим током – в 2,5 раза. При моделировании тромбозов легочных артерий было показано, что соединение L-36 способствует увеличению выживаемости животных до 70%. По способности предотвращать процессы тромбообразования в венозной системе соединение L-36 превосходит по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2,5 раза.

6.5. Влияние соединения L-36 на время кровотечения

Вмешательство в функциональную активность тромбоцитов сопровождается увеличением риска развития кровотечений [Lewis S.R., 2018]. Поддержка баланса между эффективностью антитромботической терапии и ее безопасностью является неотъемлемой частью современной кардиологии, и прежде всего с позиций минимизации кровотечений [Заболотских И.Б., 2019]. Наиболее распространенными являются кровотечения отделов ЖКТ, зачастую протекающие бессимптомно [Отдельнов Л.А., 2020]. Люди, которые принимают антитромбоцитарные средства, подвергаются повышенному риску неблагоприятных событий и при проведении оперативных вмешательств [Lewis S.R., 2018]. Поэтому оценка риска развития данного осложнения является обязательной на доклиническом этапе изучения антиагрегантных средств.

В контрольной группе животных, получавших растворитель – воду очищенную, время от момента отсекания кончика хвоста до полной остановки кровотечения составило 158,7 секунды (таблица 6.18). При изучении тестируемых образцов на данный параметр установлено, что в опытных группах происходило удлинение времени кровотечения. Данный факт свидетельствует о наличии антиагрегантных свойств исследуемых веществ. Однократное внутрижелудочное

введение соединения L-36 способствовало пролонгированию времени кровотечения на 34,8% ($p < 0,05$), в то время как препарат сравнения ацетилсалициловая кислота удлинял данный параметр на 58,9% ($p < 0,05$).

Таблица 6.18.

Влияние соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты, в дозах ED_{50} антиагрегантной активности *in vivo*, на время кровотечения их хвостовой вены мышей ($M \pm SEM$) ($n=10$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время кровотечения, сек	$\Delta\%$ пролонгирования времени кровотечения
1	Контроль		158,7 \pm 10,5	
2	L-36	27,8	213,9 \pm 9,0*	34,8 \pm 5,7*#
3	Ацетилсалициловая кислота	34,4	252,1 \pm 11,6*	58,9 \pm 7,3*

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

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

Удлинение времени кровотечения является показателем не только эффективности, но и безопасности потенциального средства. В ходе проведенного исследования было установлено, что соединение L-36 достоверно пролонгирует время кровотечения относительно контрольной группы животных. Однако, по данному показателю исследуемое вещество уступает по активности препарату сравнения в 1,2 раза, что может свидетельствовать о более низком риске развития такого побочного эффекта как кровотечение, при наличии выраженных антитромбогенных свойств.

6.6. Консенсусная оценка *in silico* ADMET характеристик соединения L-36

Для соединения L-36 был выполнен консенсусный прогноз степени лекарственного подобия. Прогноз проводился с использованием программного обеспечения DruliTo [Drug Likeness, 2015] и PASS [Филимонов Д.А., 2006], а также on-line ресурсов SwissADME [Daina A., 2017] и ADMETlab 2.0 [Xiong G., 2021].

Для прогнозируемого соединения по каждому вычисляемому в используемой программе параметру характеристики, в соответствии с рассчитанным значением этого параметра, устанавливался индекс отсутствия/наличия лекарственного подобия: 0 – отсутствует; 1 – присутствует.

Ниже приведены программы, с помощью которых выполнялся прогноз, параметры, вычисляемые в каждой программе, а также граничные значения для индексирования расчетных величин параметров лекарственного подобия:

1. DruliTo: розовая – 0, зеленая – 1.
2. SwissADME: “Yes” – 1, “No” – 0.
3. ADMETlab: красная – 0, зеленая – 1.
4. PASS: Drug-likeness – значение.

В соответствии с общей методикой [Васильев П.М., 2020], для соединения L-36 был выполнен консенсусный прогноз следующих токсикологических свойств: острой токсичности по методике [Васильев П.М., 2020], канцерогенности по методике [Васильев П.М., 2020], мутагенности, генотоксичности, гепатотоксичности, цитотоксичности, иммунотоксичности, кардиотоксичности, нефротоксичности, нейротоксичности, гематотоксичности и способности проникать через ГЭБ.

Прогноз указанных 12 токсикологических ADMET-характеристик для данного соединения проводили с использованием четырех компьютерных систем Microcosm ADMET [Васильев П.М., 2020], IT Microcosm [Vassiliev P.M., 2014], PASS [Филимонов Д.А., 2006], QikProp [QikProp, 2012] и шести on-line ресурсов ProTox II [Banerjee P., 2018], pkCSM [Pires D.E.V., 2015], ADMET-PreServ [Radchenko E.V., 2016], SwissADME [Daina A., 2017], GUSAR [Lagunin A., 2011], GEB [Raevsky O.A., 2013].

В соответствии с общей методикой [Васильев П.М., 2020], для вещества L-36 был проведен консенсусный прогноз следующих фармакокинетических свойств: 1) способности связываться с белками плазмы крови; 2) способности к пассивному транспорту на клетках аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2; 3) способности к пассивному транспорту на клетках Мадин-Дарби почек собаки MDCK; 4) способности к активному транспорту из клетки посредством Р-гликопротеина; 5) всасываемости через ЖКТ; 6) способности выводиться почками посредством транспортера органических катионов OCT2; 7) способности метаболизироваться печеночными CYP450; 8) кажущегося объема распределения; 9) общего клиренса; 10) времени полувыведения.

Прогноз 10 вышеперечисленных фармакокинетических ADMET-характеристик

выполняли с применением трех компьютерных программ PASS [Филимонов Д.А., 2006], Microcosm ADMET [Васильев П.М., 2020] и QikProp [QikProp, 2012], а также четырех on-line ресурсов pkCSM [Pires D.E.V., 2015], SwissADME [Daina A., 2017], ADMET-PreServ [Radchenko E.V., 2016] и ADMETlab [Xiong G., 2021].

6.6.1. ADMET-характеристики токсикологического профиля

В результате консенсусной оценки лекарственного подобия соединения L-36 в системах DruliTo, SwissADME, ADMETlab и PASS было установлено, что исследуемое вещество характеризуется высоким значением индекса лекарственного подобия 0,792 (таблица 6.19). Вычисляемый параметр отражает потенциальную принадлежность нового оригинального соединения к группе лекарственных средств.

Таблица 6.19.

Консенсусная интегральная оценка лекарственного подобия соединения L-36

Тестируемый образец	Консенсусный прогноз лекарственного подобия				
	DruliTo	SwissADME	ADMETlab	PASS	Int _{DL}
L-36	0,375	1,000	1,000	0,251	0,792

Примечание.

Int_{DL} – консенсусный интегральный индекс лекарственного подобия

Оценка токсикологического профиля была проведена по 12 параметрам (рисунок 6.11). В ходе консенсусного анализа было выявлено, что для соединения L-36 характерно слабовыраженное канцерогенное и кардиотоксическое действие, Ind_{Ток} 0,333 и 0,375 соответственно. Наиболее токсичным, по результатам прогноза, соединение L-36 является в отношении иммунной системы. Консенсусный индекс безопасности составил 1,000. Это означает, что во всех базах данных, используемых для прогнозирования, соединение L-36 являлось иммунотоксичным с индексом безопасности 1,000. При исследовании уровня безопасности соединения L-36 по параметрам острая токсичность, мутагенность, генотоксичность, гепатотоксичность, цитотоксичность, нефротоксичность, нейротоксичность и

гематотоксичность было показано, что консенсусный индекс безопасности в каждом случае равен 0,000. Расчетный показатель при изучении способности проникать через ГЭБ составил 0,5, что может указывать на наличие способности у соединения L-36 оказывать свое действие в ЦНС.



Рисунок 6.11. Консенсусная интегральная оценка общей безопасности (Ind_{Tox}) соединения L-36

В таблице 6.20. представлены результаты прогноза острой токсичности для соединения L-36 при различном способе введения. Как видно из результатов прогноза тестируемое соединение можно отнести к 4 классу токсичности. Стоит отметить также, что полученные данные согласуются с экспериментальными данными, полученными в 3 главе.

Таблица 6.20.

Прогноз значений LD_{50} при различных способах введения в системе GUSAR

№ п/п	Тестируемый образец	Путь введения	Значение LD_{50} , мг/кг
1	L-36	Внутрибрюшинно	188,8
2		Внутривенно	130,8
3		Перорально	662,7
4		Подкожно	578,1

Общий консенсусный индекс безопасности для соединения L-36 равен 0,184, что указывает на высокий уровень лекарственной безопасности и принадлежность к 4 классу токсичности. Способность соединения L-36 проникать через ГЭБ может указывать на наличие влияния тестируемого образца на нейроны.

6.6.2. ADMET-прогноз фармакокинетических параметров

Расчет фармакокинетических характеристик для соединения L-36 производился по 12 параметрам (таблица 6.20). Согласно данным прогноза для соединения L-36 характерно отсутствие либо низкая способность связываться с белками плазмы крови. С использованием модели клеточной линии Мадин-Дарби почек собаки MDCK было установлено, что для исследуемого соединения характерна низкая мембранная проницаемость, что подтверждают данные по расчету почечного клиренса для соединения L-36, который составил 0,022 мл/мин/кг. Всасываемость из ЖКТ тестируемого соединения по данным прогноза составляет 100%. Однако, в случае исследования мембранной проницаемости соединения L-36 на виртуальной модели клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2 было зафиксировано значение индекса 0,000, которое указывает на отсутствие способности абсорбироваться в ЖКТ. К недостаткам применения данного метода можно отнести то, что при изучении проницаемости на клеточной культуре, в отличие от исследований на живых организмах и изолированных тканях, не учитывается влияние физиологических факторов: желудочно-кишечного сока, моторики желудочно-кишечного тракта, различие в экспрессии транспортеров, значении трансэпителиального электрического сопротивления и др. Таким образом, данный критерий можно считать спорным. Биологическая трансформация соединения L-36 происходит, вероятнее всего, с участием ферментов семейства цитохрома P450. Установлено также, что предпочтительный путь выведения соединения L-36 с желчью. Объем распределения и период полувыведения составили 0,771 л/кг и 5,168 ч соответственно.

Консенсусная интегральная оценка фармакокинетической предпочтительности соединения L-36

№ п/п	Параметр	Значение
1	Связывание с белками плазмы крови	Ind _{PK} = 0,000
2	Пассивная межклеточная проницаемость на клетках Мадин-Дарби почек собаки MDCK	Ind _{PK} = 0,000
3	Всасываемость через желудочно-кишечных тракт	100%
4	Способность метаболизироваться печеночными CYP450	Ind _{PK} = 0,324
5	Общий клиренс	0,402 мл/мин/кг
6	Почечный клиренс	0,022 мл/мин/кг
7	Печеночный клиренс	2,575 мл/мин/кг
8	Пассивная мембранная проницаемость на клетках аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2	Ind _{PK} = 0,000
9	Активный транспорт из клетки посредством Р-гликопротеина	Ind _{PK} = 0,000
10	Способность выводиться почками посредством транспортера органических катионов OCT2	Ind _{PK} = 0,000
11	Объем распределения	0,771 л/кг
12	Период полувыведения	5,168 ч

Примечание:

Ind_{PK} – консенсусный интегральный индекс фармакокинетической предпочтительности

6.6.3. Заключение

На основании проведенного консенсусного прогноза с применением методов искусственного интеллекта было установлено, что соединение L-36 характеризуется высоким значением консенсусного интегрального индекса лекарственного подобия $Int_{DL} = 0.792$. В токсикологическом плане для соединения L-36 характерна выраженная иммунотоксичность, а также умеренная кардиотоксичность и канцерогенность. Оценка токсикологических свойств соединения L-36 позволила отнести его к 4 классу малотоксичных соединений. Данные по прогнозу острой токсичности согласуются с результатами исследования на мышах, описанными в главе 3. Консенсусный интегральный индекс общей безопасности Int_{Tox} для соединения L-36 составил 0.184.

С помощью нейросетевого моделирования были спрогнозированы некоторые фармакокинетические параметры соединения L-36. Было показано, что для исследуемого соединения характерна 100% всасываемость в ЖКТ, низкая степень связывания с белками плазмы, а также умеренная способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Кроме того, было определено, что наиболее предпочтительным путем выведения соединения L-36 из организма является желчь.

6.7. Заключение

В ходе изучения влияния соединения L-36 на различные этапы тромбообразования было показано, что антиадгезивные свойства к коллагену характерны для исследуемого вещества только в высоких концентрациях, что позволяет исключить блокирующее влияние на гликопротеин VI тромбоцитов. Адгезия тромбоцитов к эндотелию сосудов влечет за собой их активацию и секрецию содержимого гранул хранения, с целью привлечения близлежащих кровяных пластинок в процесс клотинга. Рецептором активации циркулирующих тромбоцитов выступает $P2Y_1$ подтип пуриновых рецепторов, физиологическим агонистом которого служит АДФ. Селективный блокатор данного подтипа рецепторов MRS-2179 в концентрации 1 мкМ ингибировал активацию тромбоцитов, стимулированную 70 нМ АДФ на 91%, в то время как исследуемое соединение L-36 в той же концентрации проявляло ингибирующее влияние на 10,3%. Учитывая сохраняющуюся высокую способность тромбоцитов к активации в присутствии

соединения L-36 можно сделать вывод, что данное вещество не обладает P2Y₁-блокирующей активностью.

Таким образом, наличие высокой антиагрегантной активности у соединения L-36 не связано с влиянием на ранние этапы процесса агрегации.

С целью увеличения массы сгустка тромбоциты секретируют различные биологически активные молекулы (АДФ, АТФ, тромбоксан А₂ и др.). В ходе изучения данного процесса было установлено, что уровень высвободившейся АТФ из тромбоцитов, стимулированных тромбином, составил 65,4 нМ. Соединение L-36 и ацетилсалициловая кислота способствовали снижению секреции АТФ, что подтверждает наличие антиагрегантных свойств. Однако, по способности подавлять выброс АТФ соединение L-36 превосходило препарат сравнения в 14,1 раза.

АДФ-опосредованная активация рецептора P2Y₁₂ необходима для усиления агрегации тромбоцитов и, таким образом, образования тромбов. Воздействие высоких концентраций АДФ (>200 нМ) на тромбоциты опосредуются главным образом G-белок-связанной активацией рецептора P2Y₁₂, что приводит к стойкой агрегации тромбоцитов, тогда как P2Y₁ (АДФ <200 нМ) отвечает за начальную слабую, переходную фазу агрегации тромбоцитов [Ajjan R.A., 2021]. О значимости рецепторов к регуляторным пуринам свидетельствуют факты широкого и эффективного применения блокаторов рецепторов P2Y₁₂ в неотложной кардиологии [Баринов Э.Ф., 2014]. Широко применяемое в клинической практике лекарственное средство клопидогрел на 67,8% подавлял P2Y₁₂-опосредованную агрегацию тромбоцитов, в то время как исследуемое соединение продемонстрировало более низкую активность - на уровне 17,0%. Это позволяет сделать вывод об отсутствии у соединения L-36 выраженных P2Y₁₂-блокирующих свойств.

На поверхности мембраны тромбоцитов экспрессируются тромбоксановые рецепторы, лигандом которых служит мощный активатор тромбоцитарного звена гемостаза тромбоксан А₂. Известно, что данный агент принимает активное участие в формировании сгустков в артериальном русле. Поэтому поиск средств, ингибирующих биосинтез тромбоксана А₂ и/или блокирующих рецепторы к тромбоксану, является актуальным [Ajjan R.A., 2021]. При действии на суспензию отмытых тромбоцитов селективного агониста тромбоксановых рецепторов было зафиксировано увеличение амплитуды агрегации кровяных пластинок до 45,7 отн. ед. Инкубация суспензии тромбоцитов с раствором соединения L-36 в конечной концентрации 100 мкМ способствовала снижению кривой светопропускания до 39,8 отн. ед., что на 12,8% ниже значений, полученных в контроле. Блокатор тромбоксановых рецепторов ридогрел ингибирует агрегацию тромбоцитов данным агонистом со значением IC₅₀ 1,2 мкМ [Hoet B., 1990]. Таким образом, антиагрегантное действие соединения L-36 не связано с угнетением активности тромбоксановых рецепторов тромбоцитов.

Тромбоксан A_2 является клинически важным метаболитом арахидонового каскада, образующимся через циклооксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты. Стабильным метаболитом тромбоксана A_2 является тромбоксан B_2 , который длительное время циркулирует в крови и экскретируется с мочой [van der Plas A., 2018], что дает возможность оценить его концентрацию. Тромбоциты интактных животных, после стимуляции арахидоновой кислотой, увеличивали синтез тромбоксана A_2 до 170,9 пкг/мл. Исследуемое соединение L-36 и ацетилсалициловая кислота дозозависимо способствовали снижению уровня тромбоксана A_2 в плазме крыс. По показателю ED_{50} соединение L-36 в 2 раза превосходило по активности препарат сравнения. Это дало основание предполагать наличие у исследуемого соединения механизма действия, связанного с угнетением синтеза тромбоксана A_2 . Методом молекулярного моделирования *in silico* установлено, что соединение L-36 обладает аффинностью к ферменту тромбоксансинтетазе и циклооксигеназе-2, что может обуславливать его не только антиагрегантные, но и противовоспалительные свойства.

Увеличение тромбогенного потенциала крови наблюдается в условиях изменения нормальной функции эндотелия сосудов. При моделировании дисфункции эндотелия внутривенным введением раствора липополисахарида было зафиксировано значительное достоверное увеличение таких биомаркеров, как эндотелин-1 и фактор Виллебранда. Тестируемый образец L-36, в дозе ED_{50} антиагрегантной активности, в условиях ЛПС-индуцированной дисфункции эндотелия способствовал угнетению выброса эндотелина-1 на 34,8% и фактора Виллебранда на 56,5%. Такое действие на маркеры эндотелиальной дисфункции позволяет предполагать наличие у исследуемого образца эндотелиопротективных свойств. В свою очередь, ацетилсалициловая кислота не оказывала выраженного влияния на данные биомаркеры.

Каждая из стадий активации тромбоцитарного звена сопровождается повышением концентрации цитозольного кальция в тромбоцитах [Cabrera D., 2020]. Увеличение внутриклеточного пула ионов кальция из депо хранения (дегрануляция плотных гранул) наблюдается при активации как адгезивных рецепторов тромбоцитов (VI, Ib-IX-V), так и рецепторов к физиологическим лигандам, усиливающим процессы агрегации (PAR-1, PAR-4, P2Y-рецепторы, тромбоксановые рецепторы и др.). В экспериментах с использованием флуоресцентного зонда было установлено, что соединение L-36 в значительной степени способствует ингибированию внутриклеточного пула ионов кальция, что также говорит о его способности подавлять функциональную активность тромбоцитов.

Влияние исследуемого соединения L-36 на различные мишени тромбоцитарного звена гемостаза

№ п/п	Мишень	Влияние соединения L-36	Влияние ацетилсалициловой кислоты	Влияние клопидогрела
1	Гликопротеин VI	-	-	-
2	P2Y ₁ -рецепторы	-	-	-
3	P2Y ₁₂ -рецепторы	-	-	+
4	Тромбоксановые рецепторы	-	-	-
5	Синтез ТхА ₂	+	+	-
6	Секреция АТФ	+	-	-
7	Секреция Са ²⁺	+	-	-
8	Эндотелин-1	+	-	-
9	Фактор фон Виллебранда	+	-	-

Примечание:

+ наличие влияния

- отсутствие влияния

Таким образом, проведенное исследование по изучению влияния соединения L-36 на различные стадии и мишени тромбоцитарного звена гемостаза позволяет заключить, что механизмом антиагрегантного действия данного соединения является ингибирование каскада превращения арахидоновой кислоты. Также, в условиях дисфункции эндотелия соединение L-36 проявляет эндотелиопротективные свойства. Ингибирующее влияние на фактор Виллебранда в условиях развившейся эндотелиальной дисфункции дополнительно обуславливает антитромботические свойства исследуемой молекулы в условиях высоких скоростей сдвига (в артериальном русле).

При изучении антитромбогенных свойств соединения L-36 было установлено, что данное соединение проявляет выраженный антитромботический эффект на различных моделях тромбоза. Так, при моделировании тромбоза сонной артерии крыс, различными тромбующими агентами, было показано, что по значению ED₅₀ соединение L-36 превосходит по активности ацетилсалициловую кислоту в 3 раза на модели окклюзии каротидной артерии поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) и в 2,5 раза при воздействии на сонную артерию электрического тока. Введение тромбующей смеси адреналина и коллагена в хвостовую вену мышей способствует развитию тромбоза легочных артерий. В этих условиях показано, что

соединение L-36 увеличивает процент выживаемости мышей в 1,8 раза в сравнении с ацетилсалициловой кислотой. Кроме того, при гистологическом исследовании тканей легких мышей было установлено, что введение вещества L-36 нивелировало основные признаки нарушения кровообращения в легочной ткани, обусловленные введением тромбующей смеси. При этом, терапевтическая эффективность вещества L-36 относительно ацетилсалициловой кислоты была выше. Применение антитромбогенных средств также является ключевым аспектом терапии венозных тромбозов [Streiff M.B., 2016]. По способности препятствовать увеличению массы тромбов в системе нижней полой вены соединение L-36 было значительно эффективнее препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. Средняя масса тромбов, извлеченных из нижней полой вены крыс после суточной окклюзии, на фоне однократного внутривенного введения соединения L-36 была в 2,5 раза ниже значений, полученных в группе референсного препарата.

Изучение антитромбогенных свойств соединения L-36 позволяет заключить, что исследуемое вещество в значительной степени обладает способностью предотвращать процессы тромбообразования как в артериальном, так и в венозном русле.

Важным аспектом в исследовании соединения L-36 явилось изучение влияния данного вещества на время кровотечения, поскольку это одно из самых распространенных побочных явлений на фоне применения антитромбоцитарной терапии. В экспериментах на мышах было показано, что соединение L-36 способствует пролонгированию времени кровотечения из хвостовой вены. Это подтверждает влияние данного тестируемого образца на систему гемостаза. Однако, по способности удлинять время кровотечения соединение L-36 уступало препарату сравнения ацетилсалициловой кислоте в 1,7 раза. Это позволяет, при наличии выраженных антиагрегантных и противотромботических свойств, предполагать меньшую степень риска развития данного побочного эффекта при введении соединения L-36.

На основании данных консенсусного прогноза с использованием методов искусственного интеллекта был определен профиль лекарственной безопасности соединения L-36 и установлена принадлежность к 4 классу токсичности, а также произведены расчеты некоторых фармакокинетических параметров.

Проведенный комплекс исследований показывает, что производные тиадиазина являются перспективным классом для поиска и создания на их основе высоко активных, в отношении агрегации тромбоцитов, молекул. Производное 1,3,4-тиадиазина соединение L-36 обладает выраженными антиагрегантными и антитромбогенными свойствами, а также проявляет эндотелиопротективное действие в условиях эндотелиальной дисфункции.

ГЛАВА 7. АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ Ф-168, RU-891 и L-36 В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЦИТОКИНЕМИИ

Активация тромбообразования предположительно является адаптивной на ранней стадии некоторых инфекций, но продолжающееся воспаление может быстро привести к пагубной гипервоспалительной реакции, опосредованной «цитокиновым штормом» (гиперцитокинемией) и синдромом активации макрофагов [Hanff T.C., 2020; Tataru A.M., 2022]. Впервые «цитокиновый шторм» был описан в 1993 году Дж. Л. Феррарой и соавт., как хаотическое патофизиологическое состояние, сопровождающее пересадку органов [Ferrara J.L., 1993]. Однако, первой описанной причиной подобной реакции был сепсис. Понимание того, что последствиями сепсиса является именно иммунный ответ относится к наблюдениям У. Ослера в 1904 году [Behrens E.M., 2017]. Состояние гиперцитокинемии характеризуется увеличением провоспалительных цитокинов в крови пациента включая фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкин (IL)-2R, IL-6, IL-8 и др. Циркулирующие цитокины активируют макрофаги, моноциты и нейтрофилы путем паракринных или аутокринных эффектов и могут провоцировать увеличение тромбогенного потенциала крови [Hanff T.C., 2020; Obi A.T., 2021]. Механизмы, которые потенциально могут вызвать тромботические явления на фоне сепсиса, включают повышение вязкости плазмы, активацию прокоагулянтных факторов, вазоспазм, аутоиммунный васкулит и увеличение количества тромбоцитов [Guo Y., 2018].

Известно, что тромбоциты взаимодействуют с вирусами и могут служить их временными переносчиками [Gorski A., 2020]. Противовирусные средства вошли во многие клинические рекомендации по ведению пациентов с COVID-19, основным осложнением которого было развитие тромботических событий, приводящих к полиорганной недостаточности и высокой летальности [Alhazzani W., 2020]. Беря во внимание, что на фоне сепсиса имеется высокий риск иммуноопосредованного тромбоза, представилось интересным провести изучение эффективности некоторых противовирусных средств в условиях экспериментального сепсиса.

7.1. Молекулярные основы увеличения тромбогенного потенциала крови в условиях гиперцитокинемии

Цитокины играют ключевую роль в координации противомикробных эффекторных клеток и обеспечении регуляторных сигналов, которые направляют, усиливают и разрешают

иммунный ответ. Цитокины имеют короткие периоды полураспада, что обычно предотвращает их воздействие за пределы лимфоидной ткани и места воспаления. Избыточная продукция цитокинов приводит к гиперинфламации и полиорганной недостаточности [Fajgenbaum D.C., 2020]. Повышенные уровни цитокинов способствуют развитию эндотелиальной дисфункции, повреждению сосудов и паракринной/метаболической дисрегуляции, тем самым повреждая системы нескольких органов. Уровни цитокинов острого ответа (TNF и IL-1 β) и хемотаксических цитокинов (IL-8 и MCP-1) повышаются на ранней стадии гиперцитокинемии, способствуя устойчивому увеличению IL-6. IL-6 связывается либо с мембраносвязанным рецептором IL-6 (mIL-6R), либо с растворимым рецептором IL-6 (sIL-6R), образуя комплекс, который действует на гликопротеин 130, регулирует уровни IL-6, MCP-1 и GM-CSF через преобразователь и активатор сигнала янус-киназного пути транскрипции (JAK-STAT) и, таким образом, обуславливает воспалительные процессы [Bhaskar S., 2020].

Тромбовоспаление (скоординированная активация воспалительных и тромботических реакций) является основной причиной заболеваемости и смертности у пациентов с гиперцитокинемией [Gu S.X., 2021]. Нейтрофилы играют важную роль во врожденном иммунном ответе организма, вызванном инфекцией. Чрезмерная активация нейтрофилов может привести к развитию синдромов полиорганной дисфункции [Chen Z., 2021]. Исследования показывают, что внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) и микрочастицы, полученные из нейтрофилов, способствуют тромбозу. Нетоз-это процесс, во время которого нейтрофилы подвергаются новой форме запрограммированной гибели клеток и высвобождают NETs. Этот процесс происходит медленно и может занять до нескольких часов. Во время нетоза нейтрофилы подвергаются деконденсации хроматина, которая зависит от пептидиларгининдейминазы (PAD4) и других нейтрофильных ферментов. Хотя это предотвращает внутрисосудистое распространение инфекции, чрезмерная активация может привести к патологическому тромбозу (иммунотромбоз).

Миграция нейтрофилов к месту инфекции вызывается медиаторами воспаления, которые усиливают эндотелиальную экспрессию E- и P-селектинов на эндотелиальных клетках, вызывая адгезию нейтрофилов. Впоследствии хемокины влияют на нейтрофилы, экспрессируя интегрины, которые связываются с ICAMS на эндотелии и проникают в инфицированную ткань. Широкий спектр стимулов, помимо бактерий или грибов, таких как интерлейкин-8 (IL-8), липополисахарид (LPS), активированные тромбоциты или эндотелиальные клетки, кристаллы урата натрия и различные аутоантитела, могут спровоцировать нетоз. Эти триггеры приводят к образованию активных форм кислорода через восстановленную никотинамидадениндинуклеотидфосфатную (NADPH) оксидазу, которая играет ключевую роль в высвобождении NETs. Одно из первых морфологических изменений, наблюдаемых во время

нетоза, ядерный отек, вызываемый PAD4. PAD4 необходим для инициации нетоза, поскольку он гиперцитруллирует остатки аргинина на гистонах H3 и H4, что приводит к потере их положительного заряда и, таким образом, вызывает деконденсацию хроматина [Karoo S., 2018]. Гистоны активируют тромбоциты, а активация тромбоцитов, в свою очередь, способствует немедленному тромбообразованию. Инфузия гистонов приводит к образованию богатых тромбоцитами микротромбов в экспериментальной модели, подобной сепсису [Xu J., 2009]. Гистоны токсичны и приводят к вакуолизации эндотелиальных и эпителиальных клеток и к гибели клеток, и эта токсичность опосредована Toll-подобными рецепторами 2 и 4 [Martinod K., 2014].

7.2. Влияние соединения Ф-168 на функциональную активность тромбоцитов в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации

На первом этапе исследования производили оценку антиагрегантных свойств соединений в цельной крови кроликов. Препарат сравнения при добавлении в цельную кровь в концентрации 100 мкМ оказывал блокирующее влияние на процессы агрегации тромбоцитов на 52,8% ($p < 0,05$). В конечной концентрации 10 мкМ ацетилсалициловая кислота способствовала снижению функциональной активности тромбоцитов на 19,7% ($p < 0,05$). Дальнейшее уменьшение концентрации референсного препарата способствовало недостоверному ингибированию агрегации тромбоцитов на 7,6%. Величина IC_{50} при этом составила 107,0 мкМ (таблица 7.1). Производное ксантина соединение Ф-168 в концентрации 100 мкМ ингибировало процессы агрегации тромбоцитов на 78,8% ($p < 0,05$). Уменьшение конечной концентрации вещества Ф-168 до 10 и 1 мкМ позволило выявить блокирующее влияние исследуемого соединения в отношении агрегации тромбоцитов на 30,2 ($p < 0,05$) и 22,2% ($p < 0,05$) соответственно. Значение IC_{50} для соединения Ф-168 при этом составило 16,7 мкМ (таблица 7.1).

Таблица 7.1.

Антиагрегантная активность соединений Ф-168 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* в цельной крови кроликов ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	Ф-168	78,8±9,1*	30,2±4,7*	22,2±4,5*	16,7

2	Ацетилсалициловая кислота	52,8±5,0*	19,7±4,0*	7,6±2,5	107,0
---	---------------------------	-----------	-----------	---------	-------

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

Таким образом, изучение антиагрегантных свойств соединений-лидеров в цельной крови подтвердило наличие у них выраженной активности, что согласуется с данными полученными ранее (глава 2).

На втором этапе исследования была проведена оценка антиагрегантной активности соединения Ф-168 в условиях гиперцитокинемии. В цельной крови, обработанной раствором липополисахарида, соединение Ф-168 в концентрации 100 мкМ способствовало снижению амплитуда агрегации тромбоцитов на 23,8 (таблица 7.2). Препарат сравнения в концентрации 100 мкМ способствовал снижению цитокиновой гиперагрегации на 83,2% ($p < 0,05$). При инкубации цельной крови, обработанной липополисахаридом, с 10 мкМ ацетилсалициловой кислоты наблюдалось снижение амплитуды агрегации тромбоцитов на 52,4% ($p < 0,05$). В концентрации 1 мкМ исследуемый препарат способствовал недостоверному ингибированию агрегации тромбоцитов на 3,2%. Значение IC_{50} при этом составило 12,4 мкМ.

Таблица 7.2.

Антиагрегантная активность соединений Ф-168 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* в цельной крови кроликов в присутствии ЛПС-токсина ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	Ф-168	23,8±6,5	-	-	-
2	Ацетилсалициловая кислота	83,2±5,0*	52,4±6,3*	3,2±1,1	12,4

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

7.3. Влияние соединения RU-891 на функциональную активность тромбоцитов в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации

Производное имидазобензимидазола соединение RU-891 также оказывало дозозависимое защитное действие в отношении агрегации тромбоцитов. Так, в конечной концентрации 100 мкМ соединение RU-891 ингибировало агрегацию кровяных пластинок на 58,7% ($p < 0,05$). При инкубации тест-системы с 10 мкМ раствора RU-891 наблюдалось 28,6% ($p < 0,05$) антиагрегантного эффекта. Уменьшение концентрации исследуемого соединения до 1 мкМ приводило к снижению амплитуды агрегации тромбоцитов на 12,7%. Показатель IC_{50} составил 53,2 мкМ (таблица 7.3). Соединение L-36 в концентрации 100 мкМ способствовало снижению амплитуды агрегации тромбоцитов на 92,2% ($p < 0,05$). Уменьшение концентрации исследуемого вещества до 10 и 1 мкМ приводило к ингибированию агрегации тромбоцитов на 58,7 ($p < 0,05$) и 34,9% ($p < 0,05$) соответственно. IC_{50} при этом составила 3,8 мкМ (таблица 7.3).

При добавлении соединения RU-891 к цельной крови, обработанной раствором ЛПС, было установлено, что ингибирование процессов агрегации тромбоцитов происходит на 17,1% (таблица 7.4), что позволяет сделать вывод об отсутствии эффективности данной субстанции в условиях цитокиновой гиперагрегации.

Таблица 7.3.

Антиагрегантная активность соединений RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* в цельной крови кроликов ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	RU-891	58,7 \pm 4,0*	28,6 \pm 4,1*	12,7 \pm 2,9	53,2
2	Ацетилсалициловая кислота	52,8 \pm 5,0*	19,7 \pm 4,0*	7,6 \pm 2,5	107,0

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

Таблица 7.4.

Антиагрегантная активность соединений RU-891 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* в цельной крови кроликов в присутствии ЛПС-токсина ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	RU-891	17,1±3,2	-	-	-
2	Ацетилсалициловая кислота	83,2±5,0*	52,4±6,3*	3,2±1,1	12,4

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

7.4. Влияние соединения L-36 на функциональную активность тромбоцитов в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации

В экспериментах на цельной интактной крови кроликов было зафиксировано, что соединение L-36 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота проявляют дозозависимое антиагрегантное действие. По показателю IC₅₀ соединение L-36 превосходило уровень активности препарата сравнения в 28,2 раза (таблица 7.5), что согласуется с данными, полученными ранее (глава 3).

Таблица 7.5.

Антиагрегантная активность соединений L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* в цельной крови кроликов ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	L-36	92,2±2,4*	58,7±4,0*	34,9±6,7*	3,8
2	Ацетилсалициловая кислота	52,8±5,0*	19,7±4,0*	7,6±2,5	107,0

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

Производное тиадиазина L-36 при инкубации в тест-системе в концентрации 100 мкМ ингибировало агрегацию тромбоцитов на 53,3% ($p < 0,05$). В концентрации 10 мкМ соединение L-36 оказывало защитное действие в отношении агрегации тромбоцитов на 34,3% ($p < 0,05$). Добавление к цельной крови соединения L-36 в концентрации 1 мкМ не приводило к значимым изменениям амплитуды агрегации кровяных пластинок. Показатель IC_{50} при этом для соединения L-36 составил 61,1 мкМ (таблица 7.6).

Таблица 7.6.

Антиагрегантная активность соединения L-36 и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* в цельной крови кроликов в присутствии ЛПС-токсина ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1	L-36	53,3 \pm 6,8*	34,3 \pm 5,9*	1,0 \pm 3,5	61,1
2	Ацетилсалициловая кислота	83,2 \pm 5,0*	52,4 \pm 6,3*	3,2 \pm 1,1	12,4

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

7.5. Эффективность фавипиравира, триазавирина, нобазита, ингавирина, арбидола и ремантадина в условиях ЛПС-индуцированной гиперагрегации

В патогенезе коронавирусной инфекции ведущую роль играет патологическая активация иммунной системы и системы гемостаза, сопровождающаяся чрезмерными иммунными/воспалительными реакциями (представляющими собой так называемый «цитокиновый шторм»), тромбозом и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС-синдром), а также прогрессированием полиорганной недостаточности. Дыхательная недостаточность является наиболее распространенной причиной смерти среди пациентов с коронавирусной инфекцией [Asakura H., 2021].

С целью оказания эффективной фармакотерапии коронавирусной инфекции было предпринято репозиционирование уже существующих противовирусных препаратов широкого

спектра действия [Habas K., 2020; Gavriatopoulou M., 2021]. В ходе клинического применения некоторых противовирусных средств для лечения COVID-19 оказалось, что они проявляют высокую эффективность и существенно снижают риск неблагоприятного исхода. Синтетический аналог пуриновых оснований триазавирин по данным клинических исследований значительно сокращает продолжительность основных клинических симптомов и снижает частоту осложнений коронавирусной инфекции [Shahab S., 2020; Wu X., 2020]. Производное индола умифеновир много лет применяется в клинической практике для лечения и профилактики вируса гриппа. Однако, исследования *in vitro* в отношении его эффективности против SARS-CoV-2 показывают положительную динамику [Huang D., 2021].

Нуклеозидный аналог фавипиравир, ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы проявляет широкий спектр противовирусной активности *in vitro*. Препарат эффективен в отношении вируса гриппа, Эболы, желтой лихорадки, норовируса, энтеровируса и новой коронавирусной инфекции. Несмотря на недостаточность клинических данных о безопасности фавипиравира, это средство все больше обретает решающее значение в лечении коронавирусной инфекции и в настоящее время проводятся дополнительные испытания во многих странах, включая США, Великобританию и Индию. Быстрый клиренс вируса, более высокая скорость клинического выздоровления и доступность в качестве перорального препарата делают его перспективным для лечения COVID-19. Введение данного препарата в клинические протоколы ряда стран по менеджменту коронавирусных больных привело к снижению смертности и ранней выписки пациентов с коронавирусной инфекцией [Ghasemnejad-Berenji M., 2021; Joshi S., 2021].

В клинических исследованиях, в которые были вовлечены умифеновир и триазавирин, отмечалось снижение количества осложнений коронавирусной инфекции. Использование данных средств нацелено на взаимодействие с S-белок/АПФ2 комплексом, что ингибирует связывание и проникновение вируса в клетки хозяина. Это вносит существенный вклад в снижение риска развития COVID-19-ассоциированных тромбозов [Mishra S.K., 2021].

Учитывая особенности патогенеза новой коронавирусной инфекции и применение фармакотерапевтических средств для лечения данного заболевания, является актуальным исследование влияния противовирусных препаратов на систему гемостаза в условиях гиперцитокинемии. В данной работе изучено влияние ряда противовирусных средств, применяемых при ОРВИ, на процессы агрегации тромбоцитов в условиях гиперцитокинемии.

Контрольное значение уровня полученного импеданса цельной крови интактных кроликов составило 8,3 Ом. Ацетилсалициловая кислота в концентрации 100 мкМ блокировала процесс агрегации тромбоцитов, при этом амплитуда агрегации составила 3,9 Ом, что 52,8% ($p < 0,05$) ниже значений контрольной группы. Дальнейшее уменьшение концентрации препарата до 10 и 1 мкМ приводило к снижению антиагрегантного эффекта, амплитуды агрегации

тромбоцитов при этом были равны 6,7 и 7,7 Ом соответственно. IC₅₀ ацетилсалициловой кислоты при этом составила 107,0 мкМ. Противовирусные препараты фавипиравир, умифеновир, триазавирин, ингавирин, римантадин, энисамия йодид в концентрации 100 мкМ не оказывали защитного действия в отношении АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (таблица 7.7).

Таблица 7.7.

Антиагрегантная активность ацетилсалициловой кислоты и некоторых противовирусных средств в цельной крови кроликов на модели АДФ-индуцированной агрегации *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	Ацетилсалициловая кислота	52,8±5,0*	19,7±4,0*	7,6±2,5	107,0
2.	Фавипиравир	13,6±5,3	-	-	-
3.	Умифеновир	2,0±0,5	-	-	-
4.	Триазавирин	17,1±2,9*	-	-	-
5.	Ингавирин	9,6±3,5	-	-	-
6.	Римантадин	15,7±7,0	-	-	-
7.	Энисамия йодид	5,6±2,0	-	-	-

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

При инкубации цельной крови с липополисахаридом уровень агрегации тромбоцитов достоверно (p<0,05) повысился с 8,3 Ом до 11,7 Ом, что свидетельствует о повышении активации тромбоцитарного звена гемостаза в ответ на гиперцитокинемию. Антиагрегантную активность препаратов оценивали в отношении диапазона разницы между уровнем АДФ – индуцированной агрегации интактных тромбоцитов и после их обработки липополисахаридом. Противовирусный препарат умифеновир показал высокую антиагрегантную активность в условия гиперцитокинемии. Так, в концентрации 100 мкМ он статистически значимо снижал уровень амплитуды агрегации тромбоцитов на 96,1%. При дальнейшем снижении концентрации до 10 и 1 мкМ умифеновир уменьшал амплитуду агрегации тромбоцитов на 75,1 и 32,9% соответственно. Схожую активность проявил другой противовирусный препарат, широко используемый в клинической практике для лечения коронавирусной инфекции – фавипиравир (таблица 7.8). При этом IC₅₀ для умифеновира составила 2,7 мкМ, для фавипиравира 3,7 мкМ. Триазавирин в концентрации 100 мкМ достоверно снижал амплитуду агрегации тромбоцитов на 96,3%, а в

концентрации 10 и 1 мкМ на 56,1 и 26,8% соответственно. IC₅₀ триазавирина составила 5,2 мкМ (таблица 7.8). Широко используемое для лечения и профилактики вируса гриппа средство ингавирин оказалось менее эффективным. В концентрации 100 мкМ препарат блокировал процессы образования сгустка на 75,5%. Исследование зависимости концентрация-эффект позволило рассчитать величину IC₅₀, которая составила для данного средства 15,8 мкМ (таблица 7.8). Изучение антиагрегантной активности в условиях гиперцитокинемии препарата римантадин позволило заключить, что данное средство проявляет достаточно высокую эффективность в отношении защиты кровяных пластинок от гиперагрегации в условиях «цитокинового шторма». IC₅₀ при этом для римантадина составила 7,1 мкМ (таблица 7.8). Противовирусное средство энисамия йодид оказывало наименьшее влияние на гиперагрегацию тромбоцитов в условиях гиперцитокинемии и снижало амплитуду агрегатограмм на 30,4%. Таким образом, по показателям IC₅₀ наибольшую антиагрегантную активность в условиях гиперцитокинемии продемонстрировали противовирусные препараты фавипиравир и умифеновир.

Таблица 7.8.

Антиагрегантная активность ацетилсалициловой кислоты и некоторых противовирусных средств в цельной крови кроликов на модели АДФ-индуцированной агрегации в условиях гиперцитокинемии *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	Ацетилсалициловая кислота	83,2±5,0*	52,4±6,3*	3,2±1,1	12,4
2.	Фавипиравир	90,2±5,5*	74,5±12,0*	35,3±6,8*	3,7
3.	Умифеновир	96,1±3,5*	75,1±14,2*	32,9±6,1*	2,7
4.	Триазавирин	96,3±21,5*	56,1±12,0*	26,8±4,4	5,2
5.	Ингавирин	75,5±6,9*	38,2±9,5	19,6±8,5	15,8
6.	Римантадин	83,3±3,5*	64,7±6,8*	16,7±5,5	7,1
7.	Энисамия йодид	30,4±9,8	-	-	-

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

Воздействуя на иммунокомпетентные клетки, липополисахарид запускает TLR4/CD14-опосредованные (Toll-likereceptor/мембранный гликозил-фосфатидилинозитол-связанный белок) провоспалительные реакции, главную роль в которых играют вышеупомянутые

эндогенные вещества [Ciesielska A., 2021]. Данные реакции сопровождаются септическими проявлениями. Поэтому в нашем исследовании выбор липополисахарида, как индуктора гиперцитокинемии, является обоснованным.

Наличие иммунокоагулопатии, как части синдрома системной воспалительной реакции, является общей чертой тяжелого течения COVID-19. Примерно у 20-50% госпитализированных пациентов с COVID-19 наблюдаются гематологические изменения в тестах на свертываемость крови. Это состояние характеризуется более тромботическими, чем геморрагическими явлениями, которые связаны с коагулопатией (в частности, венозной тромбозом), что приводит к гипоксии и застою в легких, опосредованным тромбозом и микрососудистой окклюзией, в дополнение к тромбозу более крупных сосудов [Gómez-Mesa J.E., 2021].

Патогенез коронавирусной инфекции - чрезвычайно сложный, многостадийный процесс, вовлекающий множество систем организма. Исследования, проведенные после аутопсии пациентов, позволили выявить S (spike) белок SARS-CoV-2 в клетках, экспрессирующих рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2). Связывание S белка с АПФ2 индуцирует ядерный фактор карра В (NFkB). Критическая форма COVID-19 является разновидностью цитокинового шторма, а ее проявления сходны с течением первичного и вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ) или синдрома активации макрофагов (САМ). При критическом течении COVID-19 развивается патологическая активация врожденного и приобретенного (Th1- и Th17-типы) иммунитета, дисрегуляция синтеза провоспалительных, иммунорегуляторных, противовоспалительных цитокинов и хемокинов: IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарномacroфагальный колониестимулирующий фактор, фактор некроза опухоли α , интерферон- γ -индуцируемый белок 10, интерферон- α и - β , моноцитарный хемоаттрактантный белок 1, макрофагальный воспалительный белок 1 α , а также маркеров воспаления (СРБ, ферритин) [Iba T., 2020]. Все это приводит к нарастанию септического шока, и, как следствие, гипервоспалительной реакции, повреждению тканей, нарушению эндотелиального барьера и неконтролируемой иммуноопосредованной активации свертывающей системы крови [Colling M.E., 2020]. IL-6 индуцирует экспрессию тканевого фактора в макрофагах, который инициирует активацию свертывания крови и выработку тромбина. Фактор некроза опухоли и IL-1 являются основными медиаторами подавления эндогенного каскада свертывания крови [Gómez-Mesa J.E., 2021]. Следствием тяжелого жизнеугрожающего синдрома высвобождения цитокинов может стать развитие нарушений свертывания крови [BMP-12, 2021]. При сепсис-ассоциированном ДВС-синдроме фибринолиз часто подавляется из-за избыточной продукции ингибитора активатора плазминогена-1, при этом

прогрессирующее образование фибринового сгустка в тканевой микроциркуляции приводит к дисфункции органов [Iba T., Levy J.H., Connors J.M., 2020].

7.6. Заключение

Проведенное исследование позволило заключить, что изученные противовирусные препараты не оказывают влияния в отношении агрегации интактных тромбоцитов. Однако, данная группа средств, специфически воздействуя на жизненный цикл вируса, дополнительно способна снижать риск развития иммуноопосредованной патологической активации тромбоцитарного звена системы гемостаза в ответ на цитокин-опосредованную гиперагрегацию. Лабораторные исследования, проведенные у COVID-19 позитивных пациентов, также показали наличие лимфопении и повышение уровня С-реактивного белка, D-димера и ферритина, и то, что уровень IL-6 может коррелировать со степенью тяжести течения коронавирусной инфекции и тромбогенным потенциалом крови больного [Bikdeli B., 2020]. Эта тромбовоспалительная реакция совместно с внеклеточными компонентами вызывает повреждение эндотелия, которое еще больше увеличивает выработку тромбина. Кроме того, доказано, что инкубация тромбоцитов с супернатантами первичных эндотелиальных клеток, стимулированных интерлейкинами, индуцировала сильный гиперагрегационный ответ тромбоцитов. Эти результаты предоставляют дополнительные доказательства протромботического действия интерлейкинов [Maione F., 2011]. Клинические и патологоанатомические исследования, а также экспериментальные модели SARS-CoV-2 на животных подтверждают, что в патогенезе коронавирусной инфекции важную роль играет повреждение эндотелия кровеносных сосудов и, как следствие, тромботические осложнения [Есауленко И.Э., 2020]. Локализация тромбозов варьирует по различным данным, однако единым знаменателем в источниках остается высокая степень летальности на фоне острой сосудистой непроходимости [Неъматзода О., 2021].

В ответ на стимулы липополисахаридом арахидоновая кислота высвобождается из мембранных фосфолипидов. Затем она превращается в биологически активную серию простагландинов, под действием ферментов циклооксигеназы-1 и циклооксигеназы-2, которые вызывают острую фазу воспаления [Konieczka P., 2019]. Это объясняет такое выраженное достоверное увеличение активности ацетилсалициловой кислоты при моделировании «цитокинового шторма». По показателю IC_{50} активность референсного препарата возросла в 8,6 раза (рисунок 7.1).

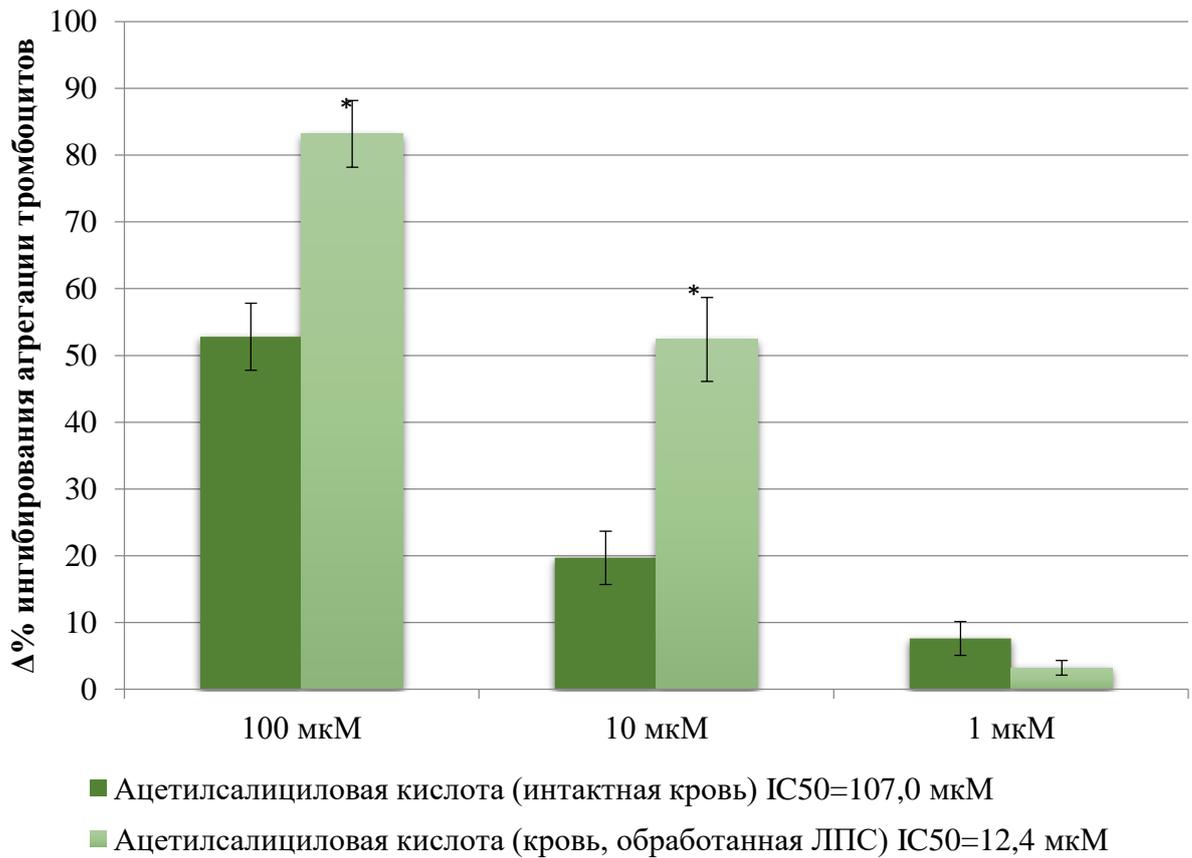


Рисунок 7.1. Антиагрегантная активность ацетилсалициловой кислоты в цельной интактной крови и условиях гиперцитокинемии.

Примечание:

*-данные достоверны относительно интактной группы, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Производные тиадиазина обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе противовирусной и антибактериальной (рисунок 7.2) [Qureshi S., 2021; Aggarwal R., 2022; Rahman K., 2022].

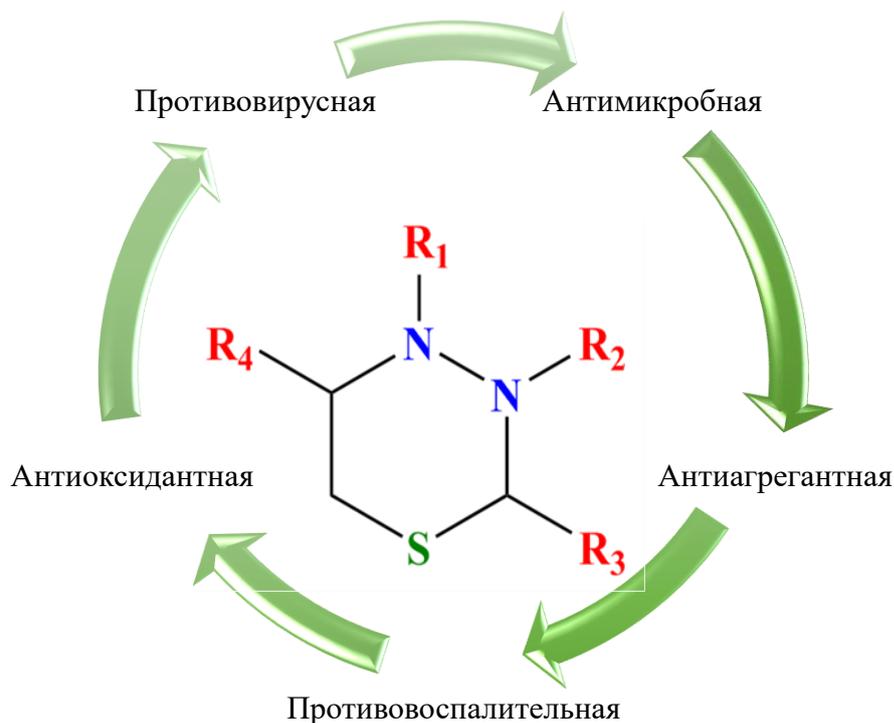


Рисунок 7.2. Спектр активности производных тиадиазина.

Дозозависимое ингибирование цитокиновой гиперагрегации позволяет высказать предположение о том, что соединение L-36 в условиях сепсиса подавляет функциональную активность тромбоцитов именно за счет своей противовоспалительной активности. Однако соединение L-36 в изученных концентрациях по уровню антиагрегантной активности уступало препарату сравнения ацетилсалициловой кислоте.

Данные по изучению противовоспалительных свойств и цитотоксичности соединения L-36 представлены в таблице 7.9. Как видно из таблицы, для соединения L-36 характерна противовоспалительная активность в высоких концентрациях, в то время как мощное противовоспалительное глюкокортикоидное средство дексаметазон оказывает свое действие в значительно низких концентрациях. Однако, в МТТ и ЛДГ тестах показано, что для вещества L-36 не характерна цитотоксичность в высоких концентрациях, что может свидетельствовать об отсутствии осложнений.

Таким образом, исходя из проведенного исследования можно заключить, что соединение L-36 является перспективным антиагрегантным средством, в том числе и для коррекции повышенного тромбогенного потенциала крови на фоне сепсис-опосредованной гиперагрегации.

Таблица 7.9.

Влияние соединения L-36 на ЛПС-стимулированные макрофаги, % (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Образец	Концентрация, мкМ	Ингибирование синтеза NO	Жизнеспособность, МТТ	Жизнеспособность, ЛДГ
1.	Интакт	—	100,0±7,3	86,1±1,2*	100,0±1,1
2.	ЛПС	—	0,0±4,9	100,0±2,6	101,4±0,7
3.	L-36	200,0	71,3±11,4*	76,1±1,0*	99,3±1,6
4.		8,0	27,8±14,6	76,3±4,4*	101,1±0,9
5.		1,6	7,6±26,2	75,3±4,0*	102,2±1,0
6.	Дексаметазон	10,0	93,0±14,2*	96,6±1,8*	102,0±2,8

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

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повышение агрегационной способности тромбоцитов является основным патогенетическим звеном острого коронарного синдрома, инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения, осложнением сахарного диабета, инфекционных заболеваний, что объясняет значимость применения антитромбоцитарных препаратов в рамках лечения и профилактики этих состояний. Инфаркт миокарда находится на первом месте среди причин смертности во всем мире, часто являясь следствием ишемической болезни сердца, которая может развиваться как осложнение атеросклеротических поражений [Китаева Е.Ю., 2017; Абзалилов Т.А., 2021; Santana-Mateos M., 2022]. Антитромбоцитарные препараты в настоящее время с позиций доказательной медицины являются обязательным компонентом фармакотерапии ИБС, т.к. известно, что в патогенезе ишемических болезней органов и систем человеческого организма, включая ИБС, ведущее место занимают воспалительные и атеросклеротические повреждения сосудов с нарушением целостности интимы, замедление кровотока, регионарные и системные изменения коагуляционного потенциала крови в сторону гиперкоагуляции за счет повышения агрегационной и адгезивной активности тромбоцитов и эритроцитов, истощение активности антикоагулянтных компонентов крови и угнетение процесса фибринолиза [Косарев В.В., 2013; Погосова Н.В., 2021; Kamran H., 2021; Natsuaki M., 2022]. Поэтому антитромбоцитарная терапия ряда тромботических состояний в последние годы стала более актуальной в вопросах первичной и вторичной профилактики. Доступные в настоящее время антитромбоцитарные средства включают ацетилсалициловую кислоту, тиенопиридины (клопидогрел, тиклопидин, тикагрелор), блокаторы P₂Y₁₂ рецепторов тромбоцитов (абциксимаб, монофрам, тирофибан, эптифибатид) и ингибиторы фосфодиэстеразы (дипиридамола), которые действуют на различные звенья тромбоцитарного звена гемостаза. Защитные эффекты антитромбоцитарной терапии при сердечно-сосудистых заболеваниях были продемонстрированы в ряде исследований [Schnorbus B., 2014; Villanueva J., 2019; Bajraktari G., 2022; Choffat D., 2022; Frank D., 2022; Valenti R., 2022]. Комбинация ингибитора ЦОГ ацетилсалициловой кислоты и блокатора P₂Y₁₂ рецепторов тромбоцитов клопидогрела остается рекомендованным методом двойной антиагрегантной терапии у стабильных пациентов с ИБС [Терещенко А.С., 2020; Krittanawong C., 2022]. В современных рекомендациях стандартом пожизненной вторичной сердечно-сосудистой профилактики для пациентов с ИБС, цереброваскулярной болезнью и поражением периферических артерий признается однокомпонентная антиагрегантная терапия низкими дозами ацетилсалициловой кислоты [Passacuale G., 2022; Saito M.S., 2022]. Клопидогрел может служить альтернативой

ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ее непереносимостью или абсолютными противопоказаниями к ее применению, и предпочтителен при атеросклерозе артерий нижних конечностей [Перепеч Н.Б., 2018; Matsushita K., 2022]. Антитромбоцитарная терапия является основным пунктом в схеме лечения и вторичной профилактике у больных, перенёсших ишемический инсульт (класс I, уровень A). Антиагреганты должны назначаться с первых суток острого инфаркта миокарда, ишемического инсульта и применяться длительно. Использование антиагрегантов в данном случае базируется на высокой доказательности их эффективности (снижение числа случаев несмертельного инсульта и сосудистой смертности на четверть), в том числе по данным крупных мета-анализов [Китаева Е.Ю., 2017; Lopes R.D., 2020; Palma C., 2022; Sanchez A.C., 2022].

Необходимо отметить, что современные антиагрегантные средства не всегда отвечают требованиям, предъявляемым к ним, так как проявляют недостаточную эффективность и имеют побочные эффекты. Среди побочных эффектов особенно следует отметить способность антиагрегантов вызывать гастропатии, кровотечения, тромбоцитопеническую пурпуру. Другим фактором, ограничивающим применение антиагрегантных средств, является наличие у части больных резистентности к препаратам, характеризующейся отсутствием депрессии функции тромбоцитов и снижением антитромботического эффекта [Полянецв А.А., 2019; Bouget J., 2020; McEvoy L., 2021; Marcaccio C.L., 2022].

На базе кафедры фармакологии и биоинформатики, а также в Научном центре инновационных лекарственных средств ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России накоплен большой опыт по изучению оригинальных молекул и их влиянию на систему гемостаза [Турчаева А.Ф., 1995; Ивахненко И.В., 1997; Дегтярев А.Н., 2001; Салазникова О.А., 2001; Самохина М.П. 2003; Хропова Т.Н., 2004; Аркова Н.В., 2004; Стуковина А.Ю., 2006; Науменко Л.В., 2006; Кузнецова В.А., 2010; Науменко Л.В., 2012; Кучерявенко А.Ф., 2012; Букатина Т.М., 2014; Зиганшин Б.А., 2016; Сиротенко В.С., 2018; Гайдукова К.А., 2020].

Учитывая большое разнообразие потенциальных мишеней для антитромбоцитарной терапии и наличие данных об антиагрегационных свойствах множества различных химических классов на этапе скрининга было исследовано 148 соединений, относящихся к различным группам. Стандартным методом измерения уровня агрегации тромбоцитов остается метод G.Vorn, основанный на оптической детекции флуктуаций светопропускания богатой тромбоцитами плазмы. В 1989 году З.А. Габбасовым было предложено использовать лазерные агрегометры, что в последствии показало более высокую чувствительность метода, даже при использовании агонистов (например, АДФ, коллаген) в низких концентрациях [Козловский В.И., 2013; Flower R.J., 2018]. АДФ является неселективным физиологическим агонистом для тромбоцитов, реализующим свой механизм действия через P2X₁, P2Y₁ и P2Y₁₂, что приводит к

их активации, последующей агрегации и секреции гранул хранения [Jagroop I.A., 2014]. Таким образом, АДФ является обоснованным индуктором агрегации тромбоцитов как для оценки уровня агрегации в клинической практике, так и для скрининга соединений с целью выявления антиагрегантных средств. На модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов был проведен многоэтапный скрининг веществ, включающий в себя оценку антиагрегационных свойств азотсодержащих моноциклических гетероциклических соединений, конденсированных азотсодержащих гетероциклов, серосодержащих гетероциклических молекул, а также веществ, содержащих в качестве гетероатома атом кислорода. В ряду азотсодержащих моноциклических соединений было выявлено 4 соединения под шифрами RUI-19, RUI-20, RUI-27 и LOSAZ-33, которые были сопоставимы по уровню антиагрегантной активности с препаратом сравнения ацетилсалициловой кислотой. Это указывает на то, что среди исследованных скафолдов моноциклические гетероциклические соединения, имеющие в качестве гетероатома атом азота, являются не перспективными для поиска среди них высоко эффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов.

Анализ изученных конденсированных гетероциклических соединений позволил заключить, что азотсодержащие молекулы в значительной степени обладают антиагрегантными свойствами, а также введение в качестве гетероатома атома серы приводит к увеличению активности. Кластеризация химических рядов исследованных групп соединений позволила выявить высоко активные соединения, значительно превосходящие по активности ацетилсалициловую кислоту (рисунок 8.1).

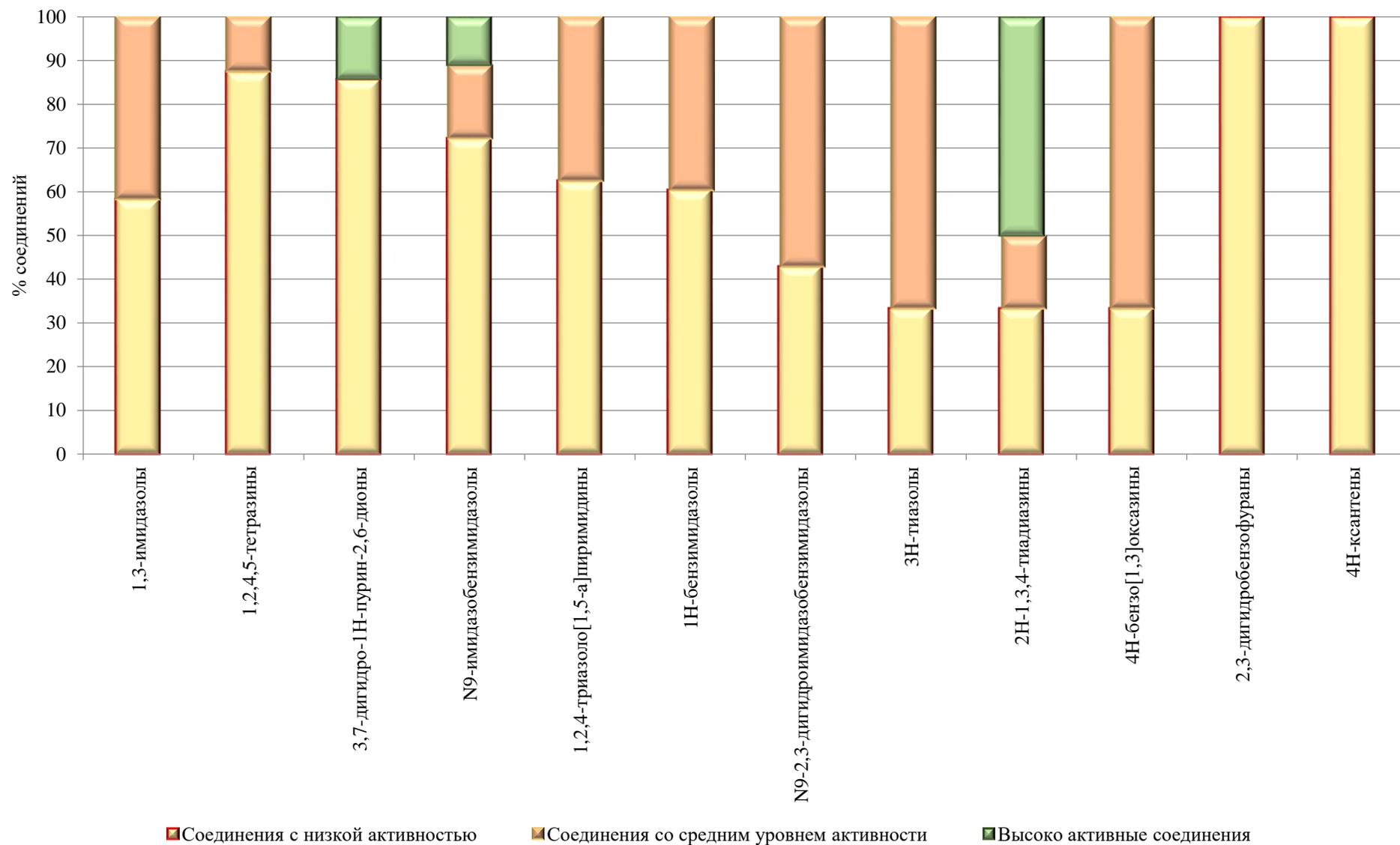


Рисунок 8.1. Доля высоко активных соединений среди изученных классов.

Исследования *in silico* позволили, на основе полученных данных, структурировать исследованные химические ряды и определить наиболее перспективные скафолды для поиска и создания на их основе высоко эффективных антиагрегантных средств. При анализе скрининговых данных с использованием статистически точного биномиального критерия были рассчитаны показатели значимости для каждого из 12 исследованных скафолдов (рисунок 8.2). По результатам вычислений было показано, что наиболее высокий индекс значимости был у производных 3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-диона, N9-имидазобензимидазола и 6H-1,3,4-тиадиазина, что согласуется с экспериментальными данными.

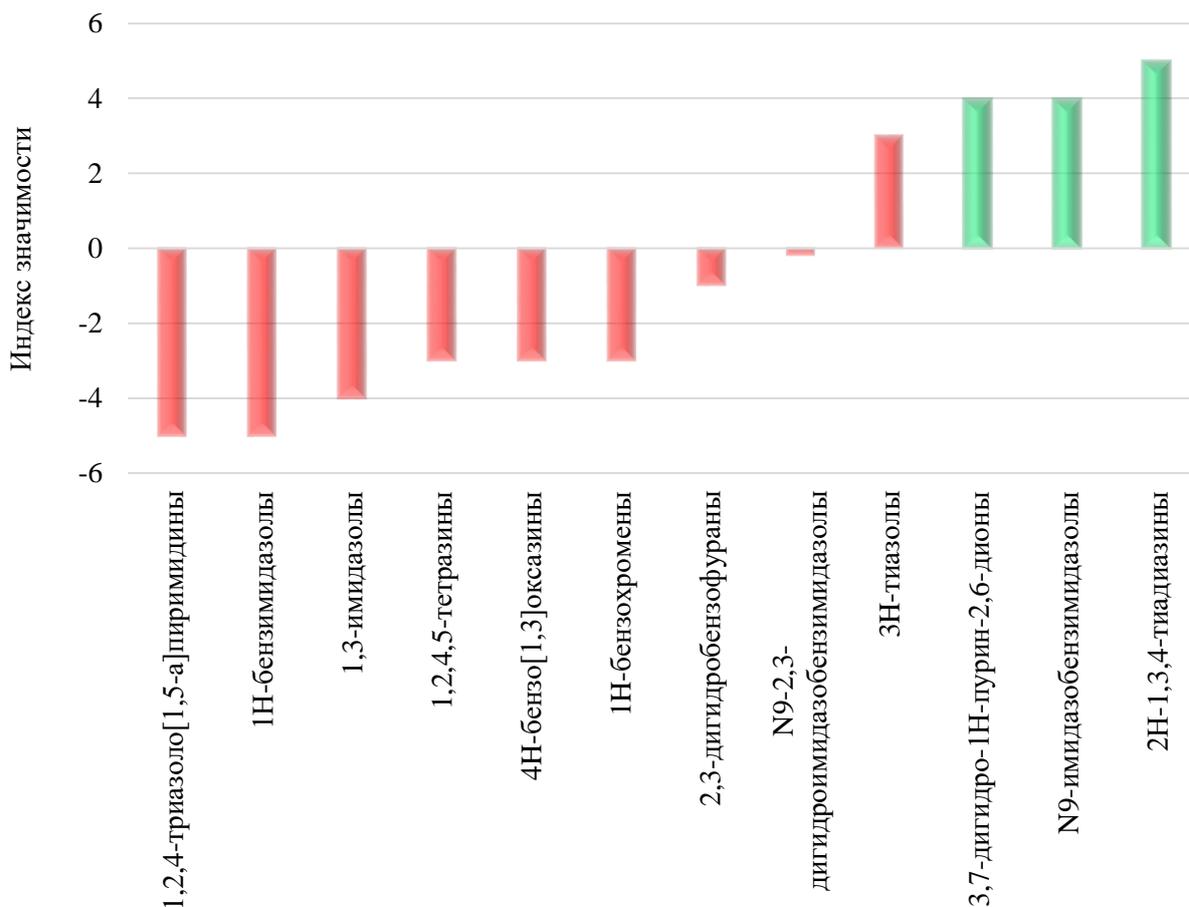


Рисунок 8.2. Показатели индекса значимости по биномиальному критерию для исследованных скафолдов.

Таким образом, включение в экспериментальный поиск соединений с высокой антиагрегантной активностью системы *in silico* прогнозирования является обоснованным и может использоваться в системе многоэтапного скрининга.

Так, среди производных 3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-диона было найдено соединение Ф-168 (1-этил-3-метил-8-(пиперазин-1-ил)-7-(тиетан-3-ил)-3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дион). По показателю IC₅₀ в опытах *in vitro* данное соединение превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 3 раза. Учитывая степень влияния соединения Ф-168 на процессы

адгезии тромбоцитов к микрофибриллам коллагена и способность подавлять агрегацию тромбоцитов, вызванную таким индуктором, как TRAP, можно полагать, что механизмом действия данного соединения является блокада IIb/IIIa гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов. В связи с чем путь введения в модельных экспериментах был определен как внутривенный, а препаратом сравнения для дальнейших исследований послужил тирофибан. При изучении антиагрегантной активности соединения Ф-168 в условиях целостного организма (опыты *in vivo* с изучением агрегации тромбоцитов *ex vivo*) было установлено что эффективная доза (ED₅₀) для данного образца составила 0,89 мг/кг. Препарат сравнения тирофибан также проявил высокий уровень антиагрегантной активности со значением ED₅₀ 0,9 мг/кг. Сопоставимый уровень активности соединения Ф-168 и тирофибана свидетельствует о высокой эффективности исследуемого производного ксантина в отношении подавления функциональной активности тромбоцитов. Это послужило основанием для дальнейшего углубленного изучения антитромботических свойств нового производного ксантина соединения Ф-168.

Артериальный тромбоз является частым осложнением многих системных заболеваний, связанных с хроническим воспалением, включая атеросклероз, диабет, ожирение, рак и хронические аутоиммунные ревматологические заболевания [Wei Y., 2018]. Модель FeCl₃-индуцированного тромбоза зависит от гликопротеинов VI тромбоцитов, и на фоне блокады данного интегрина значительно ингибируется образование тромбов. Это позволяет предполагать, что данная модель может с большей вероятностью имитирует патофизиологию человеческого тромбоза, опосредованного разрывом атеросклеротических бляшек. Однако в нескольких недавних исследованиях были предложены новые механизмы, включая адгезию эритроцитов к стенке сосуда, а также физико-химический эффект хлорида железа (III), индуцированный агрегацией белков плазмы и клеток крови [Li W., 2016]. Поверхностная аппликация раствора хлорида железа (III) приводит к немедленной денудации сосудистого эндотелия. Хлорид железа (III) способствует перекисному окислению липидов в эритроцитах, окислению гемоглобина и гемолизу, что также способствует повреждению сосудов и рекрутированию кровяных пластинок [Grover S.P., 2020]. Таким образом, модель FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии является тромбоцит-зависимой и ее выбор оправдан для оценки антитромбогенных свойств потенциальных антиагрегантных средств. При внутривенном введении раствора активной фармацевтической субстанции (АФС) соединения Ф-168 наблюдалось достоверное дозозависимое пролонгирование времени окклюзии сонной артерии. Однако, по данному параметру исследуемое соединение несколько уступало по активности препарату сравнения тирофибану в 1,4 раза. В ходе исследования антитромбогенных свойств готовой инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 было установлено, что в дозе 1,33 мг/кг ГЛФ Ф-168

эквивалентна по активности чистой субстанции и сопоставима по активности с препаратом сравнения тирофибаном.

Модель тромбоза сонной артерии, индуцированного электрическим током, позволяет провоцировать значительное повреждение эндотелия, приводящее к денудации субэндотелиального матрикса, что приводит к развитию острого тромбообразования в артериальном русле. Гистологическая структура тромбов (богатые тромбоцитами и фибрином, с скоплениями эритроцитов, захваченных фибриновой сетью) доказывает, что рост тромботического материала имеет клиническое значение. Важно также отметить, что эта модель обеспечивает возможность непрерывного мониторинга динамики локального образования тромба [Zakrzaska A., 2015]. На данной модели тромбоза АФС соединения Ф-168 при однократном внутривенном введении проявило дозозависимую антитромботическую активность и по значению ED₅₀ было сопоставимо с референсным препаратом тирофибаном. Изучение готовой инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 позволило заключить, что по уровню антитромбогенной активности ГЛФ Ф-168 сравнимо с препаратом сравнения тирофибаном.

При внутривенном введении мышам смеси адреналина и коллагена происходит немедленное образование внутрисосудистого сгустка, мигрирующего в легочную ткань и приводящего к тромбоэмболии легочных артерий. При этом отмечаются характерные признаки острой дыхательной недостаточности: увеличение частоты и поверхностный характер дыхания, выраженный экзофтальм и изменение цвета радужной оболочки. Визуально наблюдаются судороги, животные принимают характерную позу, при которой задние лапы выпрямлены и отведены назад. В течение 1-2 минут после введения тромботических агентов животные погибают с уровнем смертности до 100% в группе контроля. Данная модель тромбоза максимально приближена к клинической картине тромбоэмболии легочных артерий (ТЭЛА) [Gupta A.K., 2019]. Соединение Ф-168 при однократном внутривенном введении способствовало выраженному увеличению выживаемости мышей, а также существенному снижению средней площади тромбов (в 2,7 раза относительно контроля). По антитромбогенной активности соединение Ф-168 было сопоставимо с препаратом сравнения тирофибаном.

Большинство тромбов может развиваться в глубоких венах голени, поднимаясь отсюда до бедра; однако до 30% сгустков могут иметь первичное происхождение выше, в подвздошно-бедренном венозном сегменте. Тромбоз вен нижних конечностей влечет за собой высокий риск развития тромбоэмболического состояния. Тромбоэмболия легочной артерии может быть наиболее опасным осложнением венозного тромбоза, с высокой степенью летальности [Yao X., 2019]. В связи с этим явилось необходимым изучение эффективности потенциального антиагрегантного средства в условиях экспериментального венозного тромбоза. Исследование

соединения Ф-168 на модели лигирования нижней полой вены крыс позволило заключить, что данное вещество способно в значительной степени препятствовать процессам тромбообразования не только в артериальном, но и в венозном русле. Средняя масса тромбов, извлеченных из нижней полой вены крыс, на фоне однократного внутривенного введения соединения Ф-168 была в 5,9 раза ниже контрольных образцов. По уровню антитромботической активности соединение Ф-168 также превосходило препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза, что свидетельствует о высокой эффективности исследуемого соединения, как антиагрегантного средства.

Сердечно-сосудистые заболевания являются причиной смертности номер один. Более половины этих смертей связаны с острым инфарктом миокарда [Pollard T.J., 2000]. Увеличение тромбогенного потенциала крови является как причиной острого инфаркта миокарда, так и его последствием. Доказано, что на фоне прогрессирующего атеросклероза коронарных артерий происходит интенсивное тромбообразование, приводящее к ишемии миокарда и последующему инфаркту. Отмечается также, что у пациентов, перенесших инфаркт миокарда увеличивается тромбогенный потенциал крови на длительный срок [Saleh M., 2018]. Поэтому важным этапом исследования явилось изучение антитромботической активности соединения Ф-168 на фоне экспериментального инфаркта миокарда. В условиях экспериментальной патологии, сопровождающейся значительным увеличением тромбогенного потенциала крови, установлена высокая эффективность чистой субстанции и инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168. При этом, активная фармацевтическая субстанция соединения Ф-168 и его инъекционная лекарственная форма были сопоставимы по активности с препаратом сравнения тирофибаном.

Вне зависимости от цели назначения антитромбоцитарного препарата и используемого режима дозирования всегда существует высокий риск развития кровотечений [Hilken N.A., 2018]. Поэтому, важным этапом в исследовании потенциального антиагрегантного средства явилась оценка риска развития кровотечения. Установлено, что соединение Ф-168 и тирофибан приводят к дозозависимому увеличению времени кровотечения из хвостовой вены мышей. Данный факт свидетельствует о выраженности антиагрегантной активности. Однако, по показателю ED₅₀ соединение Ф-168 практически в 2 раза уступало тирофибану по способности пролонгировать кровопотерю. Это позволяет сделать вывод, что исследуемое соединение в значительно меньшей степени способствует развитию осложнения в виде кровотечения наряду с высокой антитромбогенной активностью по сравнению с препаратом сравнения тирофибаном.

Исследования по фармакокинетике АФС и ГЛФ Ф-168 позволили определить основные кинетические параметры и провести прогноз основных метаболитов исследуемого вещества. Величина общего объема распределения более чем в 20 раз превышает общий объем жидкости в организме крысы, что свидетельствует о выраженной способности препарата интенсивно

проникать в органы и ткани животных. Это позволяет сделать вывод о высокой эффективности терапии острых тромботических состояний различной локализации. В результате проведенных исследований также было установлено, что соединение Ф-168 циркулирует в крови крыс при внутривенном введении до 12 часов исследования. Интенсивно распределяется в органы и ткани, однако не содержится в жировой ткани. Проницаемость гематоэнцефалического барьера связана, скорее всего, с высокой степенью васкуляризации мозговой ткани, а не с липофильностью самого тестируемого образца. Выведение соединения Ф-168 происходит и через почки и через кишечник в течение 3 суток с момента введения. Достоверных различий в фармакокинетических параметрах чистой субстанции и готовой инъекционной лекарственной формы соединения Ф-168 обнаружено не было. Относительная биодоступность ГЛФ Ф-168 составила 97,88 %.

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

Применение препаратов, ингибирующих активацию и агрегацию тромбоцитов, позволяют снизить количество инфарктов миокарда на 35%, инсультов - на 25%, а смертность от сердечно-сосудистых причин на 15% [Чуканова Е.И., 2016]. Антитромбоцитарная терапия препаратами, такими как ацетилсалициловая кислота, клопидогрел, тикагрелор и др., используется для нацеливания на один или несколько путей, ответственных за ускорение тромботических осложнений у больных сахарным диабетом, ишемической болезнью сердца, транзиторными ишемическими атаками, онкоассоциированными тромбозами [Федоткина Ю.А., 2017; Jeng C.-J., 2022; Sun Y., 2022]. Это свидетельствует о высокой значимости антитромбоцитарной терапии в качестве профилактики острых тромботических событий. В ряду производных N9-имидазобензимидазола было выявлено наиболее активное соединение RU-891 (1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(1,2,3,9*a*-тетрагидро-9*H*-бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазол-9-ил)этан-1-он), продемонстрировавшее высокую эффективность для предотвращения процессов тромбообразования при внутрижелудочном введении. При изучении механизма действия субстанции соединения RU-891 и оценке ее влияния на различные этапы тромбообразования было установлено, что исследуемое вещество незначительно проявляет антиадгезивные свойства, что позволяет исключить гликопротеин VI-зависимый механизм антиагрегантного действия. Важным этапом является стадия активации тромбоцитов, которая позволяет потенцировать рекрутирование циркулирующих кровяных пластинок. Пусковым механизмом активации тромбоцитов является стимуляция P2Y₁ рецепторов. Соединение RU-891 в 15,7 раза

уступало по способности блокировать данный подтип пуриновых рецепторов веществу сравнения MRS-2179. Подавление секреции АТФ тромбоцитами под воздействием соединения RU-891 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты говорит о снижении способности кровяных пластинок к дегрануляции и образованию стабильных агрегатов, что подтверждает выраженную антиагрегантную активность исследуемых образцов. Однако, соединение RU-891 в значительно большей степени способствует снижению уровня секретируемой АТФ, по сравнению с ацетилсалициловой кислотой, что указывает на более эффективное подавление функциональной активности тромбоцитов исследуемым соединением. Активированные тромбоциты взаимодействуют с лейкоцитами крови, способствуя их мобилизации в зону повреждения посредством Р-селектина, в результате чего возникает провоспалительная активация эндотелиальных клеток. Достоверное снижение уровня Р-селектина под влиянием RU-891 свидетельствует о способности предупреждать тромбообразование на достаточно ранней стадии.

В отличие от ацетилсалициловой кислоты, соединение RU-891 при однократном внутрижелудочном введении крысам не изменяла уровень ЦОГ-1 в интактных и активированных тромбоцитах относительно контрольных значений, в чем состоит преимущество тестируемой субстанции перед антиагрегантным средством и указывает на отсутствие у соединения RU-891 нежелательного воздействия на антитромбогенные свойства эндотелия и желудочно-кишечный тракт. Проведенные исследования в совокупности с ранее проведенными экспериментами позволяют сделать вывод о блокирующем влиянии соединения RU-891 на P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов и синтез тромбоксана А₂. При этом исключая влияние на ЦОГ-1, можно предположить влияние соединения на тромбоксансинтетазу, что является более селективным механизмом антитромбоцитарного действия, исключаящим негативное влияние на ЖКТ и эндотелиоциты.

Изучение антитромботической активности АФС соединения RU-891 позволило заключить, что на модели тромбоза сонной артерии индуцированного 50% раствором хлорида железа (III) данное соединение превосходит по активности препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,9 и 4,7 раза, соответственно. Также, было отмечено, что готовая лекарственная форма для приема внутрь соединения RU-891 является эквивалентной по антитромботической активности чистой субстанции вещества. При однократном внутрижелудочном введении соединения RU-891 и препаратов сравнения в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности за два часа до воздействия электрического тока на сонную артерию было установлено, что АФС RU-891 в различной степени предупреждала время наступления полной окклюзии сосуда. По показателю ED₅₀ соединение RU-891 в 3,6 раза превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту и было сравнимо по эффективности с

препаратом сравнения клопидогрелем. Активность ГЛФ RU-891 на данной модели тромбоза была эквивалентна чистой субстанции, что указывает на отсутствие влияния вспомогательных компонентов лекарственной формы.

С целью оценки способности предотвращать острые тромботические события соединение RU-891 было изучено на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза. На данной модели было выявлено, что исследуемое соединение предотвращало гибель животных на 80%. В группе контроля наблюдалась 100% гибель. Препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел предотвращали смертность мышей на 40% и 50%, соответственно. Это позволяет заключить, что соединение RU-891 является наиболее эффективным средством, оказывающим предупреждающее действие в развитии ТЭЛА. Также, было установлено, что соединение RU-891 при однократном внутривенном введении снижает среднюю площадь тромбов на срезе легкого в 5,4 раза по отношению к контролю и, превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения - ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2 и 1,6 раза соответственно.

Так как проблема повышенного тромбообразования затрагивает не только артериальное, но и венозное русло, соединение RU-891 также было исследовано на модели тромбоза нижней полой вены крыс. По способности предотвращать образование тромба в вене соединение RU-891 превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 2,4 и 2,2 раза, соответственно. Таким образом, соединение RU-891 предотвращает патологические процессы, связанные не только с тромбообразованием в артериях, но и в нижней полой вене.

При моделировании инфаркта миокарда было установлено, что в группе животных с экспериментальной патологией, время образования тромба достоверно уменьшалось по сравнению с интактными животными, что свидетельствует о значительном увеличении тромбогенного потенциала крови при формировании инфаркта миокарда. По антитромботической активности на фоне экспериментального инфаркта миокарда соединение RU-891 превосходило ацетилсалициловую кислоту в 2,1 раза и было сопоставимо с препаратом сравнения клопидогрелем. ГЛФ RU-891 в условиях патологии продемонстрировала высокую антитромботическую активность при однократном внутривенном введении недостоверно превосходя активность чистой субстанции RU-891 в 1,3 раза в аналогичных условиях эксперимента.

В результате проведенных фармакокинетических исследований установлено, что соединение RU-891 циркулирует в крови до 8 часа исследования. Интенсивно распределяется в органы и ткани с высокой степени васкуляризации и липофильностью, что позволяет предполагать высокую эффективность профилактики тромбообразования различной локализации. При многократном введении выраженной кумуляции не выявлено. Отсутствие

различий в биоэквивалентности чистой субстанции и ГЛФ RU-891 позволяет сделать выводы, о том, что вспомогательные вещества, входящие в состав ГЛФ RU-891 не влияют на фармакокинетические свойства и достоверно не изменяют фармакокинетических параметров.

Так как антитромбоцитарная терапия сопровождается высоким риском развития кровотечений возникла необходимость изучить соединение RU-891 на способность оказывать это побочное действие. В ходе исследования было установлено, что соединение RU-891 в значительно меньшей степени способствует пролонгированию времени кровотечения (на 65,9%) из хвостовой вены мышей по сравнению с референсными препаратами ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелем, удлиняющими указанный параметр на 87,9 и 216,0%, соответственно.

В плане доклинической оценки токсикологических свойств соединения и ГЛФ RU-891 при 6-месячном внутрижелудочном введении в дозе 23,0 мг/кг является не токсичной и безопасной, поскольку не вызывает необратимых изменений в общем состоянии, поведении, гематологических параметрах, биохимических показателях крови и мочи, функциональной активности сердца. Гибель животных в период введения и отмены АФС и ГЛФ RU-891 не наблюдалась. В дозах 460,0 мг/кг на крысах и 220,0 мг/кг на кроликах по результатам функциональных проб и патоморфологического исследования на 6 месяце введения и после 1 месяца отмены были зафиксированы изменения, позволяющие сделать вывод о токсическом воздействии на печень и почки. Однако, стоит отметить, что указанные изменения имели тенденцию к обратимости.

Проведенные доклинические исследования соединения RU-891 являются основанием для расчета начальных доз с целью проведения I фазы клинических исследований. МРНД для RU-891 составила 270,0 мг.

Гетероциклические соединения, в составе которых присутствует атом серы демонстрируют достаточно широкий спектр фармакологической активности, в том числе антиагрегантную. Соединение L-36 (5-фенил-2-тиоморфолино-6*H*-1,3,4-тиадиазин) проявляло наиболее выраженную антиагрегантную активность в сравнении с другими производными 6*H*-1,3,4-тиадиазина.

В ходе изучения влияния соединения L-36 на различные стадии процесса тромбообразования было установлено, что данная субстанция достоверно способствует снижению адгезии тромбоцитов к микрофибриллам коллагена только в концентрации 100 мкМ на 25,2%. Данный уровень активности свидетельствует об отсутствии у соединения L-36 выраженного влияния на гликопротеиновые VI рецепторы тромбоцитов.

Активация тромбоцитов осуществляется через стимуляцию P2Y₁ рецептора молекулами АДФ и АТФ, секретлируемыми из уже активированных тромбоцитов, а также из поврежденных клеток тканей организма [Tomaiuolo M., 2017]. В ходе исследования было показано, что вещество

сравнения MRS-2179 в концентрации 1 мкМ блокировало активацию тромбоцитов кролика на 91,0% ($p < 0,05$), что подтверждает его антагонистические свойства в отношении P2Y₁ рецептора тромбоцитов. При инкубации богатой тромбоцитами плазмы кроликов с 1 мкМ соединения L-36 не наблюдалось значительного снижения сферизации кровяных пластинок. Это позволяет заключить, что соединение L-36 не оказывает влияния на раннюю стадию тромбообразования.

Выраженность антитромбоцитарных свойств была подтверждена в исследовании по изучению влияния соединения L-36 на секрецию АТФ из гранул хранения тромбоцитов. Инкубация препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты с цельной кровью позволила установить, что референсный препарат значительно уступал соединению L-36 по способности ингибировать секрецию АТФ в 14,1 раза. Это доказывает выраженность антиагрегантной активности соединения L-36, а также способность подавлять рекрутирование циркулирующих кровяных пластинок в процесс тромбообразования.

В ходе углубленного изучения механизма антиагрегантного действия было установлено, что соединение L-36 дозозависимо способствует снижению уровня тромбоксана A₂, превосходя по активности при этом препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2 раза. Это позволяет сделать вывод о том, что механизм действия соединения L-36 вероятнее всего обусловлен в ингибировании каскада метаболизма арахидоновой кислоты. По значению энергии докинга в исследованиях *in silico* было установлено, что для соединения L-36 характерно влияние на ЦОГ-1 и ЦОГ-2, при этом в отношении ЦОГ-2 афинность соединения несколько больше. Вместе с тем, также было проведено докирование молекулы L-36 в сайт связывания фермента тромбоксансинтетазы и по значению энергии докинга соединение было сопоставимо с референсным препаратом, селективным ингибитором тромбоксансинтетазы дазоксibenом. Это дает основание предполагать у соединения L-36 механизм антиагрегантного действия связанный с блокированием фермента тромбоксансинтетазы в тромбоцитах, а также противовоспалительное действие путем ингибирования ЦОГ-2.

Эндотелиальная дисфункция характеризуется сдвигом активности эндотелия в сторону уменьшения вазодилатации, провоспалительного состояния и протромботических свойств [Rajendran P., 2013; Bernard I., 2020]. Показательным биомаркером эндотелиальной дисфункции является эндотелин-1 [Петриков А.С., 2013; Калинин Р.Е., 2019]. При внутривенном введении раствора липополисахарида крысам было зафиксировано, что данный токсин приводил к значительному увеличению уровня эндотелина-1 в контрольной группе в 15,8 раза. Однократное внутрижелудочное введение соединения L-36 не приводило к изменению уровня эндотелина-1 у интактных животных, в то время как на фоне ЛПС-индуцированной интоксикации исследуемое соединение на 34,8% снижало концентрацию эндотелина-1. Наличие данного эффекта позволяет судить о проявлении соединением L-36 на ряду с антиагрегантным действием

эндотелиопротективных свойств. Такая тенденция является основанием предполагать наличие высокой эффективности исследуемого соединения при тромботических состояниях, индуцированных иммуноопосредованными механизмами.

vWF также является одним из общепризнанных маркеров нарушений функции эндотелия, связанных с увеличением выработки эндотелием веществ с протромботической активностью, при повреждении эндотелия он секретируется в субэндотелий и плазму крови. В контрольной группе животных с ЛПС-интоксикацией наблюдалось увеличение vWF на 56,2%. Учитывая наличие на поверхности мембран тромбоцитов гликопротеина Ib-IX-V, резкое увеличение содержания в плазме крови vWF говорит также о повышенном риске тромбообразования на фоне ЛПС-интоксикации. В группе животных, получавших соединение L-36 на фоне гиперцитокинемии концентрация vWF была в 2,3 раза ниже, что также свидетельствует об эндотелиопротективных свойствах и высокой антиагрегантной активности в условиях сепсиса.

В ходе изучения влияния соединения L-36 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах было установлено, что данное соединение обладает выраженной антагонистической активностью в отношении ионов кальция. Это указывает на выраженное ингибирование функциональной активности тромбоцитов. Однако, учитывая большую физиологическую роль ионов кальция данные, полученные в ходе эксперимента, дают основание предполагать наличие off-target эффектов соединения L-36. Что требует более детального изучения.

Учитывая наличие высокой антиагрегантной активности у соединения L-36 представилось необходимым изучить его антитромбогенные свойства. Для оценки эффективности соединения L-36 в условиях тромбообразования в артериальном русле было проведено исследование на моделях тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных раствором хлорида железа (III) и воздействием электрического тока. Так, на модели FeCl₃-индуцированного тромбоза сонной артерии было установлено, что по показателю ED₅₀ соединение L-36 превосходит по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 3 раза. При воздействии электрического тока на сонную артерию крыс среднее время образования тромба составило 14,7 мин. в контрольной группе. При однократном внутривенном введении соединения L-36 наблюдалось дозозависимое удлинение времени окклюзии сонной артерии. По показателю ED₅₀ соединение L-36 в 2,5 раза превосходило по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту.

При внутривенном введении в хвостовую вену мышей смеси адреналина и коллагена происходит активация процессов тромбообразования с последующей тромбоэмболией легочных артерий [Lockyer S., 2008; Fan C., 2020]. В контрольной группе животных при внутривенной инъекции смеси адреналина и коллагена наблюдалась 100% гибель животных,

сопровождаясь проявлениями острой дыхательной недостаточности. При однократном внутрижелудочном введении соединение L-36 способствовало выживанию 70% мышей, в то время как препарат сравнения ацетилсалициловая кислота оказывал 40% защитного действия. Микроскопическое исследование легочной ткани у мышей, получавших вещество L-36, показало, что признаки нарушения кровообращения выражались преимущественно кровоизлияниями очагового характера, венозным полнокровием, а также диапедезом эритроцитов в межальвеолярные перегородки. При этом гистоархитектоника легочной ткани подопытных животных соответствовала нормальным гистологическим критериям. Окрашивание парафиновых срезов легочной ткани подопытных мышей трихромной окраской по Carstairs показало, что у большинства животных тромбы, в состав которых входили нити фибрина, встречались в единичном экземпляре. Таким образом, согласно результатам патоморфологического исследования, введение вещества L-36 нивелировало основные признаки нарушения кровообращения в легочной ткани, обусловленные введением тромбующей смеси адреналина и коллагена. При этом, терапевтическая эффективность вещества L-36 относительно ацетилсалициловой кислоты была выше.

Как уже отмечалось ранее, процессы патологического тромбообразования затрагивают не только артериальное русло, но и венозное. Таким образом, явилось необходимым исследовать эффективность соединения L-36 на модели тромбоза нижней полой вены. Критерием эффективности исследуемых соединений на данной модели тромбоза является масса тромбов, извлекаемых из нижней полой вены через 24 часа после ее лигирования. Было показано, что соединение L-36 в значительной степени предотвращает тромбообразование в системе нижней полой вены и превосходит по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 2,5 раза. Проведенное исследование позволяет сделать вывод о высокой эффективности соединения L-36 в отношении предупреждения развития не только артериальных, но и венозных тромбозов.

На фоне действия антиагрегантных средств пролонгирование времени кровотечения является показателем их эффективности, а также критерием безопасности такой терапии. Поддержка баланса между эффективностью антитромботической терапии и ее безопасностью является неотъемлемой частью современной кардиологии, и прежде всего с позиций минимизации кровотечений [Заболотских И.Б., 2019]. Наиболее распространенными являются кровотечения отделов ЖКТ, зачастую протекающие бессимптомно [Отдельнов Л.А., 2020]. В связи с этим явилось необходимостью провести оценку способности соединения L-36 пролонгировать время кровотечения из хвостовой вены мышей. В ходе эксперимента было установлено, что соединение L-36 пролонгирует время кровотечения, что говорит о его эффективном подавлении функциональной активности тромбоцитов. При этом, было также установлено, что пролонгирование данного показателя не превосходило значения препарата

сравнения ацетилсалициловой кислоты. В свою очередь это указывает на низкую степень риска развития кровотечения наряду с высокой эффективностью.

Увеличение знаний о роли тромбоцитов в сосудистой сети привело к многим достижениям в понимании не только того, как тромбоциты взаимодействуют со стенкой сосуда, но и того, как они передают изменения в окружающей среде другим циркулирующим клеткам. В дополнение к их хорошо описанной гемостатической функции тромбоциты являются активными участниками иммунного ответа на микробные организмы и чужеродные вещества [Koupenova M., 2018]. Ведущей причиной смертности среди пациентов с COVID-19 является тромбоз легочной ткани и развитие впоследствии острого респираторного дистресс синдрома. Активированные тромбоциты способны выполнять тромбовоспалительные функции, связывая гемостатический и иммунный ответы при некоторых физиологических и патологических состояниях. Среди многих механизмов, которыми тромбоциты выполняют эти функции, различают экспрессию тромбоцитами рецепторов распознавания образов (PRR), включая семейства Toll-like рецепторов, Nod-подобных рецепторов и лектиновых рецепторов С-типа, а также играющие важную роль в восприятии и реагировании на патогены или повреждения рецепторы (ассоциированные молекулярные паттерны – PAMP и DAMP соответственно) [Dib P.R.B., 2020]. TLR4 рецепторы тромбоцитов играют важную роль в качестве детекторов высоких уровней циркулирующих липополисахаридов во время сепсиса и в клиренсе патогенов, опосредованном нейтрофилами [Schattner M., 2019]. Не только тромбоциты могут быть инициаторами взаимодействия тромбоцитов с нейтрофилами. Воспаление может вызвать эндотелиальную дисфункцию из-за высокого уровня провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF), а также ферритина. Это приводит к активации эндотелиальных клеток и экспрессии Р-селектина. Нейтрофилы взаимодействуют с эндотелиальным Р-селектином и активируются таким же образом, как и при взаимодействии с тромбоцитарным Р-селектином [Mandel J., 2022]. Активированные тромбоциты высвобождают ряд хемокинов из своих альфа- и плотных гранул, которые облегчают привлечение лейкоцитов к участкам сосудистого повреждения/воспаления. К ним относятся CXCL1, PF-4 (тромбоцитарный фактор 4/CXCL4), CXCL5, NAP-2 (CXCL7) и CCL3, RANTES (регулируется активацией, экспрессируется и секретируется нормальными Т-клетками) (CCL5) и CCL7. Высвобождение этих хемокинов тромбоцитами усиливает рекрутирование лейкоцитов и адгезию их к тромбоцитарным тромбам, а также служит для модулирования функциональных ответов лейкоцитов. Более того, несмотря на отсутствие ядра, тромбоциты экспрессируют мРНК IL-1 β , которая может транслироваться и секретироваться активированными тромбоцитами в виде зрелого IL-1 β – цитокина острой фазы воспаления [McFadyen J.D., 2020].

Адгезия моноцитов к тромбоцитам на фоне воспаления приводит к активизации и миграции ядерного фактора NF- κ B в ядро, где усиливается экспрессия CCL2 и интерлейкина-8 (IL-8) моноцитами. При системной красной волчанке (СКВ) было показано, что тромбоциты активируются иммунными комплексами, и затем образуют агрегаты с моноцитами и дендритными клетками [Moreno-Torres V., 2022]. Инактивация тромбоцитарного пула на мышинных моделях СКВ улучшала течение заболевания. Взаимодействие нейтрофилов и тромбоцитов через CD40 регулируется по принципу положительной обратной связи, а именно, выделение супероксида и активных форм кислорода лейкоцитами повышается на фоне стимуляции секреции CD40L тромбоцитами [Song L., 2022]. Еще одним важным регуляторным цитокином является IL-1 β . Тромбоциты повышают экспрессию лейкоцитами данного цитокина, а экспрессия P-селектина связана с более высокими концентрациями IL-1 β и IL-6 после стимуляции *ex vivo*. На фоне вирусной инфекции тромбоциты высвобождают микровезикулы, заполненные IL-1 β [Слуханчук Е.В., 2022; Anka Idrissi D., 2021].

NETs представлены внеклеточной ДНК и цитоплазматическими и ядерными белками (H3 гистоны), выбрасываемыми нейтрофилами при активации во внеклеточное пространство [Hally K.E., 2021; Ferré-Vallverdú M., 2022]. В состоянии сепсиса происходит связывание TLRs рецепторов с лигандами (бактериальные, вирусные компоненты, токсины), что провоцирует адгезию нейтрофилов. Позже стало известно, что этот механизм взаимодействия зависит от α L β 2-интегрина [Слуханчук Е.В., 2022; Mandel J., 2022]. C3a-белок системы комплимента играет важную роль в активации тромбоцитов, в то время как C5a-белок и прокоагулянтная активность тромбоцитов также индуцируют экспрессию NETs. NETs также действуют как каталитическая платформа, стимулирующая протеолитическую активность нейтрофильной эластазы, заключающуюся в прокоагулянтном эффекте за счет деградации ингибитора пути тканевого фактора; результирующая активация фактора Ха способствует продукции внутрисосудистого фибрина. Это явление усиливается локальным образованием тромбина в результате индукции контактной фазы полифосфатами, высвобождаемыми активированными тромбоцитами. Последние, как уже упоминалось, активируются связыванием гистона H3, высвобождаемого NETs, с лектин-подобным 2 С-типа рецептором (CLEC-2). Все эти пути способствуют локализованному образованию тромбов и улавливанию патогенов [Ferre-Vallverdu M., 2022; Zhu Y., 2022].

Учитывая риск развития иммунитет-опосредованных тромботических состояний на фоне ряда инфекционных процессов, представилось интересным изучить антиагрегантные свойства некоторых противовирусных средств в условиях гиперцитокинемии. Повреждение эндотелия и тромбовоспаление считаются ключевыми элементами в возникновении повреждения органов у пациентов с COVID-19, включая гепатоцеллюлярное повреждение, острое повреждение почек и

инфаркт миокарда [Savastano M.C., 2022]. В ходе клинического применения некоторых противовирусных средств для лечения COVID-19 оказалось, что они проявляют высокую эффективность и существенно снижают риск неблагоприятного исхода [Shahab S., 2020]. В ходе проведения эксперимента было установлено, что инкубация цельной крови с раствором липополисахарида сопровождается увеличением реактивности тромбоцитов в ответ на стимуляцию АДФ на 41% относительно уровня агрегации интактных тромбоцитов. Это подтверждает значительное вовлечение в патогенез гиперцитокинемии тромбоцитарного компонента. Изучение некоторых противовирусных средств позволило заключить, что в случае их инкубации с интактной цельной кровью не наблюдается проявлений антиагрегантных свойств. В то же время, такие средства, как фавипиравир, умифеновир и триазавирин значительно снижали способность тромбоцитов к агрегации в условиях гиперцитокинемии.

Исследованные соединения-лидеры Ф-168, RU-891 и L-36 также были изучены на способность ингибировать цитокиновую гиперагрегацию. Образцы под шифром Ф-168 и RU-891 в условиях гиперцитокинемии не проявили высокого уровня антиагрегантной активности, а то время как соединение L-36 продемонстрировало дозозависимое защитное действие в отношении тромбоцитов, обработанных ЛПС. Наличие ингибирующего влияния соединения L-36 на ЦОГ-2, а также способность подавлять активность макрофагов позволяет заключить, что данное соединение является перспективным для дальнейшего более детального изучения и может послужить основой для создания на его основе перспективного фармакологического корректора повышенного тромбогенного потенциала крови, включая сепсис-ассоциированное тромбообразование.

ВЫВОДЫ

1. На основании данных по изучению влияния 148 новых производных, принадлежащих 12 новым скаффолдов на предмет антиагрегантной активности группы соединений по уровню активности можно представить в следующей последовательности: 6Н-1,3,4-тиадиазины > 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-дионы > N9-имидазобензимидазолы > 3Н-тиазолы > N9-2,3-дигидроимидазобензимидазолы > 2,3-дигидробензофураны > 1,2,4,5-тетразины > 4Н-бензо[1,3]оксазины > 1Н-бензохромены > 1,3-имидазолы > 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидины > 1Н-бензимидазолы. Наиболее перспективные молекулы были выявлены в рядах азотсодержащих производных 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-диона (Ф-168) и N9-имидазобензимидазолы (RU-891), а также среди серосодержащих производных 6Н-1,3,4-тиадиазина (L-36).
2. Соединение Ф-168 по уровню антиагрегантной активности в тестах *in vivo* было сопоставимо с препаратом сравнения тирофибаном (ED₅₀ 0,89 и 0,9 мг/кг, соответственно). На моделях артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (III) и электрическим током, а также в условиях экспериментального инфаркта миокарда АФС и ГЛФ Ф-168 не уступают по антитромботическому действию препарату сравнения тирофибану. На модели адреналин-коллагенового тромбоза соединение Ф-168 предотвращало гибель 80% мышей, в то время как препарат сравнения тирофибан оказывал 70% защитного действия. По способности предотвращать тромбообразование в венозной системе соединение Ф-168 превосходит по активности препарат сравнения тирофибан в 1,7 раза.
3. В результате фармакокинетических исследований для соединения Ф-168 были определены следующие фармакокинетические параметры: AUC 176,87 мкг*час/мл; T_{1/2} 2,07 часа; Cl_{общ.} 7,52 л/час*кг; Vd 22,43 л/кг. Показана высокая степень связывания данного соединения Ф-168 с белками плазмы крови (65,9%). Относительная биодоступность для ГЛФ Ф-168 составила 97,88%.
4. Соединение Ф-168 относится к 3 классу умеренно токсичных соединений. В результате проведенных исследований по изучению хронической токсичности АФС Ф-168 при внутривенном введении крысам в дозах 0,89 и 3,2 мг/кг не выявлено значимых токсических эффектов. В дозе 5,4 мг/кг наблюдалось снижение количества тромбоцитов на 16,0 %, увеличение общего белка периферической крови на 30,0 %. На фоне отмены соединения Ф-168 эти изменения нивелировались. Исследование хронической токсичности ГЛФ Ф-168 при внутривенном введении кроликам в дозах 0,43; 1,1 и 2,3 мг/кг позволило заключить, что в максимальной дозе зафиксировано снижение количества тромбоцитов до 121,0 x 10⁹/л с одновременным удлинением времени свертывания крови до 49,7 сек, которые восстанавливались до контрольных значений при отмене препарата. С учетом фармакологически активной дозы (0,9

мг/кг) и низкой токсичности максимальная рекомендованная начальная доза для человека с целью проведения I фазы клинических исследований составила 3,22 мг.

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

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

7. В результате проведенных исследований по изучению хронической токсичности АФС RU-891 при 6-месячном внутрижелудочном введении крысам в дозах 23,0; 230,0 и 460,0 мг/кг не зафиксировано значимых токсических эффектов. Однако, при исследовании АФС RU-891 в дозе 460,0 мг/кг наблюдались увеличение времени свертывания крови на 35,7%. Спустя месяц после отмены соединения RU-891 данные эффекты не наблюдались. При изучении ГЛФ RU-891 только в максимальной в дозе 220,0 мг/кг при внутрижелудочном введении кроликам способствует удлинению времени свертывания крови на 29,6%, изменению макроскопических показателей печени, которые были нивелированы до контрольных значений спустя месяц после отмены препарата. С учетом фармакологически активной дозы (23,0 мг/кг) и низкой токсичности максимальная рекомендованная начальная доза для человека с целью проведения I фазы клинических исследований составила 270,0 мг.

8. Соединение L-36 в опытах *in vivo* превосходит по антиагрегантной активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,2 раза. На модели тромбоза сонной артерии крыс,

индуцированного хлоридом железа (III) соединение L-36 превосходит по антитромботической активности ацетилсалициловую кислоту в 3 раза, а на модели тромбоза сонной артерии, индуцированного электрическим током в 2,5 раза. При моделировании адреналин-коллагенового тромбоза установлено, что соединение L-36 предотвращает гибель 70% мышей, в то время как ацетилсалициловая кислота – 40% особей. Эксперименты по изучению механизма антиагрегантного действия позволили заключить, что для соединения L-36 характерно влияние на уровень тромбоксана A₂. В условиях ЛПС-индуцированной интоксикации соединение L-36 способствовало снижению уровня эндотелина-1 и фактора фон Виллебранда, что указывает на способность соединения L-36 препятствовать процессам тромбовоспаления. В исследованиях *in silico* показано, что вещество L-36 обладает афинностью к ЦОГ-2 и тромбоксансинтетазе.

9. Соединение L-36 оказывало дозозависимое ингибирующее влияние на агрегацию тромбоцитов в условиях иммунокоагуляционных нарушений. Показатель IC₅₀ для соединения L-36 при этом составил 61,1 мкМ. Соединения Ф-168 и RU-891 не подавляют агрегацию тромбоцитов в условиях цитокиновой гиперагрегации.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведенное исследование позволяет рекомендовать химические классы 3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-дионы, N9-имидазо[3,2-а]бензимидазолы и 1,3,4-тиадиазины как перспективные для поиска и создания на их основе высокоэффективных антиагрегантных средств.
2. Выполненные в полном объеме доклинические исследования субстанций и готовых лекарственных форм соединений Ф-168 и RU-891 являются основанием для проведения клинических исследований с целью дальнейшей коммерциализации.
3. Изучение фармакологических свойств соединения L-36 позволяет расширить представление о процессе тромбообразования, включая иммунотромбогенез.
4. Перспективным направлением является исследование потенциальных антиагрегантных средств в условиях сепсиса.
5. Результаты исследования могут быть включены в образовательную программу по дисциплинам общая и клиническая фармакология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозин-5`-дифосфат
АКШ – аортокоронарное шунтирование
АСК – ацетилсалициловая кислота
АТФ – аденозинтрифосфат
АФС – активная фармацевтическая субстанция
ГЛФ – готовая лекарственная форма
ДАТТ – двойная антитромбоцитарная терапия
ДБНОЭ – доза без наблюдаемого отрицательного эффекта
ДКИ – доклиническое исследование
ДМСО – диметилсульфоксид
КЭА – каротидная эндартерэктомия
ЛПС – липополисахарид
МРНД – максимальная рекомендованная начальная доза
ОКС – острый коронарный синдром
ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии
УТИ – условный терапевтический индекс
ФАД – фармакологически активная доза
ЦОГ – циклооксигеназа
ЭГТА – этиленгликольтетраацетат
ЭДЧ – эквивалентная доза для человека
CD62 – P-селектин
CHDP – катионные защитные пептиды хозяина
CCL5 – хемокин, секретируемый нормальными Т-клетками (RANTES)
CLEC-2 – рецептор лектина С-типа
CXCL4 – тромбоцитарный фактор 4
CXCL7 – бета-тромбоглобулин
ED₅₀ – доза, в которой наблюдается 50% эффекта
Его 1 α – оксидоредуктин 1 α
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HBD – бета-дефенсины человека
HNP – пептид нейтрофилов человека

IC₅₀ – концентрация, в которой наблюдается ингибирование на 50%

IL – интерлейкин

LD₅₀ (ЛД₅₀) – доза, в которой наблюдается гибель 50% животных

MCP-1 – моноцитарный хемоатрактантный белок

NETs – нейтрофильные внеклеточные ловушки

PAR1 – рецепторы, активируемые протеазами 1 подтипа

PDI – протеиндисульфидизомераза

PI3K – фосфотидилинозитол-3-киназа

PTP1b – протеинтирозинфосфатаза 1-бета

TLRs – Toll-подобные рецепторы

TNF – фактор некроза опухоли

TRAP – селективный агонист рецепторов тромбина

TXA₂ (B₂) – тромбоксан A₂ (B₂)

vWF – фактор фон Виллебранда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абзалилов Т.А., Хайрзаманова К.А., Нурланова С.Н., Баширов И.И. Основные направления разработки антиагрегантов и кардиопротекторов//Современные проблемы науки и образования.-2021.-№6.-С. 194. doi: 10.17513/spno.31302
2. Авдонин П.П., Цветаева Н.В., Гончаров Н.В., Рыбакова Е.Ю., Труфанов С.К., Цитрина А.А., Авдонин П.В. Фактор виллебранда в норме и при патологии//Биологические мембраны.-2021.-№4(38).-С. 237-256. doi: 10.31857/S0233475521040034
3. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии/М.: Медицина, 2002. – 240 с.
4. Аркова Н.В. Прямой поиск и изучение соединений, влияющих на реологические свойства крови, среди новых бензимидазолов. дис. канд. мед. наук.: 14.00.25/ Аркова Наталья Владимировна.-Волгоград, 2004.-305 с.
5. Арутюнов А.Г., Батлук Т.И., Башкинов Р.А., Трубникова М.А. Мультифокальный атеросклероз: фокус на профилактике развития ишемических событий//Российский кардиологический журнал.-2021.-№12(26).-С. 163-170.
6. Баринов Э.Ф. Тромбоксан А₂: механизмы образования и внутриклеточные сигнальные системы реализации//Кардиология.-2016.-№4(56). С. 83-90. doi: 10.18565/cardio.2016.4.83-90
7. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Канана Н.Н., Гатина Е.И. Молекулярные механизмы функционирования и роль рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ в тромбогенезе//Украинский кардиологический журнал.-2014.-№1. С. 111-120.
8. Бойцов С.А., Драпкина О.М. Современное содержание и совершенствование стратегии высокого сердечно-сосудистого риска в снижении смертности от сердечно-сосудистых заболеваний//Терапевтический архив.-2021.-№1(93).-С. 4-6. doi: 10.26442/00403660.2021.01.200543.
9. Бойцов С.А., Драпкина О.М., Шляхто Е.В., Конради А.О., Баланова Ю.А., Жернакова Ю.В., Метельская В.А., Ощепкова Е.В., Ротарь О.П., Шальнова С.А. Исследование эссе-РФ (эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах российской федерации). Десять лет спустя//Кардиоваскулярная терапия и профилактика.-2021.-№5(20).-С.143-152.doi: 10.15829/1728-8800-2021-3007.
10. Бойцов С.А., Погосова Н.В., Аншелес А.А. и др. Кардиоваскулярная профилактика 2022. Российские национальные рекомендации//Российский кардиологический журнал.-2023.-№5(28).-С. 119-249. doi: 10.15829/1560-4071-2023-5452
11. Бокерия Л.А., Абдулгасанов Р.А.О., Гасымов Э.Г., Абдулгасанова М.Р. Роль маркеров дисфункции эндотелия в патогенезе сепсиса и острого респираторного дистресс-

синдрома//Грудная и сердечно-сосудистая хирургия.-2021.-№1(63).-С. 20-29.doi: 10.24022/0236-2791-2021-63-1-20-29.

12. Бокерия Л.А., Абдулгасанов Р.А.О., Шогенов М.А., Султанова А.Е. Ишемический инсульт в вертебробазиллярном бассейне//Клиническая физиология кровообращения.-2022.-№1(19).-С. 33-46. doi: 10.24022/1814-6910-2022-19-1-33-46.

13. Бокерия О.Л., Кудзоева З.Ф., Шварц В.А., Коасари А.К., Донаканян С.А. Возможность подбора дезагрегантной терапии у больных ишемической болезнью сердца с учетом полиморфизма гена CYP2C19//Терапевтический архив.-2016.-№5(88).-С. 47-54. doi: 10.17116/terarkh201688547-54

14. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения//Химико-фармацевтический журнал.-2003.-№3(37).-С.32-34.

15. Букатина Т.М. Поиск и изучение антагонистов пуриновых рецепторов среди конденсированных производных индола: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук/Букатина Татьяна Михайловна; Волгоградский государственный медицинский университет.-Волгоград, 2014-167 с.

16. Вавилова Т.В., Соловьева Л.В., Бекоева А.Б., Зубкова П.Ю., Воробьева Н.А., Воробьева А.И., Мельничук Е.Ю., Хруслов М.В., Вереина Н.К., Сафин Д.Д., Галявич А.С., Sluiter M., Ендубаева Г.В., Шляхто Е.В. Лучшие практики российской федерации в организации антикоагулянтной терапии у больных высокого риска тромбоемболических осложнений//Российский кардиологический журнал.-2020.-№6(25).-С.10-14.doi: 10.15829/1560-4071-2020-3945

17. Васильев П.М., Спасов А.А., Кочетков А.Н., Перфильев М.А., Королева А.Р., Голубева А.В., Мартынова Д.О., Бабков Д.А., Литвинов Р.А. Консенсусный прогноз *in silico* фармакокинетической предпочтительности мультитаргетных RAGE-ингибиторов//Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2020. – №2(74).-С. 100-104.

18. Васильев П.М., Спасов А.А., Кочетков А.Н., Перфильев М.А., Королева А.Р., Голубева А.В., Мартынова Д.О., Бабков Д.А., Литвинов Р.А. Консенсусная оценка *in silico* общей безопасности мультитаргетных RAGE-ингибиторов//Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. № 2. – С. 47-51

19. Васильев П.М., Спасов А.А., Кочетков А.Н., Бабков Д.А., Литвинов Р.А. Консенсусная оценка *in silico* острой токсичности мультитаргетных RAGE-ингибиторов//Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2020. – №1(73). – С. 31-33.

20. Васильев П.М., Спасов А.А., Кочетков А.Н., Бабков Д.А., Литвинов Р.А. Консенсусный прогноз *in silico* канцерогенной опасности мультитаргетных RAGE-ингибиторов//Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. – № 1. – С. 55-57.
21. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 22.02.2022.
22. Гайдукова К.А. Антитромбогенная активность новых производных бензимидазола, имеющих в структуре экранированный фенольный заместитель: специальность 3.3.6 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук/Гайдукова Ксения Андреевна; Волгоградский государственный медицинский университет.-Волгоград, 2020-191 с.
23. Гончаров М.Д., Гринштейн Ю.И., Савченко А.А. Особенности продукции активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в формировании недостаточного ответа на ацетилсалициловую кислоту у пациентов с ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования//Трансляционная медицина.-2022.-№1(9).-С. 12-28. doi: 10.18705/2311-4495-2022-9-1-12-28.
24. Гуськова Т.А., Кулес В.Г., Миронов А.Н. Методические рекомендации по определению безопасной дозы лекарственного препарата для проведения I фазы клинических исследований у взрослых волонтеров//Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – С.854-865.
25. Патент № 2108579 Российская Федерация, МПК G01N33/49 (1998.04). Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов: №96116232/14: заявл. 30.07.1996: опубл. 10.04.1998/ Деркачев Э.Ф., Миндукшев И.В., Кривченко А.И., Крашенинников А.А.-8 с.: ил.- текст непосредственный.
26. Домбровский М.М., Никитина Т.Г., Самсонова Н.Н., Петросян К.В., Алесян Б.Г., Бокерия Л.А. Опыт антитромбоцитарной терапии после чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с ишемической болезнью сердца и онкопатологией//Новости сердечно-сосудистой хирургии. 2018.-№1(2).-С. 10-15.
27. Есауленко И.Э., Никитюк Д.Б., Алексеева Н.Т., Шевченко А.А., Соколов Д.А., Клочкова С.В., Кварацхелия А.Г., Филин А.А., Тутельян В.А. Патоморфологические и молекулярно-биологические аспекты повреждения кровеносных сосудов при COVID-19//Журнал анатомии и гистопатологии.-2020.-№4(9).-С. 9-18.
28. Жайпанов М.Т., Абзалиев К.Б., Борыкпаев Н.Б., Ералиева Б.А., Жошыбаев С.Ж. Фармакоэпидемиологический анализ применения антиагрегантов у больных перенесших

аортокоронарное шунтирование//Вестник Казахского национального медицинского университета.-2019.-№1.-С. 104-107.

29. Заболотских И.Б., Киров М.Ю., Афончиков В.С., Буланов А.Ю., Григорьев Е.В., Грицан А.И., Замятин М.Н., Курапеев И.С., Лебединский К.М., Ломиворотов В.В., Лубнин А.Ю., Овечкин А.М., Потиевская В.И., Ройтман Е.В., Синьков С.В., Субботин В.В., Шулуток Е.М. Периоперационное ведение пациентов, получающих длительную антитромботическую терапию. Клинические рекомендации федерации анестезиологов и реаниматологов//Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова.-2019.-№1. С. 7-19.doi: 10.21320/1818-474X-2019-1-7-19

30. Зиганшин Б.А. Сравнительная фармакологическая характеристика P2-рецептор-опосредованных реакций крови человека: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук/Зиганшин Булат Айратович; Казанский государственный медицинский университет.- Казань, 2016-200 с.

31. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Егоров А.А., Никифоров А.А., Мжаванадзе Н.Д. Маркеры эндотелиальной дисфункции у первичных диализных пациентов//Новости хирургии.-2019.-№5(27).-С. 505-514. doi: 10.18484/2305-0047.2019.5.505

32. Китаева Е.Ю., Шпрах В.В. Антиагреганты в лечении и вторичной профилактике ишемического инсульта (обзор литературы)//Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal).-2017.-№2(114).-С. 109-113. doi: 10.12737/article_59a614fdad5fa4.11405630

33. Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию//Вестник ВГМУ.-2013.-№4(12).-С.79-91.

34. Колесникова И.В., Некрасов В.М., Шерстова Т.Н., Цветовская Г.А., Чикова Е.Д., Мальцев В.П., Чернышев А.В. Определение динамических характеристик тромбоцитов по начальной стадии их агрегации//Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Физика.- 2009.-№2(4).-С. 69-77.

35. Комаров А.Л., Шахматова О.О., Коробкова В.В., Новикова Е.С., Гуськова Е.В., Яровая Е.Б., Балахонова Т.В., Шулешова А.Г., Панченко Е.П. Факторы риска и исходы желудочно-кишечных кровотечений у больных стабильной ишемической болезнью сердца: данные наблюдательного регистра длительной антитромботической терапии РЕГАТА-1//Российский кардиологический журнал.-2021.-№6(26).-С. 51-60. doi: 10.15829/1560-4071-2021-4465.

36. Косарев В.В., Бабанов С.А. Клиническая фармакология современных антиагрегантов и их место в фармакотерапии ишемической болезни сердца и ассоциированных состояний//РМЖ.- 2013.-№21(27).-С. 1378-1383.

37. Космачева Е.Д., Намитоков А.М., Донец Е.К., Ачмиз Ф.Р. Современное представление об эффективности и безопасности тикагрелора//Поликлиника.-2020.-№5. С. 50-55.
38. Кочергин Н.А., Кочергина А.М., Ганюков В.И. Прединдикторы острого коронарного синдрома у пациентов с ишемической болезнью сердца//Ангиология и сосудистая хирургия.-2020.-№3(26).-С. 179-184. doi: 10.33529/ANGI02020302
39. Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Шевлягина Н.В., Андреевская С.Г. Тромбоциты: современный взгляд на структуру и функции//Патогенез.-2016.-№1(14).-С. 4-13.
40. Кузнецова В.А. Поиск и изучение соединений с гемореологической активностью среди новых производных метилксантина: специальность 3.3.6 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук/Кузнецова Валентина Андреевна; Волгоградский государственный медицинский университет.-Волгоград, 2010.-211 с.
41. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Гвоздева О.В., Роднина О.С., Солпов А.В. Состояние иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при диффузном токсическом зобе//Медицинская иммунология.-2010.-№1-2(12).-С. 133-138.
42. Кузьмина И.М., Мархулия Д.С., Попугаев К.А., Киселев К.В. Антиагрегантная терапия при остром коронарном синдроме. Неотложная медицинская помощь//Журнал им. Н.В. Склифосовского.-2021.-№4(10).-С. 769-777. doi: 10.23934/2223-9022-2021-10-4-769-777.
43. Кучерявенко А.Ф. Конденсированные производные бензимидазола - новый класс антитромбогенных средств: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук/Кучерявенко Аида Фатиховна; Волгоградский государственный медицинский университет. Волгоград, 2012.-312 с.
44. Лакин К.М. Биотрансформация лекарственных веществ.-М.: Медицина.-1981.-68-73.
45. Ливзан М.А., Ширинская Н.В. Гастроинтестинальные осложнения у пациентов, получающих антитромботическую и антикоагулянтную терапию//Consilium Medicum.-2019.-№8(21).-С.71-73. doi:10.26442/20751753.2019.8.190531
46. Лисина С.В., Брель А.К., Мазанова Л.С., Спасов А.А. Исследование жаропонижающей активности новых производных салициловой кислоты//Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.-2007.-№2(22).-С.67-70.
47. Лобанова Т.Н., Шарапов Г.Н., Есипов А.В., Павлова М.В., Алехнович А.В. Современная лабораторная диагностика нарушений гемостаза в клинической практике многопрофильного госпиталя//Госпитальная медицина: наука и практика.-2020.-№1(4).-С.54-64. doi: 10.34852/GM3CVKG.2020.20.87.010

48. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов/А.В. Мазуров.-Москва: Литера, 2011.-456 с. ISBN 978-5-4235-0049-8
49. Мазуров А.В., Зюряев И.Т., Хаспекова С.Г., Якушкин В.В., Сироткина О.В., Руда М.Я. Факторы, влияющие на агрегационную активность тромбоцитов у больных с острым коронарным синдромом//Терапевтический архив.-2014.-№9(86).-С. 83-89.
50. Медведев И.Н. Функциональная активность тромбоцитов у крыс в течение онтогенеза//Вестник Томского государственного университета. Биология.-2016.-№2(34).-С.150-160.doi: 10.17223/19988591/34/10
51. Мирзоян Р.С., Шабалина А.А., Ганьшина Т.С., Курдюмов И.Н., Турилова А.И., Косточка Л.М., Козлов А.В., Аннушкин В.А., Корнилова А.А., Танащян М.М. Расширение горизонтов антиагрегантной терапии. Пилотное исследование антиагрегационных свойств нового средства тропанового ряда//Анналы клинической и экспериментальной неврологии.-2020.-№3(14).-С. 53-59.doi: 10.25692/ACEN.2020.3.7
52. Мирсаева Г.Х., Хакимова Р.А., Тимершина И.Р. О нарушениях тромбоцитарного гемостаза у больных с артериальной гипертензией в различные сроки после перенесённого геморрагического инсульта//Казанский медицинский журнал.-2015.-№5(96).-С. 722-727. doi: 10.17750/KMJ2015-722
53. Михайлова И.Е. Антитромбоцитарные препараты в профилактике и лечении коронарного атеротромбоза. Обзор литературы//Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2014.
54. Момот А.П., Кудинова И.Ю., Трухина Д.А. Проблемные вопросы, связанные с определением уровня D-димера и стандартизацией оценки данного маркера при внутрисосудистом свертывании крови//Бюллетень медицинской науки.-2021.-№4(24).-С. 88-94. doi: 10.31684/25418475-2021-4-88
55. Момот А.П., Царигородцева Н.О., Фёдоров Д.В., Бишевский К.М., Вострикова Н.В., Климова Е.Е. Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала (обзор литературы)//Сибирский научный медицинский журнал.-2020.-№2(40).-С.1-14. doi: 10.15372/SSMJ20200201
56. Науменко Л.В. Поиск и изучение производных ксантина, проявляющих гемореологические эффекты. дис. канд. наук. 2006.
57. Неъматзода О., Гаибов А.Д., Калмыков Е.Л., Баратов А.К.COVID-19-ассоциированный артериальный тромбоз//Вестник Авиценны.-2021.-№1(23).- С. 85-94.
58. Отдельнов Л.А., Мухин А.С., Мастюкова А.М., Цыганова Ю.Е. Желудочно-кишечные кровотечения у больных в остром периоде инфаркта миокарда: обзор литературы//Курский

научно-практический вестник Человек и его здоровье.-2020.-№3.-С. 11-19.DOI: 10.21626/vestnik/2020-3/02

59. Перепеч Н.Б., Трегубов А.В. Приверженность врачей рекомендациям по применению антиагрегантов в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний//Рациональная фармакотерапия в кардиологии.-2018.-№2(14).-С. 235-243. doi: 10.20996/1819-6446-2018-14-2-235-243

60. Петриков А.С., Шойхет Я.Н., Белых В.И., Дронов С.В. Многофакторный анализ в диагностике тромбозов глубоких вен нижних конечностей//Тромбоз, гемостаз и реология.-2013.-№4(56).-С. 13-21.

61. Петров В.И., Герасименко А.С., Горбатенко В.С., Шаталова О.В. Фармакодинамика оральных антикоагулянтов у больных с фибрилляцией предсердий в остром периоде ишемического инсульта//Фармация и фармакология.-2020.-№4(8).-С. 222-232. doi: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-222-232.

62. 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.-№1(15).-С. 49-53.

63. Погосова Н.В., Бойцов С.А., Аушева А.К. и др. Медикаментозная терапия и приверженность к ней пациентов с ишемической болезнью сердца: результаты российской части международного многоцентрового исследования EUROASPIRE V//Кардиология.-2021.-№8(61).-С. 4-13. doi: 10.18087/cardio.2021.8.n1650

64. Полянцев А.А., Фролов Д.В., Линченко Д.В., Карпенко С.Н., Черноволенко А.А., Дьячкова Ю.А. Распространенность острых эрозивно-язвенных гастродуоденальных поражений у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, принимающих антикоагулянты и антиагреганты//Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.-2019.-№9(169).-С. 65-74. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-169-9-65-74

65. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19):временные методические рекомендации. Версия 12 (07.05.2021).

66. Пряхин И.С., Мурашко С.С., Бернс С.А., Пасечник И.Н., Арсеньева Н.В., Дьякова М.П., Гафурова Н.М., Гончарова М.А., Горшколупова О.Л. Агрегация тромбоцитов как маркер эффективности и безопасности антиагрегантной терапии у пациентов с ишемической болезнью сердца//Кремлевская медицина. Клинический вестник.-2020.-№1. С. 64-71.doi: 10.26269/hb8d-qg49.

67. Решетько О.В., Соколов А.В., Фурман Н.В., Агапов В.В. Динамика антитромботической терапии фибрилляции предсердий в стационаре в 2011- 2012 гг. И 2016-2017 гг.

- (фармакоэпидемиологический анализ)//Рациональная фармакотерапия в кардиологии.-2020.-№5(16).-С. 686-692. doi: 10.20996/1819-6446-2020-10-10.
68. Ройтман Е.В. Современная профилактика венозных тромбозомболических осложнений. Доказательность и обоснованность. В книге: противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы. Тезисы.-2015.-С.145-146.
69. Ройтман Е.В., Вавилова Т.В., Маркин С.М., Кравцов П.Ф., Мазайшвили К.В. Реалии применения антикоагулянтной терапии при COVID-19//Тромбоз, гемостаз и реология.-2021.-№1.-С. 18-25. doi: 10.25555/THR.2021.1.0957.
70. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств/ Под ред. А.Н.Миронова.– Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
71. Рудой А.С., Лысый Ю.С. Сложные вопросы антитромботической терапии при остром коронарном синдроме у пациентов с фибрилляцией предсердий//Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски.-2019.-№3(1).-С. 474-488.
72. Сакаев М.Р., Миндукшев И.В., Лесновская Е.Е. и др. Оценка эффективности действия пуриновых нуклеотидов на P2-рецепторы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния//Эксперим. и клинич. фармакология.-2000.-№3(63).-С.65-69.
73. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов/М.: Медицина, 1996. – 542 с.
74. Сиротенко В.С. Антитромбогенные свойства новых трициклических производных диазепино(1,2-а) бензимидазола: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»; диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук/Сиротенко Виктор Сергеевич; Волгоградский государственный медицинский университет.- Волгоград, 2018.-158 с.
75. Слепухина А.А., Зеленская Е.М., Лифшиц Г.И. Генетические факторы риска сосудистого старения: молекулярные механизмы, полиморфизм генов-кандидатов и генные сети//Российский кардиологический журнал.-2019.-№10(24).-С.78-85.doi: 10.15829/1560-4071-2019-10-78-85
76. Слуханчук Е.В., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Солопова А.Г., Цибизова В.И., Якубова Ф., Ай Д., Гри Ж.К., Макацария А.Д. Роль тромбоцитов в противовирусном иммунитете//Акушерство, гинекология и репродукция.-2022.-№2(16).-С. 204-212. doi: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2022.305
77. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А. Кальций-зависимый механизм антиагрегантного действия соединения RU-891//Экспериментальная и клиническая фармакология.-2014.-№3(77).-С.16-19.
78. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Сиротенко В.С., Гайдукова К.А., Халиуллин Ф.А. Антиагрегантная активность ангипура на моделях артериального и венозного

тромбоза//Экспериментальная и клиническая фармакология.-2021.-№9(84).-С.20-23.doi: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-20-23

79. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Смирнов А.В., Сиротенко В.С., Панышин Н.Г., Гайдукова К.А., Диваева Л.Н. Антитромботическая активность нового производного диазепино[1,2-а]бензимидазола на модели тромбоза легочной артерии у мышей//Экспериментальная и клиническая фармакология.-2020.-№5(83).-С.15-18.doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-5-15-18

80. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Халиуллин Ф.А., Гурова Н.А., Сиротенко В.С., Самородов А.В., Гайдукова К.А., Павлов В.Н. Антитромботическая активность антиагрегантного средства ангиপুর на модели артериального тромбоза у крыс с изопротеренолиндуцированным инфарктом миокарда//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2021.-№9(172).- С.303-306.

81. Спасов А.А., Сиротенко В.С., Гайдукова К.А., Кучерявенко А.Ф., Морковник А.С., Анисимова В.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А. Антитромботическая активность нового производного тетрагидро[1,3] diazepino[1,2-а]-бензимидазола соединения ДАБ-15 на модели артериального тромбоза//Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.-2016.-№1(57).-56-58.

82. Сиротенко В.С., Кучерявенко А.Ф., Липов Д.С., Спасов А.А., Анисимова В.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А., Морковник А.С. Влияние соединения ДАБ-15 на секрецию АТФ из плотных гранул тромбоцитов. В книге: Микроциркуляция и гемореология. XI Международная научная конференция. Посвященная 100-летию со дня рождения академика А.М. Чернуха. Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова факультет фундаментальной медицины, Ярославский государственный медицинский университет, Международное общество по клинической гемореологии (ISCH).-2017.-42.

83. Скугорева С.Г., Ашихмина Т.Я., Фокина А.И., Лялина Е.И. Химические основы токсического действия тяжёлых металлов (обзор)//Теоретическая и прикладная экология.-2016.- №1.-С.4-13.

84. Стуковина А. Ю. Прямой поиск и изучение антагонистов пуриновых рецепторов для ингибирования агрегации тромбоцитов среди конденсированных производных бензимидазола. дис. канд. наук. 2006

85. Сулимов В.А., Мороз Е.В. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам (аспирину, клопидогрелу) у пациентов, подвергающихся селективному стентированию коронарных артерий//Рациональная фармакотерапия в кардиологии.-2012.-№1(8).-С. 23-30. doi: 10.20996/1819-6446-2012-8-1-23-30

86. Танащян М.М., Антонова К.В., Шабалина А.А., Лагода О.В., Романцова Т.И. Состояние гемостаза и углеводного обмена у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и цереброваскулярными заболеваниями//Тромбоз, гемостаз и реология.-2018.-№4(76).-С. 16-23. doi: 10.25555/THR.2018.4.0858
87. Терещенко А.С., Меркулов Е.В., Самко А.Н., Ускач Т.М., Кондратова Н.В., Арутюнян Г.К., Абугов С.А. Возможность применения новых антиагрегантов у пациентов после проведения планового чрескожного коронарного вмешательства//Эндоваскулярная хирургия.-2020.-№7(1).- С. 14-23. doi: 10.24183/2409-4080-2020-7-1-14-23
88. Ткачёва О.Н., Воробьёва Н.М., Котовская Ю.В., Рунихина Н.К., Стражеско И.Д., Виллевалде С.В., Драпкина О.М., Комаров А.Л., Орлова Я.А., Панченко Е.П., Погосова Н.В., Фролова Е.В., Явелов И.С., Аверков О.В., Архипов М.В., Баранова Е.И., Барбараш О.Л., Бойцов С.А., Болотнова Т.В., Булгакова С.В. и др. Антитромботическая терапия в пожилом и старческом возрасте: согласованное мнение экспертов российской ассоциации геронтологов и гериатров и национального общества профилактической кардиологии//Кардиоваскулярная терапия и профилактика.-2021.-№3(20).-С. 135-184. doi: 10.15829/1728-8800-2021-2847.
89. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О. и др. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы)/М.: Медицина, 1991.-208 с.
90. Федоткина Ю.А., Панченко Е.П.Тромбозы в онкологии. Часть 2//Атеротромбоз.-2017.-№2.- С. 3-12. doi: 10.21518/2307-1109-2017-2-3-12
91. Филимонов Д.А., Поройков В.В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2006. – №2(50). – С. 66-75.
92. Хропова Т.Н. Влияние производных имидазобензимидазола с аниоксидантной и гемореологической активностью на регенерацию кожи при сниженном кровоснабжении. дис. канд. наук. 2004
93. Чазов Е. И. Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний /под общ. ред. Е. И. Чазова, Ю. А. Карпова.-Москва : Литтерра, 2016. - 784 с.
94. Чёгёр С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест: Изд-во акад. соц. республики Румынии.-1975.-60-68.
95. Чуканова Е.И., Чуканова А.С., Надарейшвили Г.Г., Гулиева М.Ш. Антитромботическая терапия как первичная и вторичная профилактика инсульта//Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.-2016.-№10(116).-С. 85-88. doi: 10.17116/jnevro201611610185-88

96. Шахматова О.О. Временные рекомендации международного общества специалистов по тромбозу и гемостазу (isth) по выявлению и коррекции коагулопатии у пациентов с COVID-19: дайджест//Атеротромбоз.-2020.-№1.-С. 6-8. doi: 10.21518/2307-1109-2020-1-6-8
97. Шляхто Е.В., Баранова Е.И., Ионин В.А. Антитромботическая терапия при фибрилляции предсердий и коморбидной патологии - как выбрать оптимальное решение//Российский кардиологический журнал.-2021.-№12(26).-С. 154-162.
98. Шляхто Е.В., Виллевалде С.В., Ежов А.В., Зенин С.А., Козиолова Н.А., Кореннова О.Ю., Новикова Т.Н., Протасов К.В., Чумакова Г.А., Teutsch C., Lu S., Lip G.Y.H., Huisman M.V. Клинический портрет пациента с фибрилляцией предсердий в российской федерации в зависимости от антитромботической терапии. Результаты II фазы глобального регистра GLORIA-AF//Российский кардиологический журнал.-2020.-№11(25).-С. 73-84. doi: 10.15829/1560-4071-2020-4179.
99. Шуваева В.Н., Горшкова О.П. Активность фактора виллебранда у крыс после кратковременной ишемии головного мозга//Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.-2020.-№8(106).-С. 964-973. doi: 10.31857/S0869813920080087
100. Abdul Y., Jamil S., He L., Li W., Ergul A. Endothelin-1 (ET-1) promotes a proinflammatory microglia phenotype in diabetic conditions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*.-2020.-98(9):596-603. doi: 10.1139/cjpp-2019-0679.
101. Abood K.K., Paul M.R., Kuo D.J. Deep Vein Thrombosis in a Young, Healthy Baseball Catcher: A Case Report and Review of the Literature. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*.-2019.-41(4):321-323. doi: 10.1097/MPH.0000000000001113.
102. Aggarwal R., Hooda M., Kumar P., Sumran G.. Vision on Synthetic and Medicinal Facets of 1,2,4-Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine Scaffold. *Top. Curr. Chem. (Cham)*.-2022.-380(2): 10. doi: 10.1007/s41061-022-00365-x
103. Ajjan R.A., Kietsiriroje N., Badimon L., Vilahur G., Gorog D.A., Angiolillo D.J., Russell D.A., Rocca B., Storey R.F. Antithrombotic therapy in diabetes: which, when, and for how long? *Eur. Heart J.*.-2021.-42(23).-P.2235–2259. doi: 10.1093/eurheartj/ehab128
104. Aksu H.U., Oner E., Celik O. et al. Aspirin resistance in patients undergoing hemodialysis and effect of hemodialysis on aspirin resistance. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*.-2015.-21(1):82-6. doi: 10.1177/1076029613489597.
105. Albadawi H., Witting A.A., Pershad Y., Wallace A., Fleck A.R., Hoang P., Khademhosseini A., Oklu R. Animal models of venous thrombosis. *Cardiovasc. Diagn. Ther.*.-2017.-7(3).-197–206. doi: 10.21037/cdt.2017.08.10

106. Alberti S., Zhang Q., D'Agostino I. et al. The antiplatelet agent revacept prevents the increase of systemic thromboxane A2 biosynthesis and neointima hyperplasia. *Sci. Rep.*-2020.-10(1):21420. doi: 10.1038/s41598-020-77934-x.
107. Alfi Y., de Boer A., Deneer V.H.M., Souverein P.C., Klungel O.H. Patterns of antiplatelet drug use after a first myocardial infarction during a 10-year period. *Br. J. Clin. Pharmacol.*-2017.-83(3).-P.632–641. doi: 10.1111/bcp.13139
108. Alhazzani W., Møller M.H., Arabi Y.M., Loeb M., Gong M.N. et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med.*-2020.-46(5):854-887. doi: 10.1007/s00134-020-06022-5.
109. Almas T., Musheer A., Ejaz A. et al. Efficacy and safety of direct oral anticoagulants with and without Aspirin: A systematic review and Meta-analysis. *Int. J. Cardiol. Heart. Vasc.*-2022.-40:101016. doi: 10.1016/j.ijcha.2022.101016.
110. Alshbool F.Z., Karim Z.A., Espinosa E.V.P., Lin O.A., Khasawneh F.T. Investigation of a Thromboxane A2 Receptor-Based Vaccine for Managing Thrombogenesis. *J. Am. Heart. Assoc.*-2018.-7(13):e009139. doi: 10.1161/JAHA.118.009139.
111. Anghel L., Sascău R., Radu R., Stătescu C. From Classical Laboratory Parameters to Novel Biomarkers for the Diagnosis of Venous Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.*-2020.-21(6).-P.1920. doi: 10.3390/ijms21061920.
112. Angiolillo D.J., Bhatt D.L., Cannon C.P. et al. Antithrombotic Therapy in Patients With Atrial Fibrillation Treated With Oral Anticoagulation Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: A North American Perspective: 2021 Update. *Circulation.*-2021.-143(6):583-596. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050438.
113. Anka Idrissi D., Senhaji N., Aouiss A. et al. IL-1 and CD40/CD40L platelet complex: elements of induction of Crohn's disease and new therapeutic targets. *Arch. Pharm. Res.*-2021.-44(1):117-132. doi: 10.1007/s12272-020-01296-1.
114. Aquino-Domínguez A.S., Acevedo-Sánchez V., Cruz-Hernández D.S. et al. Human Platelets Contain, Translate, and Secrete Azurocidin; A Novel Effect on Hemostasis. *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(10):5667. doi: 10.3390/ijms23105667.
115. Asakura H., Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int. J. Hematol.* 2021. 113(1). P. 45-57. doi: 10.1007/s12185-020-03029-y.
116. Baby K., Maity S., Mehta C.H., Suresh A., Nayak U.Y., Nayak Y. Targeting SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase: An in silico drug repurposing for COVID-19. *F1000Res.*-2020.-9:1166. doi: 10.12688/f1000research.26359.1.
117. Bajraktari G., Bytyçi I., Bajraktari A. et al. Non-inferiority of 1 month versus longer dual antiplatelet therapy in patients undergoing PCI with drug-eluting stents: a systematic review and meta-

- analysis of randomized clinical trials. *Ther. Adv. Chronic. Dis.*-2022.-13: 20406223221093758. doi: 10.1177/20406223221093758
118. Bala M.M., Celinska-Lowenhoff M., Szot W., Padjas A., Kaczmarczyk M., Swierz M.J., Undas A. Antiplatelet and anticoagulant agents for secondary prevention of stroke and other thromboembolic events in people with antiphospholipid syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.*-2020.-10.-CD012169. doi: 10.1002/14651858.CD012169.pub3
119. Banerjee P., Eckert A.O., Schrey A.K., Preissner R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res.* – 2018. – 46. – Iss. 1: 257-263.
120. Beck F., Solari F.A., Dell'aica M., Loroch S., Burkhart J.M., Zahedi R.P., Sickmann A., Geiger J., Gambaryan S., Mindukshev I., Mattheij N.J., Heemskerk J.W.M., Pötz O., Jurk K., Walter U., Fufezan C. Temporal quantitative phosphoproteomics of adp stimulation reveals novel central nodes in platelet activation and inhibition. *Blood.*-2017.-129(2).-1-12. doi: 10.1182/blood-2016-05-714048
121. Behrens E.M., Koretzky G.A. Review: Cytokine Storm Syndrome: Looking Toward the Precision Medicine Era. *Arthritis Rheumatol.*-2017.-69(6):1135-1143. doi: 10.1002/art.40071.
122. Belton O., Fitzgerald D.J. Cyclooxygenase isoforms and atherosclerosis.// *Exp. Rev. Mol. Med.*-2003.-P.-1- 18.
123. Berger J.S. Oral Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of Acute Coronary Syndrome. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.*-2018.-18(6).-P.457–472. doi: 10.1007/s40256-018-0291-2
124. Bergmark B.A., Mathenge N., Merlini P.A., Lawrence-Wright M.B., Giugliano R.P. Acute coronary syndromes. *The Lancet.*-2022.-399(10332).-1347–1358. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02391-6.
125. Bernard I., Limonta D., Mahal L.K., Hobman T.C. Endothelium Infection and Dysregulation by SARS-CoV-2: Evidence and Caveats in COVID-19. *Viruses.*-2020.-13(1):29. doi: 10.3390/v13010029.
126. Berry C.N., Lunven C., Lechaire I., Girardot C., O'Connor S.E. Antithrombotic activity of a monoclonal antibody inducing the substrate form of plasminogen activator inhibitor type 1 in rat models of venous and arterial thrombosis. *Br. J. Pharmacol.*-1998.-125(1).- 29–34. doi: 10.1038/sj.bjp.0702030
127. Bhaskar S., Sinha A., Banach M., Mittoo S., Weissert R., Kass J.S., Rajagopal S., Pai A.R., Kutty S. Cytokine Storm in COVID-19-Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Front. Immunol.*-2020.-11:1648. doi: 10.3389/fimmu.2020.01648.
128. Bhatt D.L., Eikelboom J.W., Connolly S.J. et al. Role of Combination Antiplatelet and Anticoagulation Therapy in Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Insights From the COMPASS Trial. *Circulation.*-2020.-141(23).-P.1841–1854. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046448

129. Bikdeli B., Madhavan M.V., Jimenez D. et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020. 75(23). P. 2950-2973.
130. Biswas R., Boyd E.K., Eaton N., Steenackers A. et al. PACSIN2 regulates platelet integrin β 1 hemostatic function. *J. Thromb. Haemost.*-2023.-S1538-7836(23)00655-4. doi: 10.1016/j.jtha.2023.08.026.
131. Boarescu P.-M., Boarescu I., Bocşan I.C., Pop R.M., Gheban D., Bulboacă A.E., Nicula C., Râjnoveanu R.-M., Bolboacă S.D. Curcumin Nanoparticles Protect against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction by Alleviating Myocardial Tissue Oxidative Stress, Electrocardiogram, and Biological Changes. *Molecules.*-2019.-24(15).-2802. doi: 10.3390/molecules24152802
132. Bouget J., Balusson F., Viglino D., Roy P.-M., Lacut K., Pavageau L., Oger E. Major bleeding risk and mortality associated with antiplatelet drugs in real-world clinical practice. A prospective cohort study. *PLoS. One.*-2020.-15(8).-P. e0237022. doi: 10.1371/journal.pone.0237022
133. Burnstock G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. *Purinergic Signal.*-2015.-11(4).-P.411–434. doi: 10.1007/s11302-015-9462-7
134. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.*-2017.-120(1):207-228. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726.
135. Cabrera D., Walker K., Moise S., Telling N.D., Harper A.G.S. Controlling human platelet activation with calcium-binding nanoparticles. *Nano Res.*-2020.-13(10):2697-2705. doi: 10.1007/s12274-020-2912-8.
136. Cacciari B., Crepaldi P., Cheng C.Y., Bossi E., Spalluto G., Federico S., Jacobson K.A., Cattaneo M. Structure Activity Relationship of 4-Amino-2-thiopyrimidine Derivatives as Platelet Aggregation Inhibitors. *Med. Chem.*-2019.-15(8):863-872. doi: 10.2174/1573406415666190208124534.
137. Campillo N., García C., Goya P., Páez J.A., Carrasco E., Grau M. Novel arylpyrazino[2,3-c][1,2,6]thiadiazine 2,2-dioxides as inhibitors of platelet aggregation. 1. Synthesis and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.*-1999.-42(10):1698-704. doi: 10.1021/jm981103j.
138. Carter K.T., Palei A.C., Spradley F.T., Witcher B.M., Martin L., Hester R.L., Kutcher M.E. A rat model of orthopedic injury-induced hypercoagulability and fibrinolytic shutdown. *J. Trauma. Acute Care. Surg.*-2020.-89(5).-926–931. doi: 10.1097/TA.0000000000002924
139. Carty E., Macey M., McCartney S.A., Rampton D.S. Ridogrel, a dual thromboxane synthase inhibitor and receptor antagonist: anti-inflammatory profile in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*-2000.-14(6):807-17. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00779.x.
140. Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood.*-2011.-117(7):2102-12. doi: 10.1182/blood-2010-08-263111.

141. Chapin J.C., Hajjar K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.*-2015.-29(1):17-24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
142. Chatterjee M., Ehrenberg A., Toska L.M. et al. Molecular Drivers of Platelet Activation: Unraveling Novel Targets for Anti-Thrombotic and Anti-Thrombo-Inflammatory Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*-2020.-21(21).-P.7906. doi: 10.3390/ijms21217906
143. Chaudhary P.K., Kim S. Characterization of the distinct mechanism of agonist-induced canine platelet activation. *J. Vet. Sci.*-2019.-20(1):10-15. doi: 10.4142/jvs.2019.20.1.10.
144. Chen H., Liu D., Ge L., Wang T., Ma Z., Han Y., Duan Y., Xu X., Liu W., Yuan J., Liu J., Li R., Du R. Catestatin prevents endothelial inflammation and promotes thrombus resolution in acute pulmonary embolism in mice. *Biosci. Rep.*-2019.-39(11).-BSR20192236. doi: 10.1042/BSR20192236
145. Chen H., Lu A., Zhang X., Gui L., Wang Y., Wu J., Feng H., Peng S., Zhao M. Design and development of ICCA as a dual inhibitor of GPIIb/IIIa and P-selectin receptors. *Drug. Des. Devel. Ther.*-2018.-2097–2110. doi: 10.2147/DDDT.S169238
146. Chen Z., Zhang H., Qu M., Nan K., Cao H., Cata J.P., Chen W., Miao C. Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*-2021.-11:653228. doi: 10.3389/fcimb.2021.653228.
147. Chen H., Zhang S., Wang H., Bao L., Wu W., Qi R. Fruitflow inhibits platelet function by suppressing Akt/GSK3 β , Syk/PLC γ 2 and p38 MAPK phosphorylation in collagen-stimulated platelets. *BMC Complement. Med. Ther.*-2022.-22: 75. doi: 10.1186/s12906-022-03558-5
148. Chirkov Y.Y., Nguyen T.H., Horowitz J.D. Impairment of Anti-Aggregatory Responses to Nitric Oxide and Prostacyclin: Mechanisms and Clinical Implications in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(3): 1042. doi: 10.3390/ijms23031042
149. Cho M.S., Noh K., Haemmerle M., Li D., Park H. et al. Role of ADP receptors on platelets in the growth of ovarian cancer. *Blood.*-2017.-130(10).-P.1235–1242. doi: 10.1182/blood-2017-02-769893
150. Choffat D., Farhoumand P.D., Jaccard E. et al. Risk stratification for hospital-acquired venous thromboembolism in medical patients (RISE): Protocol for a prospective cohort study. *PLoS One.*-2022.-17(5): e0268833. doi: 10.1371/journal.pone.0268833
151. Chowdhury A., Zdenek C.N., Lewin M.R., Carter R., Jagar T., Ostanek E., Harjen H., Aldridge M., Soria R., Haw G., Fry B.G. Venom-Induced Blood Disturbances by Palearctic Viperid Snakes, and Their Relative Neutralization by Antivenoms and Enzyme-Inhibitors. *Front. Immunol.*-2021.-12.-688802. doi: 10.3389/fimmu.2021.688802
152. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 2021. 78(4). P. 1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.

153. Colling M.E., Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc. Med.* 2020. 25(5). P. 471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640.
154. Connors J.M., Levy J.H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood.* 2020. 135(23). P. 2033-2040. doi: 10.1182/blood.2020006000.
155. Costa F., Montalto C., Branca M. et al. Dual antiplatelet therapy duration after percutaneous coronary intervention in high bleeding risk: a meta-analysis of randomized trials. *Eur. Heart. J.*-2023.-44(11):954-968. doi: 10.1093/eurheartj/ehac706.
156. Costa T.G.R., Katz M., Lemos Neto P.A. et al. Low platelet reactivity in patients with myocardial infarction treated with aspirin plus ticagrelor. *Einstein (Sao Paulo)*.-2022.-20:eAO7001. doi: 10.31744/einstein_journal/2022AO7001.
157. Craver B.M., Ramanathan G., Hoang S., Chang X., Mendez Luque L.F., Brooks S., Lai H.Y., Fleischman A.G. N-acetylcysteine inhibits thrombosis in a murine model of myeloproliferative neoplasm. *Blood Adv.*-2020.-4(2).-312–321. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000967
158. Crescence L., Kramberg M., Baumann M., Rey M., Roux S., Panicot-Dubois L., Dubois C., Riederer M.A. The P2Y₁₂ Receptor Antagonist Selatogrel Dissolves Preformed Platelet Thrombi In Vivo. *J. Clin. Med.*-2021.-10(22):5349. doi: 10.3390/jcm10225349.
159. Cunha A.C., Figueiredo J.M., Tributino J.L.M. et al. Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*-2003.-11:2051–2059. doi: 10.1016/S0968-0896(03)00055-5.
160. Czopek A., Kubacka M., Bucki A., Siwek A. et al. Novel serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonists derived from 4-phenylcyclohexane-5-spiro-and 5-methyl-5-phenyl-hydantoin, for use as potential antiplatelet agents. *Pharmacol. Rep.*-2021.-73(5):1361-1372. doi: 10.1007/s43440-021-00284-6.
161. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules // *Sci. Rep.* – 2017. – Iss. 7. – Art. 42717.
162. de Veer A.J.W.M., Bennaghmouch N., Bor W.L. et al. The WOEST 2 registry: A prospective registry on antithrombotic therapy in atrial fibrillation patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Neth. Heart. J.*-2022.-30(6):302-311. doi: 10.1007/s12471-022-01664-0.
163. Delewi R., Zijlstra F., Piek J.J. Left ventricular thrombus formation after acute myocardial infarction. *Heart.*-2012.-98(23).-P.1743–1749. doi: 10.1136/heartjnl-2012-301962
164. Denorme F., Portier I., Rustad J.L. et al. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury. *J. Clin. Invest.*-2022.-132(10):e154225. doi: 10.1172/JCI154225.
165. Di Minno G., Silver M.J., Murphy S. Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood.*-1983.-61(6).-P.1081-5.

166. Dib P.R.B., Quirino-Teixeira A.C., Merij L.B. et al. Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. *J. Leukoc. Biol.*-2020.-108(4):1157-1182. doi: 10.1002/JLB.4MR0620-701R.
167. Drug Likeness Tool (DruLiTo): Официальный сайт National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER S.A.S.), 2015, URL: http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html.
168. Dupuis A., Bordet J.C., Eckly A., Gachet C. Platelet delta-Storage Pool Disease: An Update. *J. Clin. Med.*-2020.-9(8):2508. doi: 10.3390/jcm9082508.
169. Estevez B., Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*.-2017.-32(2):162-177. doi: 10.1152/physiol.00020.2016.
170. Evans L., Rhodes A., Alhazzani W., Antonelli M. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.*-2021.-47(11):1181-1247. doi: 10.1007/s00134-021-06506-y.
171. Ezzeroug Ezzraimi A., Hannachi N., Mariotti A., Rolain J.M., Camoin-Jau L. Platelets and *Escherichia coli*: A Complex Interaction. *Biomedicines*.-2022.-10(7):1636. doi: 10.3390/biomedicines10071636.
172. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.*-2020.-383(23):2255-2273. doi: 10.1056/NEJMra2026131.
173. Fan C., Yang X., Wang W.W. et al. Role of Kv1.3 Channels in Platelet Functions and Thrombus Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2020.-40(10):2360-2375. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314278.
174. Fernández D.I., Provenzale I., Cheung H.Y.F., van Groningen J., Tullemans B.M.E., Veninga A., Dunster J.L., Honarnejad S., van den Hurk H., Kuijpers M.J.E., Heemskerk J.W.M. Ultra-high-throughput Ca²⁺ assay in platelets to distinguish ITAM-linked and G-protein-coupled receptor activation. *iScience*.-2022.-25(1).-103718. doi: 10.1016/j.isci.2021.103718
175. Fernando H., McFadyen J.D., Wang X., Shaw J., Stub D., Peter K. P2Y₁₂ Antagonists in Cardiovascular Disease-Finding the Best Balance Between Preventing Ischemic Events and Causing Bleeding. *Front. Cardiovasc. Med.*-2022.-9:854813. doi: 10.3389/fcvm.2022.854813.
176. Ferrara J.L., Abhyankar S., Gilliland D.G. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplantation Proceedings*.-1993.-25(1 Pt 2):1216-1217.
177. Ferré-Vallverdú M., Latorre A.M., Fuset M.P. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with STEMI. Association with percutaneous coronary intervention and antithrombotic treatments. *Thromb. Res.*-2022.-213:78-83. doi: 10.1016/j.thromres.2022.03.002.
178. Flower R.J. Of platelets and aggregometers: personal reminiscences of Gus Born (1921-2018). *Platelets*.-2018.-29(8):749-755. doi: 10.1080/09537104.2018.1533740

179. Fraga A.G.M., Rodrigues C.R., de Miranda A.L.P. et al. Synthesis and evaluation of novel heterocyclic acylhydrazones derivatives, designed as PAF antagonist candidates. *Eur. J. Pharm. Sci.*-2000.-11:285–290. doi: 10.1016/S0928-0987(00)00102-0.
180. Frank D., Zlotnik A., Boyko M. et al. The Development of Novel Drug Treatments for Stroke Patients: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(10): 5796. doi: 10.3390/ijms23105796
181. Fu Z., Jiao Y., Wang J., Zhang Y., Shen M., Reiter R.J., Xi Q., Chen Y. Cardioprotective Role of Melatonin in Acute Myocardial Infarction. *Front. Physiol.*-2020.-11.-366. doi: 10.3389/fphys.2020.00366
182. Furie B., Furie C., Thrombus formation in a living mouse// *Blood Cells Mol Dis.* 2006 Mar-Apr;36(2):135-8.
183. Garcia C., Compagnon B., Poëtte M. et al. Platelet Versus Megakaryocyte: Who Is the Real Bandleader of Thromboinflammation in Sepsis? *Cells.*-2022.-11(9):1507. doi: 10.3390/cells11091507.
184. Gavriatopoulou M., Ntanasis-Stathopoulos I., Korompoki E., Fotiou D., Migkou M., Tzanninis I.G., Psaltopoulou T., Kastritis E., Terpos E., Dimopoulos M.A. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clin. Exp. Med.* 2021. 21(2). P. 167-179. doi: 10.1007/s10238-020-00671-y.
185. Ghasemnejad-Berenji M., Pashapour S. Favipiravir and COVID-19: A Simplified Summary. *Drug Res. (Stuttg).*-2021.-71(3).-P.166-170. doi: 10.1055/a-1296-7935.
186. Gómez-Mesa J.E., Galindo-Coral S., Montes M.C., Muñoz Martin A.J. Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19. *Curr. Probl. Cardiol.*-2021. 46(3).-100742. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2020.100742.
187. Gong Y., Lin M., Piao L., Li X., Yang F., Zhang J., Bing Xiao B. et al. Aspirin enhances protective effect of fish oil against thrombosis and injury-induced vascular remodelling. *Br. J. Pharmacol.*-2015.-172(23).-P.5647–5660. doi: 10.1111/bph.12986
188. Gorog D.A., Yamamoto J. Global Thrombosis Test: Occlusion Is Attributable to Shear-Induced Platelet Thrombus Formation. *TH Open.*-2021.- 5(4): e591–e597. doi: 10.1055/s-0041-1741108
189. Górski A, Borysowski J, Międzybrodzki R. Sepsis, Phages, and COVID-19. *Pathogens.*-2020.-9(10):844. doi: 10.3390/pathogens9100844.
190. Griffin L.P. Requirements for safety testing of new medical products. *Arch. Toxicol.* 1981. 49(1). P. 99 -103.
191. Gröschel K., Uphaus T., Loftus I. et al. Revacept, an Inhibitor of Platelet Adhesion in Symptomatic Carotid Artery Stenosis: Design and Rationale of a Randomized Phase II Clinical Trial. *TH Open.*-2020.-4(4):e393-e399. doi: 10.1055/s-0040-1721078.
192. Grover S.P., Mackman N. How useful are ferric chloride models of arterial thrombosis? *Platelets.* 2020.-18;31(4):432-438. doi: 10.1080/09537104.2019.1678119.

193. Gu S.X., Tyagi T., Jain K., Gu V.W., Lee S.H., Hwa J.M., Kwan J.M., Krause D.S., Lee A.I., Halene S., Martin K.A., Chun H.J., Hwa J. Thrombocytopenia and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nat. Rev. Cardiol.*-2021.-18(3):194-209. doi: 10.1038/s41569-020-00469-1.
194. Guarneri L. A new model of pulmonary microembolism in the mouse// *J. PharmacolMethods*,-1988.-20.-P.161–167.
195. Guglielmi G., Viñuela F, Dion J, Duckwiler G.Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical inperience. *J. Neurosurg.*-1991.- 75(1).- P.8-14.
196. Gulati A., Tiwari A., Shetty V., Nwosu I., Khurana S. Tirofiban: A Rare Cause of Thrombocytopenia in a Patient Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Cureus*.-2021.-13(9):e18217. doi: 10.7759/cureus.18217.
197. Gulizia M.M., Colivicchi F., Abrignani M.G. et al. Consensus Document ANMCO/ANCE/ARCA/GICR-IACPR/GISE/SICOA: Long-term Antiplatelet Therapy in Patients with Coronary Artery Disease. *Eur. Heart. J. Suppl.*-2018.- 20.-P.1–74. doi: 10.1093/eurheartj/suy019
198. Guo Y., Tian X., Wang X., Xiao Z. Adverse Effects of Immunoglobulin Therapy. *Front. Immunol.*-2018.-9:1299. doi: 10.3389/fimmu.2018.01299.
199. Gupta A.K., Chopra B.S., Vaid B., Sagar A., Raut S., Badmalia M.D., Ashish, Khatri N. Protective effects of gelsolin in acute pulmonary thromboembolism and thrombosis in the carotid artery of mice. *PLoS One*.-2019.-14(4):e0215717. doi: 10.1371/journal.pone.0215717.
200. Gupta N. Protease Activated Receptors: A Pathway to Boosting Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Efficacy in Acute Respiratory Distress Syndrome? *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(3): 1277. doi: 10.3390/ijms23031277
201. Habas K., Nganwuchu C., Shahzad F., Gopalan R., Haque M., Rahman S., Majumder A.A., Nasim T. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2020. 18(12). P. 1201-1211. doi: 10.1080/14787210.2020.1797487.
202. Hanff T.C., Mohareb A.M., Giri J., Cohen J.B., Chirinos J.A.Thrombosis in COVID-19. *Am. J.Hematol.*-2020.-95(12):1578-1589. doi: 10.1002/ajh.25982.
203. Hally K.E., Parker O.M., Brunton-O'Sullivan M.M. et al. Linking Neutrophil Extracellular Traps and Platelet Activation: A Composite Biomarker Score for Predicting Outcomes after Acute Myocardial Infarction. *Thromb. Haemost.*-2021.-121(12):1637-1649. doi: 10.1055/s-0041-1728763.
204. Hashemzadeh M., Furukawa M., Goldsberry S., Movahed M.R. Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: A review. *Exp. Clin. Cardiol.*-2008.-13(4).-P.192–197.

205. Hilkens N.A., Algra A., L. Kappelle L.J., Bath P.M., Csiba L., Rothwell P.M., Greving J.P. Early time course of major bleeding on antiplatelet therapy after TIA or ischemic stroke. *Neurology*.-2018.-90(8).-P.683–689. doi: 10.1212/WNL.0000000000004997
206. Hoet B., Falcon C., De Reys S., Arnout J., Deckmyn H., Vermeylen J. R68070, a combined thromboxane/endoperoxide receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor, inhibits human platelet activation in vitro and in vivo: a comparison with aspirin. *Blood*.-1990.-75(3):646-53.
207. Holinstat M., Boutaud O., Apopa P., Vesci J., Bala M., Oates J.A., Hamm H.E. Protease-Activated Receptor Signaling in Platelets Activates Cytosolic Phospholipase A2 α Differently for Cyclooxygenase-1 and 12-Lipoxygenase Catalysis. *Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol*.-2011.- (2): 435–442. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.219527
208. Horev M.B., Zabary Y., Zarka R., Sorrentino S., Medalia O., Zaritsky A., Geiger B. Differential dynamics of early stages of platelet adhesion and spreading on collagen IV- and fibrinogen-coated surfaces. Version 2. *F1000Res*.-2020.-9-ISF-449. doi: 10.12688/f1000research.23598.2
209. Hosseini E., Beshkar P., Ghasemzadeh M. Reverse correlations of collagen-dependent platelet aggregation and adhesion with GPVI shedding during storage. *J. Thromb. Thrombolysis*.-2018.-46(4):534-540. doi: 10.1007/s11239-018-1739-6.
210. Hsia C.-H., Velusamy M., Sheu J.-R., Khamrang T., Jayakumar T., Lu W.-J., Lin K.-H., Chang C.-C. A novel ruthenium (II)-derived organometallic compound, TQ-6, potently inhibits platelet aggregation: Ex vivo and in vivo studies. *Sci. Rep*.-2017.-7.-9556. doi: 10.1038/s41598-017-09695-z
211. Hsieh H.L., Liang C.C., Lu C.Y., Yang J.T., Chung C.Y., Ko Y.S., Lee T.H. Induced pluripotent stem cells can improve thrombolytic effect of low-dose rt-PA after acute carotid thrombosis in rat. *Stem. Cell. Res. Ther*.-2021.-12(1):549. doi: 10.1186/s13287-021-02615-z.
212. Huang D., Yu H., Wang T., Yang H., Yao R., Liang Z. Efficacy and safety of umifenovir for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J. Med. Virol*. 2021. 93(1). P. 481-490. doi: 10.1002/jmv.26256.
213. Hurlen M., Hole T., Seljeflot I., Arnesen H. Aspirin does not influence the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on left ventricular ejection fraction 3 months after acute myocardial infarction. *Eur. J. Heart.Fail*.-2001.-3(2):203-7. doi: 10.1016/s1388-9842(00)00138-0.
214. Iba T., Levy J.H., Connors J.M., Warkentin T.E., Thachil J., Levi M. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit. Care*. 2020. 24(1). doi: 10.1186/s13054-020-03077-0.
215. Iba T., Levy J.H., Levi M., Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb.Haemost*. 2020. 18(9). P. 2103-2109. doi: 10.1111/jth.14975. Epub 2020 Jul 21. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., Patil S., Barkate H. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *Int. J. Infect. Dis*. 2021. 102. P. 501-508. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.069.

216. Irfan M., Kwon T.H., Lee D.H., Hong S.B., Oh J.W., Kim S.D., Rhee M.H. Antiplatelet and Antithrombotic Effects of *Epimediumkoreanum* Nakai. *Evid. Based. Complement Alternat. Med.*-2021.-2021:7071987. doi: 10.1155/2021/7071987.
217. Ito Y., Ohno K., Morikawa Y., Tomizawa A., Mizuno M., Sugidachi A. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is not a major mediator of platelet aggregation, thrombogenesis, haemostasis, and antiplatelet effect of prasugrel in rats. *Sci Rep.*-2018.-8.-9955. doi: 10.1038/s41598-018-28181-8
218. Jagroop I.A. Plant extracts inhibit ADP-induced platelet activation in humans: their potential therapeutic role as ADP antagonists. *Purinergic Signal.*-2014.-10(2):233-9. doi: 10.1007/s11302-013-9393-0.
219. Jeng C.-J., Hsieh Y.-T., Lin C.-L., Wang I.-J. Effect of anticoagulant/antiplatelet therapy on the development and progression of diabetic retinopathy. *BMC Ophthalmol.*-2022.-22: 127. doi: 10.1186/s12886-022-02323-z
220. Jin Q.-Q., Sun J.-H., Du Q.-X., Lu X.-J., Zhu X.-Y., Fan H.-L., Hölscher C., Wang Y.-Y. Integrating microRNA and messenger RNA expression profiles in a rat model of deep vein thrombosis. *Int. J. Mol. Med.*-2017.-40(4).-1019–1028. doi: 10.3892/ijmm.2017.3105
221. John Jayakumar J.A.K., Panicker M.M., Basu B. Serotonin 2A (5-HT_{2A}) receptor affects cell-matrix adhesion and the formation and maintenance of stress fibers in HEK293 cells. *Sci. Rep.*-2020.-10(1):21675. doi: 10.1038/s41598-020-78595-6.
222. Kaltenmeier C., Wang R., Popp B., Geller D., Tohme S., Yazdani H.O. Role of Immuno-Inflammatory Signals in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells.*-2022.-11(14):2222. doi: 10.3390/cells11142222.
223. Kamran H., Jneid H., Kayani W.T., Virani S.S., Levine G.N., Nambi V., Khalid U. Oral Antiplatelet Therapy After Acute Coronary Syndrome: A Review. *JAMA.*-2021.-325(15):1545-1555. doi: 10.1001/jama.2021.0716.
224. Kapoor S., Opneja A., Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb. Res.*-2018.-170:87-96. doi: 10.1016/j.thromres.2018.08.005.
225. Khodadi E. Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules. *Cardiovasc. Toxicol.*-2020.-20(1):1-10. doi: 10.1007/s12012-019-09555-4.
226. Kiesel B.F., Parise R.A., Guo J., Huryn D.M., Johnston P.A., Colombo R., Sen M., Grandis J.R., Beumer J.H., Eiseman J.L. Toxicity, Pharmacokinetics and Metabolism of a Novel Inhibitor of Il-6-induced STAT3 Activation. *Cancer Chemother. Pharmacol.*-2016.-78(6): 1225–1235. doi: 10.1007/s00280-016-3181-9
227. Kirwan D.E., Chong D.L.W., Friedland J.S. Platelet Activation and the Immune Response to Tuberculosis. *Front. Immunol.*-2021.-12:631696. doi: 10.3389/fimmu.2021.631696.

228. Kjeldsen E.W., Thomassen J.Q., Rasmussen K.L., Nordestgaard B.G., Tybjaerg-Hansen A., Frikke-Schmidt R. Impact of diet on ten-year absolute cardiovascular risk in a prospective cohort of 94 321 individuals: A tool for implementation of healthy diets. *Lancet. Reg. Health. Eur.*-2022.-19:100419. doi: 10.1016/j.lanepe.2022.100419.
229. Klomberg R.C.W., Vlug L.E., de Koning B.A.E., de Ridder L. Venous Thromboembolic Complications in Pediatric Gastrointestinal Diseases: Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Failure. *Front. Pediatr.*-2022.-10:885876. doi: 10.3389/fped.2022.885876.
230. Kollikowski A.M., Pham M., März A.G. et al. Platelet Activation and Chemokine Release Are Related to Local Neutrophil-Dominant Inflammation During Hyperacute Human Stroke. *Transl. Stroke Res.*-2022.-13(3):364-369. doi: 10.1007/s12975-021-00938-w.
231. Konieczka P., Barszcz M., Kowalczyk P., Szlis M., Jankowski J. The potential of acetylsalicylic acid and vitamin E in modulating inflammatory cascades in chickens under lipopolysaccharide-induced inflammation. *Vet. Res.*-2019.-50: 65. doi: 10.1186/s13567-019-0685-4
232. Konijnenberg L.S.F., Damman P., Duncker D.J., Kloner R.A., Nijveldt R., van Geuns R.-J.M., Berry C., Riksen N.P., Escaned J., van Royen N. Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*-2020.-116(4).-P. 787–805. doi: 10.1093/cvr/cvz301
233. Koupenova M., Clancy L., Corkrey H.A., Freedman J.E. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. *Circ. Res.*-2018.-122(2).-P.337–351. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310795
234. Koupenova M., Ravid K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. *Front. Pharmacol.*-2018.-P.9-37. doi: 10.3389/fphar.2018.00037
235. Krittanawong C., Virk H.U.H., Isath A. et al. Meta-Analysis of Brief Dual-Antiplatelet Therapy Duration After Percutaneous Coronary Intervention. *Am. J. Cardiol.*-2022.-174:182-184. doi: 10.1016/j.amjcard.2022.03.045.
236. Kung P.H., Hsieh P.W., Lin Y.T., Lee J.H., Chen I.H., Wu C.C. HPW-RX40 prevents human platelet activation by attenuating cell surface protein disulfide isomerases. *Redox. Biol.*-2017.-13:266-277. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.019.
237. Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb. Res.* -1990.-15.- P.269-280.
238. Kuszynski D.S., Christian B.D., Dorrance A.M., Lauver D.A. Clopidogrel treatment inhibits P2Y2-Mediated constriction in the rabbit middle cerebral artery. *Eur. J. Pharmacol.*-2021.-911:174545. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174545.
239. Kuter D.J. Novel therapies for immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.*-2022.-196(6):1311-1328. doi: 10.1111/bjh.17872.

240. Kuznetsova T.A., Andryukov B.G., Makarenkova I.D., Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Fedyanina L.N., Kryzhanovsky S.P., Shchelkanov M.Yu. The Potency of Seaweed Sulfated Polysaccharides for the Correction of Hemostasis Disorders in COVID-19. *Molecules*.-2021.-26(9).-2618. doi: 10.3390/molecules26092618
241. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. *Mol. Informatics*. – 2011. – Vol. 30. – Iss. 2–3: 241–250.
242. Legrand M., Oufella H.A., De Backer D. et al. The I-MICRO trial, Ilomedin for treatment of septic shock with persistent microperfusion defects: a double-blind, randomized controlled trial-study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*.-2020.-21(1):601. doi: 10.1186/s13063-020-04549-y.
243. 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.-7(7):CD012584. doi: 10.1002/14651858.CD012584.pub2.
244. Li B.X., Dai X., Xu X.R., Adili R. et al. In vitro assessment and phase I randomized clinical trial of anfibatide a snake venom derived anti-thrombotic agent targeting human platelet GPIIb/IIIa. *Sci. Rep.*-2021.-11(1):11663. doi: 10.1038/s41598-021-91165-8.
245. Li F., Wang S., Wang L., Liu F., Meng Z., Liu J. The Effects of Ticagrelor Combined with Tirofiban on Coagulation Function, Serum Myocardial Injury Markers, and Inflammatory Factor Levels in Patients with Acute Myocardial Infarction after Percutaneous Coronary Intervention. *Comput. Math. Methods. Med.*-2022.-2022:4217270. doi: 10.1155/2022/4217270.
246. Li T.T., Fan M.L., Hou S.X., Li X.Y. et al. A novel snake venom-derived GPIIb/IIIa antagonist, anfibatide, protects mice from acute experimental ischaemic stroke and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.*-2015.-172(15):3904-16. doi: 10.1111/bph.13178.
247. Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2010.-30(12):2341-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207522
248. Li W., Nieman M., Sen Gupta A. Ferric Chloride-induced Murine Thrombosis Models. *J. Vis. Exp.*-2016.-5;(115):54479. doi: 10.3791/54479.
249. Lockyer S., Okuyama K., Begum S. et al. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb. Res.*-2006.-118(3):371-80. doi: 10.1016/j.thromres.2005.08.001.
250. Lopes R.D., Hong H., Harskamp R.E. et al. Optimal Antithrombotic Regimens for Patients With Atrial Fibrillation Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: An Updated Network Meta-analysis. *JAMA Cardiol.*-2020.-5(5): 1–8. doi: 10.1001/jamacardio.2019.6175

251. Lopez L.R., Guyer K.E., Torre I.G., Pitts K.R., Matsuura E., Ames P.R. Platelet thromboxane (11-dehydro-Thromboxane B₂) and aspirin response in patients with diabetes and coronary artery disease. *World J. Diabetes.*-2014.-5(2):115-27. doi: 10.4239/wjd.v5.i2.115.
252. Lu J., Zhang C., Shi S., Li S., Liu J., Wu J., Huang C., Lei M. Stoichiometry and architecture of the platelet membrane complex glycoprotein Ib-IX-V. *Biol. Chem.*-2023.-22. doi: 10.1515/hsz-2022-0227.
253. Ma N., Liu X.-W., Yang Y.-J., Li J.-Y., Mohamed I., Liu G.-R., Zhang J.-Y. Preventive Effect of Aspirin Eugenol Ester on Thrombosis in κ -Carrageenan-Induced Rat Tail Thrombosis Model. *PLoS. One.*-2015.-10(7).-e0133125. doi: 10.1371/journal.pone.0133125
254. Mackman N., Bergmeier W., Stouffer G.A., Weitz J.I. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nat. Rev. Drug Discov.*-2020.-19(5):333-352. doi: 10.1038/s41573-020-0061-0.
255. Maione F., Cicala C., Liverani E., Mascolo N., Perretti M., D'Acquisto F. IL-17A increases ADP-induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*-2011.-408(4).-P.658–662. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.080.
256. Majithia A., Bhatt D.L. Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2019.-39(4).-P.546–557. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310955
257. Man A.W.C., Li H., Xia N. Impact of Lifestyles (Diet and Exercise) on Vascular Health: Oxidative Stress and Endothelial Function. *Oxid. Med. Cell. Longev.*-2020.-1496462. doi: 10.1155/2020/1496462
258. Mandel J., Casari M., Stepanyan M., Martyanov A., Deppermann C. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(7):3868. doi: 10.3390/ijms23073868.
259. Manne B.K., Denorme F., Middleton E.A., Portier I. et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood.*-2020.-136(11):1317-1329. doi: 10.1182/blood.2020007214.
260. Manne B.K., Münzer P., Badolia R., Walker-Allgaier B., Campbell R.A., Middleton E., Weyrich A.S., Kunapuli S.P., Borst O., Rondina M.T. PDK1 governs thromboxane generation and thrombosis in platelets by regulating activation of Raf1 in the MAPK pathway. *J. Thromb. Haemost.*-2018.-16(6).-1211–1225. doi: 10.1111/jth.14005
261. Marcaccio C.L., Patel P.B., Liang P. et al. Efficacy and safety of perioperative dual antiplatelet therapy with ticagrelor versus clopidogrel in carotid artery stenting. *J. Vasc. Surg.*-2022.-75(4):1293-1303.e8. doi: 10.1016/j.jvs.2021.09.045.
262. Marcinczyk N., Gołaszewska A., Gromotowicz-Poplawska A., Misztal T., Strawa J., Tomczyk M., Kasacka I., Chabielska E. Multidirectional Effects of Tormentil Extract on Hemostasis in Experimental Diabetes. *Front. Pharmacol.*-2021.-12:682987. doi: 10.3389/fphar.2021.682987.

263. Marcinkowska M., Kubacka M., Zagorska A., Jaromin A., Fajkis-Zajaczkowska N., Kolaczowski M. Exploring the antiplatelet activity of serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonists bearing 6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)propyl) motif- as potential therapeutic agents in the prevention of cardiovascular diseases. *Biomed. Pharmacother.*-2022.-145:112424. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112424.
264. Mariscal A., Zamora C., Díaz-Torné C. et al. Increase of Circulating Monocyte-Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage. *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(10):5748. doi: 10.3390/ijms23105748.
265. Marjoram R.J., Li Z., He L., Tollefsen D.M., Kunicki T.J., Dickeson S.K., Santoro S.A., Zutter M.M. α 2 β 1 Integrin, GPVI Receptor, and Common FcR γ Chain on Mouse Platelets Mediate Distinct Responses to Collagen in Models of Thrombosis. *PLoS. One.*-2014.-9(11).-e114035. doi: 10.1371/journal.pone.0114035
266. Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood.*-2014.-123(18):2768-76. doi: 10.1182/blood-2013-10-463646.
267. Matsumaru Y., Kitazono T., Kadota K. et al. Relationship between platelet aggregation and stroke risk after percutaneous coronary intervention: a PENDULUM analysis. *Heart. Vessels.*-2022.-37(6):942-953. doi: 10.1007/s00380-021-02003-w.
268. Matsushita K., Marchandot B., Kibler M. et al. P2Y₁₂ inhibition by clopidogrel increases adverse clinical events after transcatheter aortic valve replacement. *Int. J. Cardiol.*-2022.-360:53-61. doi: 10.1016/j.ijcard.2022.04.088.
269. Maxwell S., Waring W.S. Drugs used in secondary prevention after myocardial infarction: Case presentation. *Br. J. Clin. Pharmacol.*-2000.-50(5).-P.405–417. doi: 10.1046/j.1365-2125.2000.00287.x
270. Mayer C.L., Koeck K., Hottmann M., Redfern A. et al. A phase 1 study in healthy participants to characterize the safety and pharmacology of inclacumab, a fully human anti-P-selectin antibody, in development for treatment of sickle cell disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*-2023.-79(9):1219-1228. doi: 10.1007/s00228-023-03514-3.
271. Mayer K., Hein-Rothweiler R., Schüpke S. et al. Efficacy and Safety of Revacept, a Novel Lesion-Directed Competitive Antagonist to Platelet Glycoprotein VI, in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention for Stable Ischemic Heart Disease: The Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled ISAR-PLASTER Phase 2 Trial.-*JAMA Cardiol.*-2021.-6(7):753-761. doi: 10.1001/jamacardio.2021.0475.
272. McEvoy L., Carr D.F., Pirmohamed M. Pharmacogenomics of NSAID-Induced Upper Gastrointestinal Toxicity. *Front. Pharmacol.*-2021.-12: 684162. doi: 10.3389/fphar.2021.684162

273. McFadyen J.D., Stevens H., Peter K. The Emerging Threat of (Micro)Thrombosis in COVID-19 and Its Therapeutic Implications. *Circ. Res.*-2020.-127(4):571-587. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317447.
274. Mehic D., Machacek J., Schramm T. et al. Platelet function and soluble P-selectin in patients with primary immune thrombocytopenia. *Thromb. Res.*-2023.-223:102-110. doi: 10.1016/j.thromres.2023.01.012.
275. Mendelson S.J., Prabhakaran S. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack and Acute Ischemic Stroke: A Review. *JAMA.*-2021.-325(11):1088-1098. doi: 10.1001/jama.2020.26867.
276. Meng S., Guo L., Ye Z., Wang J., Ding H., Wu S., Huang R. Comparison of Clinical Outcomes Between Ticagrelor and Clopidogrel in Elderly Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: A Cohort Study. *Clin. Interv. Aging.*-2022.-17:331-341. doi: 10.2147/CIA.S355210.
277. Mirfazli S.S., Kobarfard F., Firoozpour L. et al. N-substituted indole carbohydrazide derivatives: synthesis and evaluation of their antiplatelet aggregation activity. *Daru.*-2014.-22(1):65. doi: 10.1186/s40199-014-0065-6.
278. Mishra S.K., Tripathi T. One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? *Acta Trop.* 2021. 214. P. 105778. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105778.
279. Mitrugno A., Rigg R.A., Laschober N.B., Ngo A.T.P. et al. Potentiation of TRAP-6-induced platelet dense granule release by blockade of P2Y12 signaling with MRS2395. *Platelets.* 2018.-29(4).-P.383–394. doi: 10.1080/09537104.2017.1316482
280. Mohammed B.M., Monroe D.M., Gailani D. Mouse Models of Hemostasis. *Platelets.*-2020.-31(4).-417–422. doi: 10.1080/09537104.2020.1719056
281. Moreno-Torres V., Castejón R., Mellor-Pita S. et al. Usefulness of the hemogram as a measure of clinical and serological activity in systemic lupus erythematosus. *J. Transl. Autoimmun.*-2022.-5:100157. doi: 10.1016/j.jtauto.2022.100157.
282. Nadeali Z., Mohammad-Rezaei F., Aria H., Nikpour P. Possible role of pannexin 1 channels and purinergic receptors in the pathogenesis and mechanism of action of SARS-CoV-2 and therapeutic potential of targeting them in COVID-19. *Life Sci.*-2022.-15: 120482. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120482
283. Natsuaki M., Sonoda S., Yoshioka G., Hongo H. et al. Antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention: current status and future perspectives. *Cardiovasc. Interv. Ther.*-2022.-37(2):255-263. doi: 10.1007/s12928-022-00847-1.
284. Nicolson P.L., Nock S.H., Hinds J., Garcia-Quintanilla L., Smith C.W., Campos J., Brill A., Pike J.A., Khan A.O., Poulter N.S., et al. Low-dose Btk inhibitors selectively block platelet activation by CLEC-2. *Haematologica.*-2021.-106:208–219. doi: 10.3324/haematol.2019.218545.

285. Niklaus M., Klingler P., Weber K., Koessler A., Kuhn S., Boeck M., Kobsar A., Koessler J. Platelet Toll-Like-Receptor-2 and -4 Mediate Different Immune-Related Responses to Bacterial Ligands. *TH Open.*-2022.-6(3):e156-e167. doi: 10.1055/a-1827-7365.
286. Nuyttens B.P., Thijs T., Deckmyn H., Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb. Res.*-2011.-2:26-9. doi: 10.1016/S0049-3848(10)70151-1.
287. Obi A.T., Barnes G.D., Napolitano L.M., Henke P.K., Wakefield T.W. Venous thrombosis epidemiology, pathophysiology, and anticoagulant therapies and trials in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J. Vasc. Surg. Venous.Lymphat.Disord.*-2021.-9(1):23-35. doi: 10.1016/j.jvsv.2020.08.030.
288. Octave M., Piroton L., Ginion A., Robaux V., Leprore S., Ambroise J., Bouzin C., Guigas B., Giera M., Foretz M., Bertrand L., Beauloye C., Horman S.. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor CP640.186 Increases Tubulin Acetylation and Impairs Thrombin-Induced Platelet Aggregation. *Int. J. Mol. Sci.*-2021.-22(23).-13129. doi: 10.3390/ijms222313129
289. Olivier C.B., Meyer M., Bauer H., Schnabel K., Weik P., Zhou Q., Bode C., Moser M., Diehl P. The Ratio of ADP- to TRAP-Induced Platelet Aggregation Quantifies P2Y12-Dependent Platelet Inhibition Independently of the Platelet Count. *PLoS. One.*-2016.-11(2).-e0149053. doi: 10.1371/journal.pone.0149053
290. Palma C., David C., Fernandes R.M. et al. The sham effect of invasive interventions in chronic coronary syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc. Disord.*-2022; 22: 223. doi: 10.1186/s12872-022-02658-x
291. Palomo I. The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis (Review) /Palomo I., Toro C., Alarcón M. //Mol. Med. Rep.- 2008.-1.-P.179–184.
292. Pan N., Li Z.-C., Li Z.-H. et al. Antiplatelet and Antithrombotic Effects of Isaridin E Isolated from the Marine-Derived Fungus via Downregulating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Mar. Drugs.*-2022.-20(1):23. doi: 10.3390/md20010023
293. Park M.K., Rhee Y.H., Lee H.J. et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of indole-3-carbinol in vitro and in vivo. *Phytother. Res.*-2008.-22:58–64. doi: 10.1002/ptr.2260.
294. Passacquale G., Ferro A. Current concepts of platelet activation: possibilities for therapeutic modulation of heterotypic vs. homotypic aggregation. *Br. J. Clin. Pharmacol.*-2011.-72(4):604-18. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03906.x.
295. Passacquale G., Sharma P., Perera D., Ferro A. Antiplatelet therapy in cardiovascular disease: Current status and future directions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*-2022.-88(6):2686-2699. doi: 10.1111/bcp.15221.

296. Piechota-Polańczyk A., Gorąca A. Influence of specific endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and antioxidant status of plasma in LPS-induced endotoxemia. *Pharmacol. Rep.*-2012.-64(6):1434-41. doi: 10.1016/s1734-1140(12)70941-6.
297. Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58. – Iss. 9: 4066-4072.
298. Pittman D.D., Rakhe S., Bowley S.R., Jasuja R., Barakat A., Murphy J.E. Hemostatic efficacy of marstacimab alone or in combination with bypassing agents in hemophilia plasmas and a mouse bleeding model. *Res. Pract. Thromb. Haemost.*-2022.-6(2): e12679. doi: 10.1002/rth2.12679
299. Pollard T.J. The acute myocardial infarction. *Prim. Care.*-2000.-27(3):631-49;vi. doi: 10.1016/s0095-4543(05)70167-6.
300. Przyborowski K., Kurpinska A., Wojkowska D., Kaczara P. et al. Protein disulfide isomerase-A1 regulates intraplatelet reactive oxygen species-thromboxane A2 -dependent pathway in human platelets. *J. Thromb. Haemost.*-2022.-20(1):157-169. doi: 10.1111/jth.15539.
301. QikProp 3.5: User Manual // Schrodinger Press. – New York (USA): Schrodinger Press, 2012. – 42 p.
302. Qu S.W., Cong Y.X., Wang P.F., Fei C., Li Z., Yang K., Shang K., Ke C., Huang H., Zhuang Y., Zhang B.F., Zhang K. Deep Vein Thrombosis in the Uninjured Lower Extremity: A Retrospective Study of 1454 Patients With Lower Extremity Fractures. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*-2021.-27:1076029620986862. doi: 10.1177/1076029620986862.
303. Quillard T., Franck G., Mawson T., Folco E., Libby P. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.*-2017.-28(5):434-441. doi: 10.1097/MOL.0000000000000440.
304. Qureshi S., Ali G., Idrees M., Muhammad T., Il-Keun Kong I.-K., Abbas M., Ali Shah M. I., Ahmad S., Sewell R.D.E., Ullah S. Selected Thiadiazine-Thione Derivatives Attenuate Neuroinflammation in Chronic Constriction Injury Induced Neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.*-2021.-14:728128. doi: 10.3389/fnmol.2021.728128
305. Radchenko E.V., Karpov P.V., Sosnin S.B., Dyabina A.S., Sosnina E.A., Palyulin V.A., Zefirov N.S. System for prediction of pharmacokinetic properties and toxicity of drug compounds. XX Mendeleev Congress on general and applied chemistry. – 2016. – V. 4: 424.
306. Raevsky O.A., Solodova S.L., Lagunin A.A., Poroikov V.V. Computer modeling of blood brain barrier permeability for physiologically active compounds. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* – 2013. – Vol. 7. – Iss. 2: 95-107.
307. Rahman K., Ali G., Khan R., Khan I., Ali I., Mosa O.F., Ahmed A., Ayaz M., Nawaz A., Murthy H.C.A. Analgesic and Anti-Inflammatory Potentials of a Less Ulcerogenic Thiadiazinethione Derivative in Animal Models: Biochemical and Histochemical Correlates. *Drug Des. Devel. Ther.*-2022.-16:1143–1157. doi: 10.2147/DDDT.S354779

308. Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J., Nishigaki Y., Sakthisekaran D., Sethi G., Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.*-2013.-9(10):1057-69. doi: 10.7150/ijbs.7502.
309. Ramirez J.E.M., Alarabi A.B., Khasawneh F.T., Alshbool F.Z. A Novel Antibody Targeting the Second Extracellular Loop of the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Inhibits Platelet Function. *Int. J. Mol. Sci.*-2022.-23(15):8794. doi: 10.3390/ijms23158794.
310. Rangarajan S., Rezonzew G., Chumley P., Fatima H., Golovko M. Y., Feng W., Hua P., Jaimes E.A. COX-2-derived prostaglandins as mediators of the deleterious effects of nicotine in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*-2020.-318(2).-475–485. doi: 10.1152/ajprenal.00407.2019
311. Saeed A., Herlitz H., Nowakowska-Fortuna E., Nilsson U., Alhadad A., Jensen G., Mattiasson I., Lindblad B., Gottsäter A., Guron G. Oxidative stress and endothelin-1 in atherosclerotic renal artery stenosis and effects of renal angioplasty. *Kidney Blood Press. Res.*-2011.-34(6):396-403. doi: 10.1159/000328732
312. Saito M.S., Zatta K.C., Sathler P.C. et al. Therapeutic implementation in arterial thrombosis with pulmonary administration of fucoidan microparticles containing acetylsalicylic acid. *Int. J. Pharm.*-2022.-622:121841. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121841.
313. Saito Y., Kobayashi Y. Update on Antithrombotic Therapy after Percutaneous Coronary Intervention. *Intern. Med.*-2020.-59(3):311-321. doi: 10.2169/internalmedicine.3685-19.
314. Saleh M., Ambrose J.A. Understanding myocardial infarction. *F1000Res.*-2018.-7:F1000 Faculty Rev-1378. doi: 10.12688/f1000research.15096.1.
315. Sanchez A.C., Mogadam E., Aiello D. The Conundrum of Anticoagulation and Antiplatelet Therapy in Spontaneous Coronary Artery Dissection. *J. Investig. Med. High. Impact. Case. Rep.*-2022.-10: 23247096221097541. doi: 10.1177/23247096221097541
316. Santana-Mateos M., Medina-Gil J.M., Saavedra-Santana P., Martínez-Quintana E., Rodríguez-González F., Tugores A. Clinical and Pharmacological Parameters Determine Relapse During Clopidogrel Treatment of Acute Coronary Syndrome. *J. Clin. Pharmacol.*-2022.-62(6):783-791. doi: 10.1002/jcph.2016.
317. Sarapultsev A., Vassiliev P., Grinchii D., Kiss A., Mach M., Osacka J., Balloova A., Paliokha R., Kochetkov A., Sidorova L., Sarapultsev P., Chupakhin O., Rantsev M., Spasov A., Dremencov E.. Combined In Silico, Ex Vivo, and In Vivo Assessment of L-17, a Thiadiazine Derivative with Putative Neuro- and Cardioprotective and Antidepressant Effects. *Int. J. Mol. Sci.*-2021.-22(24): 13626. doi: 10.3390/ijms222413626
318. Savage P., Cox B., Linden K., Coburn J., Shahmohammadi M., Menown I. Advances in Clinical Cardiology 2021: A Summary of Key Clinical Trials. *Adv. Ther.*-2022.-39(6):2398-2437. doi: 10.1007/s12325-022-02136-y.

319. Savastano M.C., Santoro L., Crincoli E. et al. Radial Peripapillary Capillary Plexus Perfusion and Endothelial Dysfunction in Early Post-SARS-CoV-2 Infection. *Vision (Basel)*.-2022.-6(2):26. doi: 10.3390/vision6020026.
320. Scanlon V.M., Teixeira A.M., Tyagi T., Zou S., Zhang P.-X., Booth C.J., Kowalska M.A., Bao J., Hwa J., Hayes V., Marks M.S., Poncz M., Krause D.S. Epithelial (E)-Cadherin is a Novel Mediator of Platelet Aggregation and Clot Stability. *Thromb. Haemost.*-2019.-119(5).-744–757. doi: 10.1055/s-0039-1679908
321. Scarborough R.M., Laibelman A.M., Clizbe L.A., Fretto L.J., Conley P.B., Reynolds E., Sedlock M., Jantzen H-M. Novel tricyclic benzothiazolo[2,3-c]thiadiazine antagonists of the platelet ADP receptor (P2Y₁₂). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*-2001.-11:1805–1808.
322. Schattner M. Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response. *J. Leukoc. Biol.*-2019.-105(5):873-880. doi: 10.1002/JLB.MR0618-213R.
323. Schnorbus B., Daiber A., Jurk K. et al. Effects of clopidogrel, prasugrel and ticagrelor on endothelial function, inflammatory and oxidative stress parameters and platelet function in patients undergoing coronary artery stenting for an acute coronary syndrome. A randomised, prospective, controlled study. *BMJ Open*.-2014; 4(5): e005268. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005268
324. Seibert K., Zhang Y., Leahy K. et al. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 400A: 167-170.
325. Shahab S., Sheikhi M. Triazavirin - Potential inhibitor for 2019-nCoV Coronavirus M protease: A DFT study. *Curr. Mol. Med.* 2020. 20. doi: 10.2174/1566524020666200521075848.
326. Sharma R., Kumar P., Prashanth S.P., Belagali Y. Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease. *Cardiol. Ther.*-2020.-9(2):349-361. doi: 10.1007/s40119-020-00197-0.
327. Sharma S., Tyagi T., Antoniak S. Platelet in thrombo-inflammation: Unraveling new therapeutic targets. *Front. Immunol.*-2022.-13:1039843. doi: 10.3389/fimmu.2022.1039843.
328. Shevchuk O., Begonja A.J., Gambaryan S., Totzeck M. et al. Proteomics: A Tool to Study Platelet Function. *Int. J. Mol. Sci.*-2021.-22(9).-P. 4776. doi: 10.3390/ijms22094776
329. Silva-Luis C.C., de Brito Alves J.L., de Oliveira J.C.P.L. et al. Effects of Baru Almond Oil (*Dipteryx alata* Vog.) Treatment on Thrombotic Processes, Platelet Aggregation, and Vascular Function in Aorta Arteries. *Nutrients*.-2022.-14(10):2098. doi: 10.3390/nu14102098.
330. Slikkerveer J., Juffermans L.J., van Royen N., Appelman Y., Porter T.R., Kamp O. Therapeutic application of contrast ultrasound in ST elevation myocardial infarction: Role in coronary thrombosis and microvascular obstruction. *Eur. Heart. J. Acute. Cardiovasc. Care*.-2019.-8(1):45-53. doi: 10.1177/2048872617728559.

331. Smits P.C., Frigoli E., Vranckx P. et al. Abbreviated Antiplatelet Therapy After Coronary Stenting in Patients With Myocardial Infarction at High Bleeding Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.*-2022.-80(13):1220-1237. doi: 10.1016/j.jacc.2022.07.016.
332. Song L., Zhao X., Chen R. et al. Association of PCSK9 with inflammation and platelet activation markers and recurrent cardiovascular risks in STEMI patients undergoing primary PCI with or without diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.*-2022.-21(1):80. doi: 10.1186/s12933-022-01519-3.
333. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Sirotenko V.S., Gaidukova K.A., Morkovnik A.S., Anisimova V.A., Divaeva L.N., Kuz'menko T.A. Antithrombotic activity of dab-15, a novel diazepinobenzimidazole compound. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.*-2017.-162(5).-636-639. doi: 10.1007/s10517-017-3675-4
334. Spronk H.M.H., Padro T., Siland J.E. et al. Atherothrombosis and Thromboembolism: Position Paper from the Second Maastricht Consensus Conference on Thrombosis. *Thromb. Haemost.*-2018.-118(2):229-250. doi: 10.1160/TH17-07-0492.
335. Sriram K., Insel P.A. Inflammation and thrombosis in COVID-19 pathophysiology: proteinase-activated and purinergic receptors as drivers and candidate therapeutic targets. *Physiol. Rev.*-2021.-101(2):545-567. doi: 10.1152/physrev.00035.2020.
336. Streiff M.B., Agnelli G., Connors J.M., Crowther M., Eichinger S., Lopes R., McBane R.D., Moll S., Ansell J. Guidance for the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *J. Thromb. Thrombolysis.*-2016.-41(1):32-67. doi: 10.1007/s11239-015-1317-0.
337. Suades R., Padró T., Vilahur G., Badimon L. Platelet-released extracellular vesicles: the effects of thrombin activation. *Cell. Mol. Life Sci.*-2022.-79(3):190. doi: 10.1007/s00018-022-04222-4
338. Sun X.D., Han L., Lan H.T., Qin R.R., Song M. et al. Endothelial microparticle-associated protein disulfide isomerase increases platelet activation in diabetic coronary heart disease. *Aging (Albany NY).*-2021.-13(14):18718-18739. doi: 10.18632/aging.203316
339. Sun Y., Langer H.F. Platelets, Thromboinflammation and Neurovascular Disease. *Front. Immunol.*-2022.-13: 843404. doi: 10.3389/fimmu.2022.843404
340. Szczuko M., Koziół I., Kotłęga D., Brodowski J., Drozd A. The Role of Thromboxane in the Course and Treatment of Ischemic Stroke: Review. *Int. J. Mol. Sci.*-2021.-22(21):11644. doi: 10.3390/ijms222111644.
341. Tataru A.M., Gandhi R.G., Mooney D.J., Nelson S.B. Antiplatelet therapy for *Staphylococcus aureus* bacteremia: Will it stick? *PLoS Pathog.*-2022.-18(2):e1010240. doi: 10.1371/journal.ppat.1010240.
342. Tautz L., Senis Y.A., Oury C., Rahmouni S. Perspective: Tyrosine phosphatases as novel targets for antiplatelet therapy. *Bioorg. Med. Chem.*-2015.-23(12):2786-97. doi: 10.1016/j.bmc.2015.03.075.

343. Thiele H., Jobs A. ESC guidelines 2020: acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation : What is new? *Herz.*-2021.-46(1):3-13. doi: 10.1007/s00059-020-05002-1.
344. Timp J.F., Braekkan S.K., Lijfering W.M. et al. Prediction of recurrent venous thrombosis in all patients with a first venous thrombotic event: The Leiden Thrombosis Recurrence Risk Prediction model (L-TRRiP). *PLoS. Med.*-2019.-16(10).-e1002883. doi: 10.1371/journal.pmed.1002883
345. 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):1-12. doi: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.
346. Tosetto A., Rocca B., Petrucci G. et al. Association of Platelet Thromboxane Inhibition by Low-Dose Aspirin With Platelet Count and Cytoreductive Therapy in Essential Thrombocythemia. *Clin. Pharmacol. Ther.*-2022.-111(4):939-949. doi: 10.1002/cpt.2485.
347. Udut V.V., Udut E.V., Kotlovskaya L.Y., Kingma H., Demkin V.P. Disturbances of hemostasis with vestibulo-atactic complications of chronic cerebral ischemia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.*-2020.-46(8).-C. 1002-1005. doi: 10.1055/s-0040-1709133.
348. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
349. Valenti R., Muraca I., Marcucci R. et al. "Tailored" antiplatelet bridging therapy with cangrelor: moving toward personalized medicine. *Platelets.*-2022.-33(5):687-691. doi: 10.1080/09537104.2021.
350. Vasil'eva T.M., Makarov V.A., Chupakhin O.N., Sidorova L.P., Perov N.M., Rusinov V.L. Antiagregant properties of new 1,3,4-thiadiazine derivatives. *Eksp. Klin. Farmakol.*-2009.-72(5):27-30.
351. van de Graaf R.A., Zinkstok S.M., Chalos V. et al. Prior antiplatelet therapy in patients undergoing endovascular treatment for acute ischemic stroke: Results from the MR CLEAN Registry. *Int. J. Stroke.*-2021.-16(4).-P.476–485. doi: 10.1177/1747493020946975
352. van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.*-2019.-16(3):166-179. doi: 10.1038/s41569-018-0110-0.
353. van der Plas A., Pouly S., de La Bourdonnaye G., Ng W.T., Baker G., Lüdicke F. Influence of smoking and smoking cessation on levels of urinary 11-dehydro thromboxane B(2). *Toxicol. Rep.*-2018.-5:561-567. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.04.005.
354. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F., Gurova N.A., Anisimova V.A. Consensus Drug Design Using IT Microcosm. Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics. Ed. J. Leszczynski. – 2014.-17. – P. 369-431.
355. Vestrick R.J., Winn M.E., Eitzman D.T. Murine Models of Vascular Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*-27.-2007.-P.2079-2093.

356. Villanueva J., Salazar J., Alarcón A., Araya I., Yanine N., Domancic S., Carrasco-Labra A. Antiplatelet therapy in patients undergoing oral surgery: A systematic review and meta-analysis. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.*-2019.-24(1): e103–e113. doi: 10.4317/medoral.22708
357. Voutilainen A., Brester C., Kolehmainen M., Tuomainen T.P. Epidemiological analysis of coronary heart disease and its main risk factors: are their associations multiplicative, additive, or interactive? *Ann. Med.*-2022.-54(1):1500-1510. doi: 10.1080/07853890.2022.2078875.
358. Walford T., Musa F.I., Harper A.G.S. Nicergoline inhibits human platelet Ca²⁺ signalling through triggering a microtubule-dependent reorganization of the platelet ultrastructure. *Br. J. Pharmacol.*-2016.-173(1).-P.234–247. doi: 10.1111/bph.13361
359. Wang J., Zou D. Tirofiban-induced thrombocytopenia. *Ann. Med.*-2023.-55(1):2233425. doi: 10.1080/07853890.2023.2233425.
360. Wang L., Wang X., Lv X., Jin Q., Shang H., Wang C.C., Wang L. The extracellular Ero1 α /PDI electron transport system regulates platelet function by increasing glutathione reduction potential. *Redox. Biol.*-2022.-50:102244. doi: 10.1016/j.redox.2022.102244.
361. Wei H., Li H., Wan S.-P., Zeng Q.-T., Cheng L.-X., Jiang L.-L., Peng Y.-D. Cardioprotective Effects of Malvidin Against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats: A Mechanistic Study. *Med. Sci. Monit.*-2017.-23.-2007–2016. doi: 10.12659/MSM.902196
362. Wei Y., Deng X., Sheng G., Guo X.B. A rabbit model of cerebral venous sinus thrombosis established by ferric chloride and thrombin injection. *Neurosci. Lett.*-2018.-1;662:205-212. doi: 10.1016/j.neulet.2017.10.041.
363. Wersäll A., Williams C.M., Brown E., Iannitti T. et al. Mouse Platelet Ral GTPases Control P-Selectin Surface Expression, Regulating Platelet-Leukocyte Interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2018.-38(4):787-800. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310294.
364. Wikkelso A., Wetterslev J., Møller A.M., Afshari A., Emergency C. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. *Cochrane Database Syst. Rev.*-2016.-8.-CD007871. doi: 10.1002/14651858.CD007871.pub3
365. Wu J., Heemskerk J.W.M., Baaten C.C.M.J. Platelet Membrane Receptor Proteolysis: Implications for Platelet Function. *Front. Cardiovasc. Med.*-2020.-7.- 608391. doi: 10.3389/fcvm.2020.608391
366. Wu X., Yu K., Wang Y., Xu W., Ma H., Hou Y., Li Y., Cai B., Zhu L., Zhang M., Hu X., Gao J., Wang Y., Qin H., Zhao M., Zhang Y., Li K., Du Z., Yang B. The Efficacy and Safety of Triazavirin for COVID-19: A Trial Protocol. *Engineering (Beijing)*. 2020. 6(10). P. 1199-1204. doi: 10.1016/j.eng.2020.06.011.

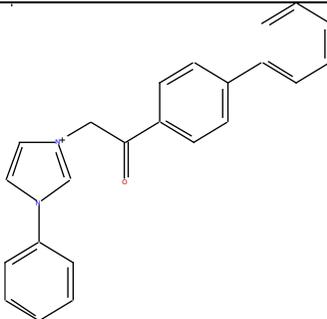
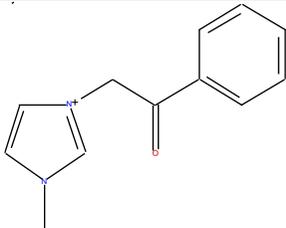
367. Wyseure T., Cooke E.J., Declerck P.J., Behrendt N., Meijers J.C.M., von Drygalski A., Mosnier L.O. Defective TAFI activation in hemophilia A mice is a major contributor to joint bleeding. *Blood*.-2018.-132(15).-1593–1603. doi: 10.1182/blood-2018-01-828434.
368. Xiong G., Wu Z., Yi J., Fu L., Yang Z., Hsieh C., Yin M., Zeng X., Wu C., Chen X., Hou T., Cao D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Iss. 49. – P. W5-W14.
369. Xiong Y., Bath P.M. Antiplatelet Therapy for Transient Ischemic Attack and Minor Stroke. *Stroke*.-2020.-51(11):3472-3474. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.031763.
370. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., Taylor F.B., Esmon N., Lupu F., Esmon C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.*-2009.-15(11): 1318–1321. doi: 10.1038/nm.2053
371. Xu W.H., Mo L.C., Shi M.H., Rao H., Zhan X.Y., Yang M. Correlation between thrombopoietin and inflammatory factors, platelet indices, and thrombosis in patients with sepsis: A retrospective study. *World J. Clin. Cases*.-2022.-10(13):4072-4083. doi: 10.12998/wjcc.v10.i13.4072.
372. Yao X., Chen W., Liu J. et al. Deep Vein Thrombosis is Modulated by Inflammation Regulated via Sirtuin 1/NF- κ B Signalling Pathway in a Rat Model. *Thromb. Haemost.*-2019.-119(3):421-430. doi: 10.1055/s-0038-1676987.
373. Yaseen I.F., Farhan H.A., Abbas H.M. Clopidogrel non-responsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention using the VerifyNow test: frequency and predictors. *Eur. J. Hosp. Pharm.*-2019.-26(2):113-116. doi: 10.1136/ejhpharm-2017-001359.
374. Yun S.H., Sim E.H., Goh R.Y., Park J.I., Han J.Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed. Res. Int.*-2016:9060143. doi: 10.1155/2016/9060143.
375. Zakrzeska A., Gromotowicz-Popławska A., Szemraj J., Szoka P., Kisiel W., Purta T., Kasacka I., Chabielska E. Eplerenone reduces arterial thrombosis in diabetic rats. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*-2015.-16(4):1085-94. doi: 10.1177/1470320313515037.
376. Zhang H., Pan D., Wu X. et al. Platelet Protease Activated Receptor 1 Is Involved in the Hemostatic Effect of 20(S)-Protopanaxadiol by Regulating Calcium Signaling. *Front.Pharmacol.*-2020.-11.-549150. doi: 10.3389/fphar.2020.549150
377. Zhang L., Lv Y., Dong J., Wang N., Zhan Z., Zhao Y., Jiang S. Assessment of Risk Factors for Drug Resistance of Dual Anti Platelet Therapy After PCI. *Clin. Appl.Thromb. Hemost.*-2022.-28: 10760296221083674. doi: 10.1177/10760296221083674
378. Zhang S., Chourase M., Sharma N., Saunik S., Duggal M., Danaei G., Duggal B. The effects of dual antiplatelet therapy (DAPT) adherence on survival in patients undergoing revascularization and the determinants of DAPT adherence. *BMC Cardiovasc. Disord.*-2022.-22(1):238. doi: 10.1186/s12872-022-02677-8.

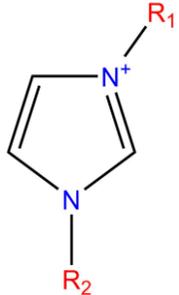
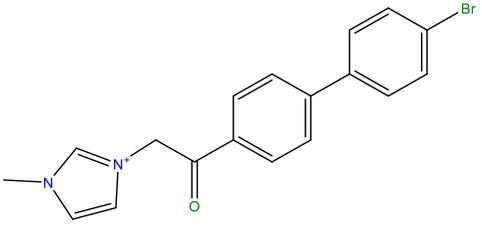
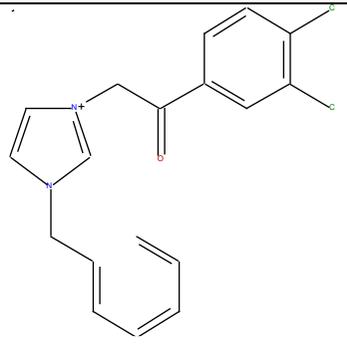
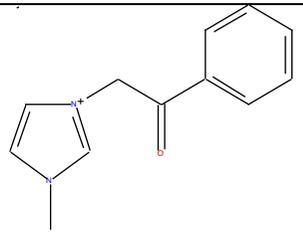
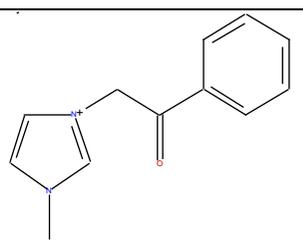
379. Zhao X., Guo F., Hu J., Zhang L., Xue C., Zhang Z., Li B. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb. res.*-2016.-144.-46-52.doi: 10.1016/j.thromres.2016.03.008
380. Zhang Y., Zhang J., Yan R., Tian J., Zhang Y., Zhang J., Chen M., Cui Q., Zhao L., Hu R., Jiang M., Li Z., Ruan C., He S., Dai K. Receptor-interacting protein kinase 3 promotes platelet activation and thrombosis. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA.*-2017.-114(11):2964-2969. doi: 10.1073/pnas.1610963114.
381. Zhou M., Yin J. Complete recovery of deep venous thrombosis from Coombs (+) thrombotic thrombocytopenic purpura: case report. *J.Cardiothorac. Surg.*-2022.-17: 43. doi: 10.1186/s13019-022-01789-8
382. Zhou Y., Yasumoto A., Lei C., Huang C.-J., Kobayashi H., Wu Y., Yan S., Sun C.-W., Yatomi Y., Goda K. Intelligent classification of platelet aggregates by agonist type. *eLife.*-2020.-9.-52938. doi: 10.7554/eLife.52938
383. Zhu Y., Chen X., Liu X. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Front. Immunol.*-2022.-13:838011. doi: 10.3389/fimmu.2022.838011.
384. Zhukovskaya O.N., Anisimova V.A., Spasov A.A., Sirotenko V.S. et al. 1-Substituted 2-Benzylaminobenzimidazoles with Phenyl Methoxyls: Synthesis, Computer Prediction, and Pharmacological Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016. 49(11). P. 735–742. doi: 10.1007/s11094-016-1362-9.

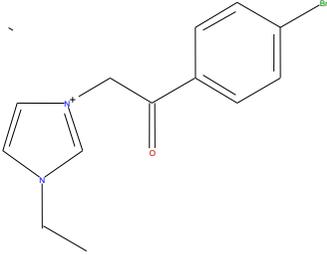
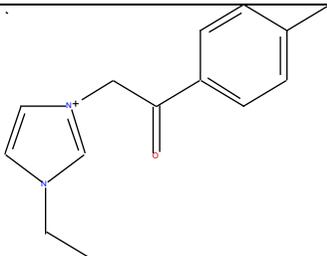
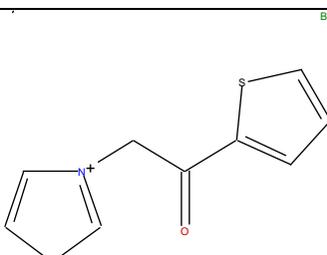
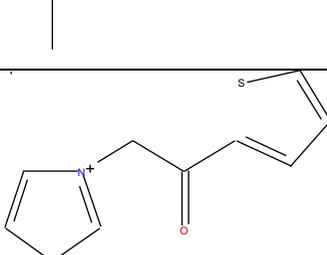
ПРИЛОЖЕНИЕ 1

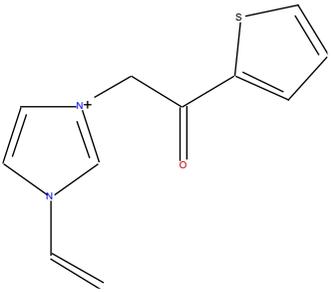
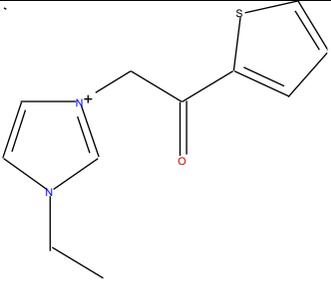
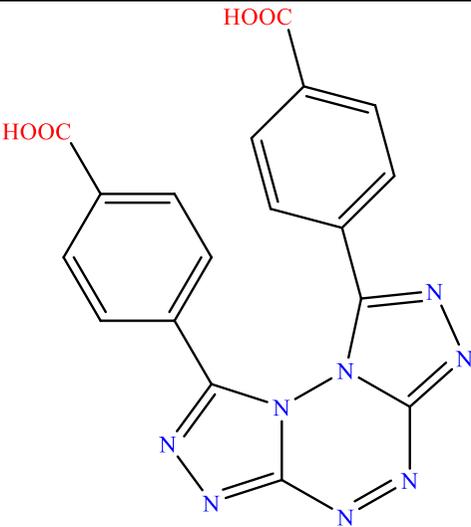
Таблица 3.1.

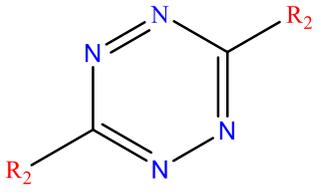
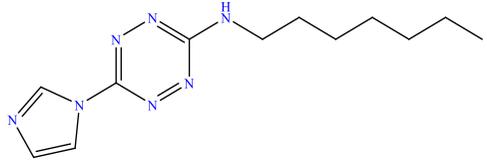
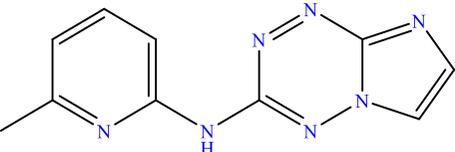
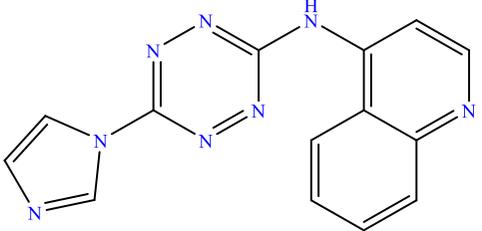
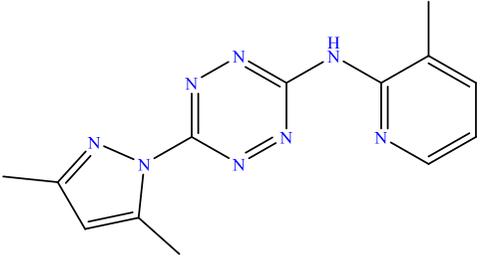
Антиагрегантная активность моноциклических азотсодержащих гетероциклических молекул в конечной концентрации 100 мкМ на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* ($M \pm m$) (n=6)

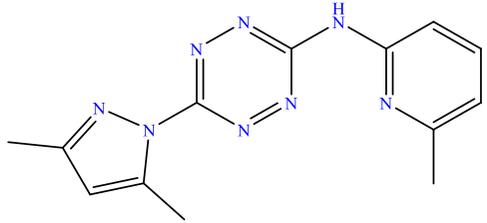
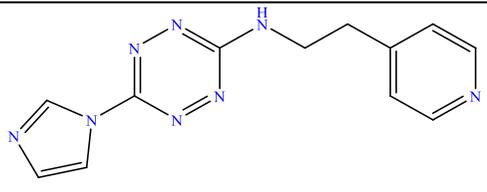
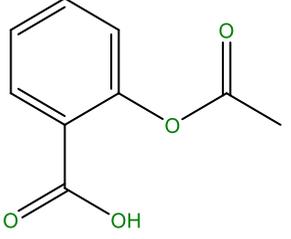
№ п/п	Химический класс	Тестируемый образец	Структурная формула	Солевой компонент	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов
					100 мкМ
1.		RUI-27		HBr	57,3±4,1*
2.		RUI-19		HBr	55,9±1,3*

3.	 <p>1,3-замещенные 1,3-имидазолы</p>	LOSAZ-33		HBr	55,3±1,8*
4.		RUI-20		HBr	54,3±3,2*
5.		RUI-23		HBr • 2H2O	48,9±13,4*
6.		RUI-21		HBr	27,7±4,7

7.		RUI-22		HBr	40,2±11,1*
8.		RUI-24		HBr	37,9±6,7*
9.		RUI-31		HBr	36,5±4,3
10.		RUI-29		HBr	28,8±2,7

11.		RUI-32		HBr	28,8±4,1
12.		RUI-30		HBr	21,3±1,2
13.		HC-0054		-	43,1±5,2

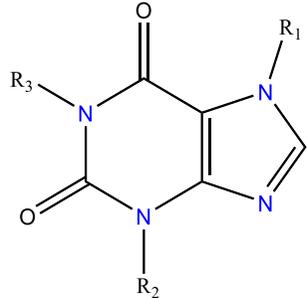
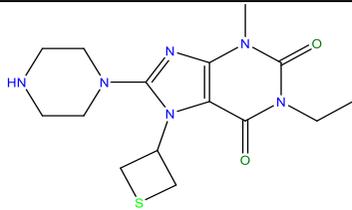
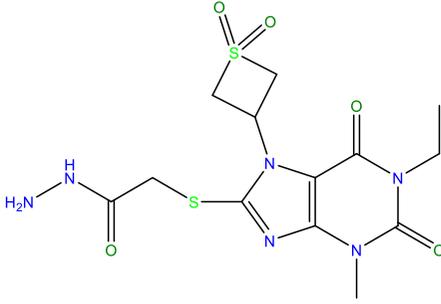
14.	 <p>2,5-замещенные 1,2,4,5-тетразины</p>	HC-0017		-	31,9±4,0
15.		HC-0009		-	31,8±2,9
16.		HC-0018		-	26,9±6,0
17.		HC-0025		-	22,0±1,9
18.		HC-0016		-	20,0±1,9

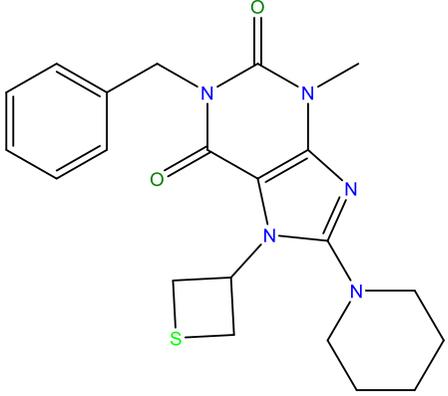
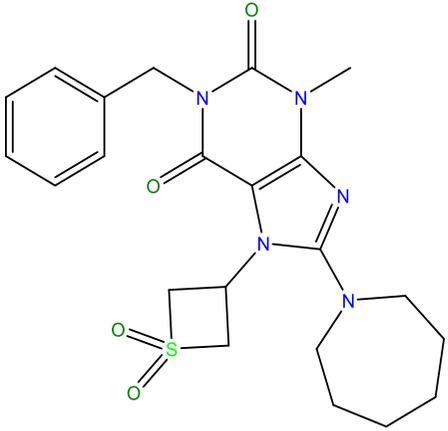
19.		НС-0024		-	15,3±4,4
20.		НС-0019		-	9,33±3,1
21.			 Ацетилсалициловая кислота		56,5±2,1*

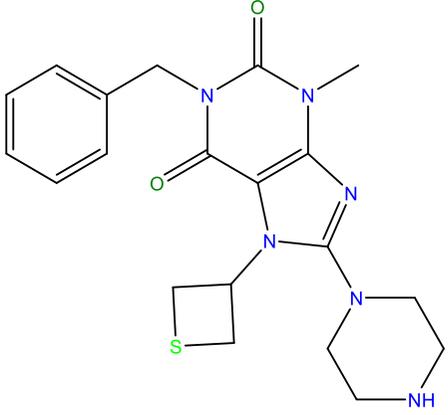
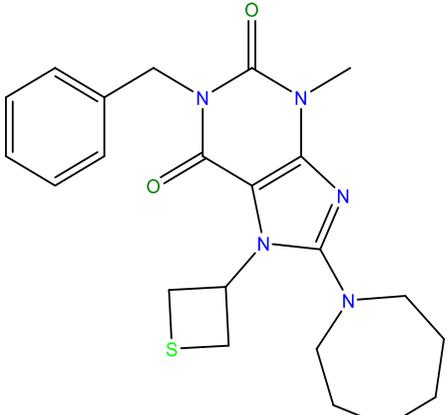
*-данные достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

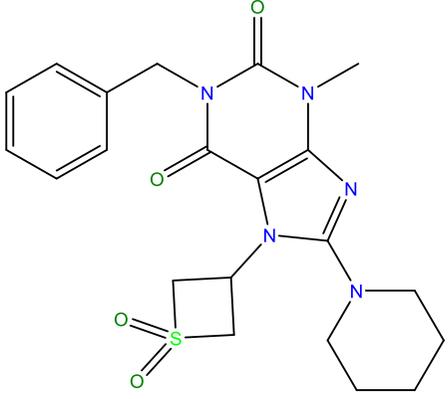
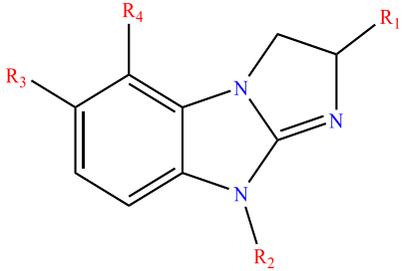
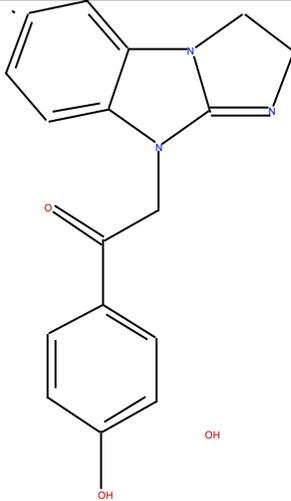
Таблица 3.3.

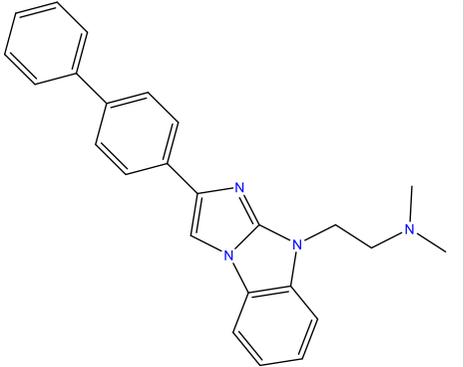
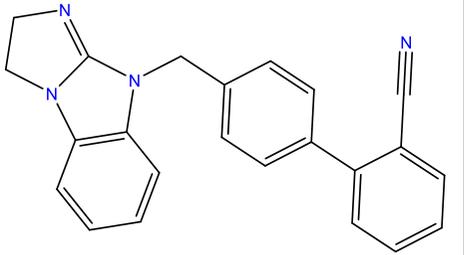
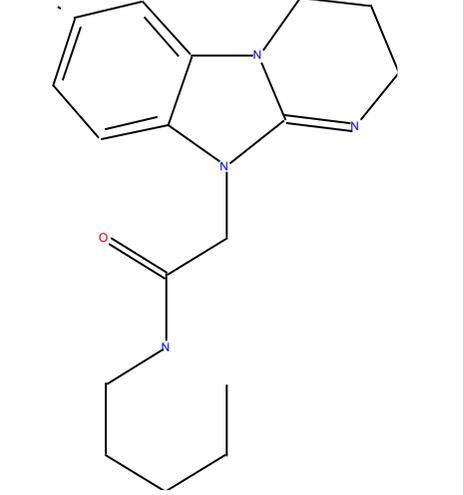
Антиагрегантная активность конденсированных азотсодержащих гетероциклических соединений на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* ($M \pm m$) ($n=6$)

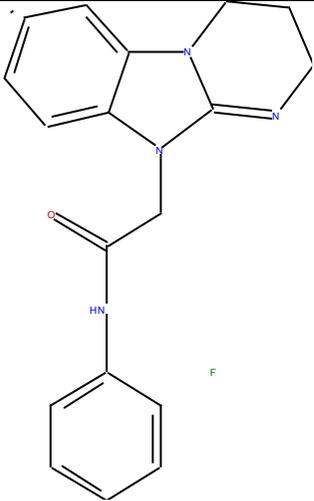
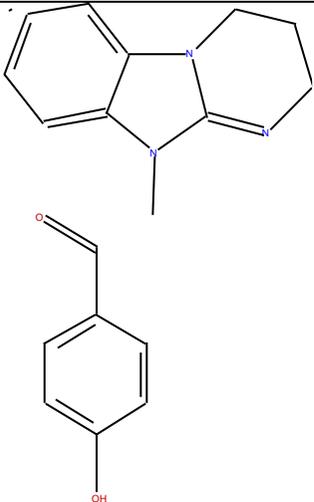
№ п/п	Химический класс	Тестируемый образец	Структурная формула	Солевой компонент	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов
					100 мкМ
1.	 <p>3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-дионы Ксантины</p>	Ф-168		НCl	66,2±2,3*
2.		КНФА-482		-	26,2±2,3

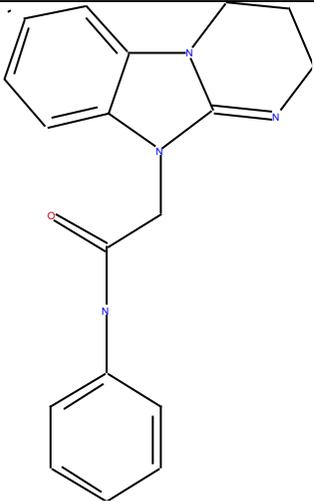
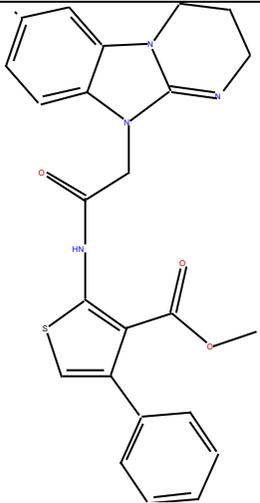
3.		KHFA-365	 <p>The chemical structure of KHFA-365 is a complex heterocyclic molecule. It features a central pyrimidopyrimidine core. One nitrogen atom of the core is substituted with a benzyl group (a benzene ring attached to a methylene group). Another nitrogen atom is substituted with a methyl group. A third nitrogen atom is substituted with a four-membered ring containing a sulfur atom. The fourth nitrogen atom is substituted with a six-membered ring containing a nitrogen atom.</p>	-	24,9±1,5
4.		KHFA-357	 <p>The chemical structure of KHFA-357 is similar to KHFA-365 but with a different substituent on the sulfur-containing ring. It features a central pyrimidopyrimidine core. One nitrogen atom is substituted with a benzyl group. Another nitrogen atom is substituted with a methyl group. A third nitrogen atom is substituted with a four-membered ring containing a sulfur atom, which is further substituted with two oxygen atoms (a sulfone group). The fourth nitrogen atom is substituted with a seven-membered ring containing a nitrogen atom.</p>	-	19,4±3,5

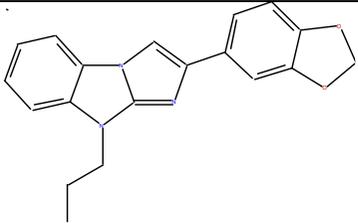
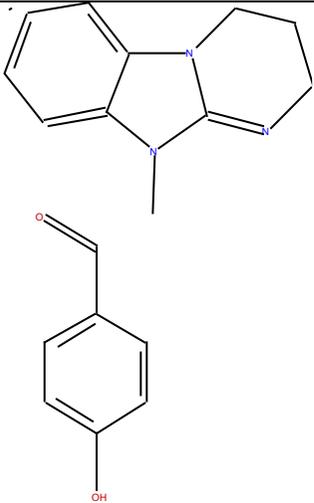
5.		KHFA-68		-	19,4±4,3
6.		KHFA-367		-	18,0±0,9

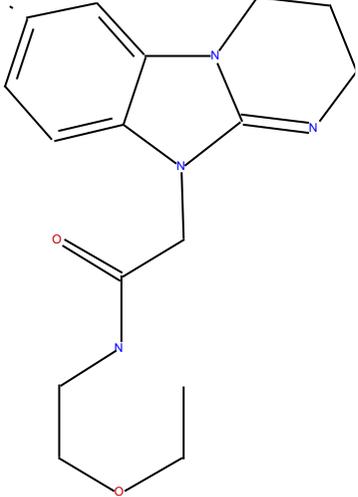
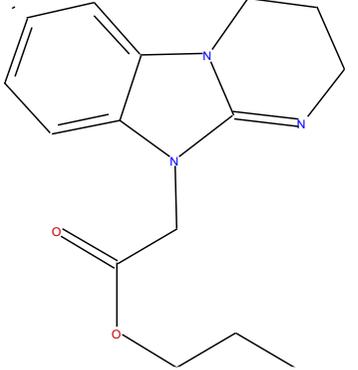
7.		KHFA-355		-	14,3±3,5
8.	 <p data-bbox="389 1059 766 1091">N9-имидазобензимидазола</p>	RU-891		HBr	54,0±4,1*

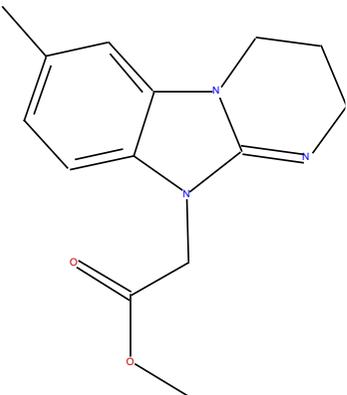
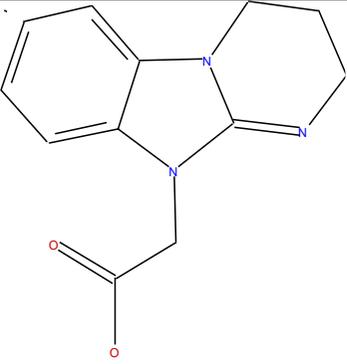
9.		DF-6		2HCl	49,6±5,2*
10.		AZH-143		HBr	44,9±3,2*
11.		RU-1318		HCl	41,8±1,4*

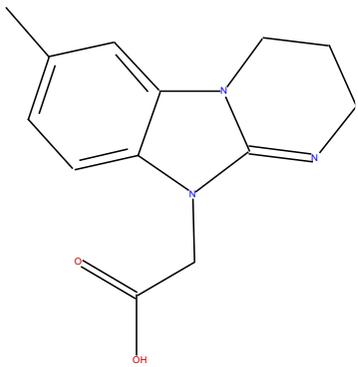
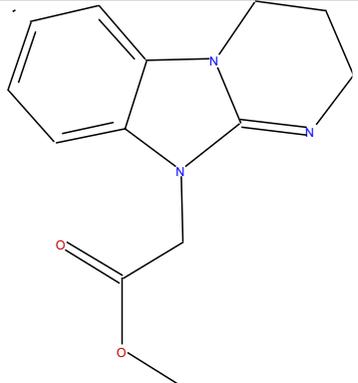
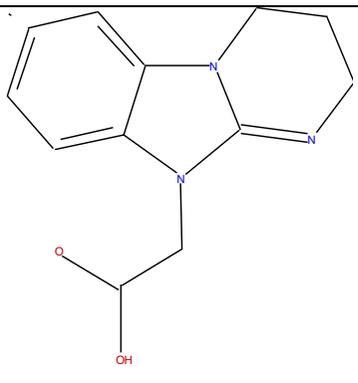
12.		RU-1302	 <p>The structure of RU-1302 consists of a 2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzodiazepine core. A propyl chain is attached to the nitrogen at position 1, which is further substituted with a benzamide group. A fluorine atom (F) is attached to the benzamide ring at the para position.</p>	HCl	41,4±4,4*
13.		RU-870x	 <p>The structure of RU-870x consists of a 2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzodiazepine core. A methyl group is attached to the nitrogen at position 1. A propyl chain is attached to the nitrogen at position 5, which is further substituted with a 4-hydroxybenzamide group.</p>	HCl	36,6±13,8

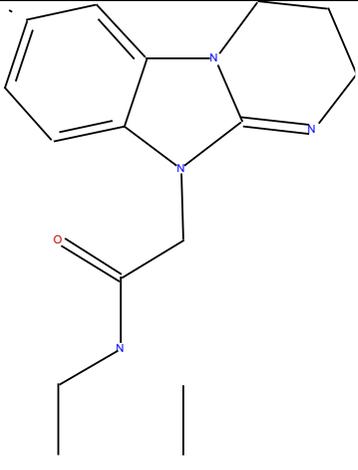
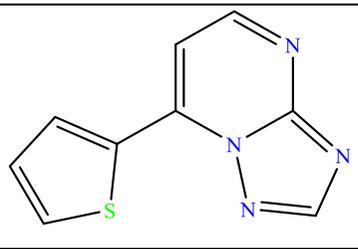
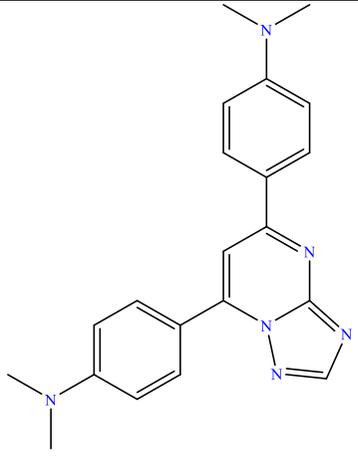
14.		RU-1308	 <chem>CC(=O)NCCN1c2ccccc2n1Cc3ccccc3</chem>	HCl	36,1±7,6*
15.		RU-1313	 <chem>CCOC(=O)c1cc(C2=CC=CC=C2)sc1NC(=O)CCN3c4ccccc4n3Cc5ccccc5</chem>	HCl	36,0±5,3*

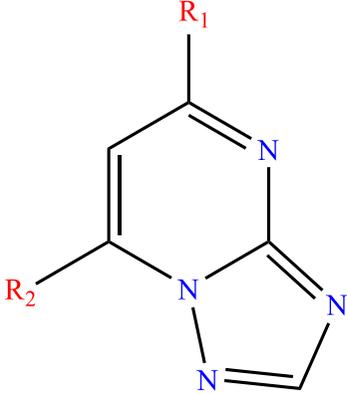
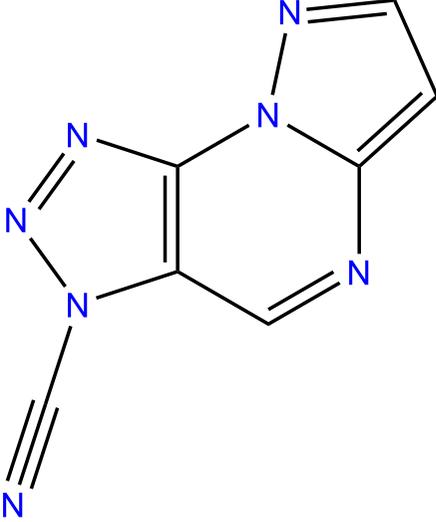
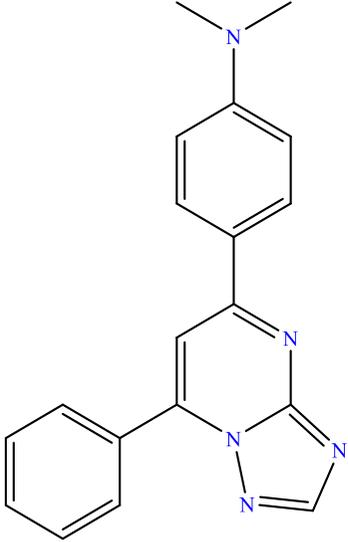
16.		RU-1253		HCl	32,4±10,4
17.		RU-870		HBr	30,0±5,4*

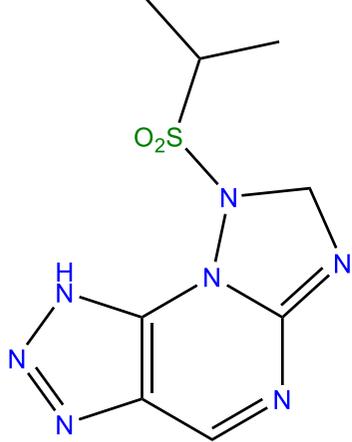
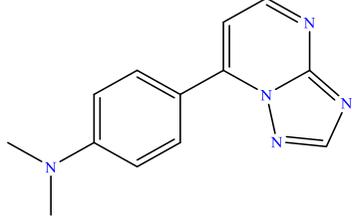
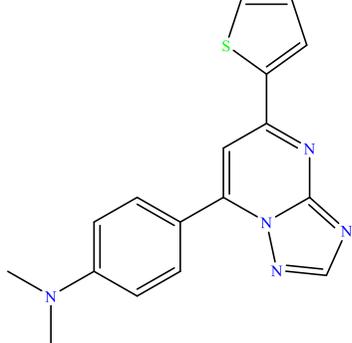
18.		RU-1300	 <chem>CCCC1=CN2C(=N1)C3=CC=CC=C3N2CC(=O)N4CCOCC4</chem>	HCl	30,0±3,9*
19.		RU-1018	 <chem>CCCC1=CN2C(=N1)C3=CC=CC=C3N2CC(=O)OCC</chem>	HCl	27,3±9,4

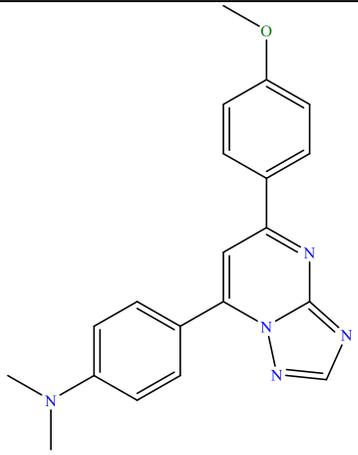
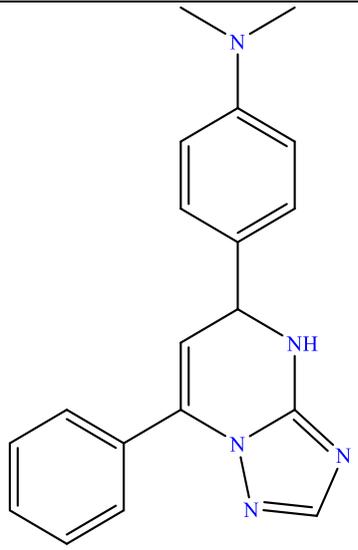
20.		RU-1023		HBr	26,8±2,7*
21.		RU-1296		HBr	20,0±13,0

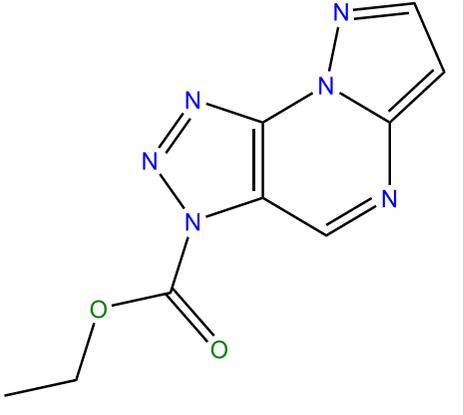
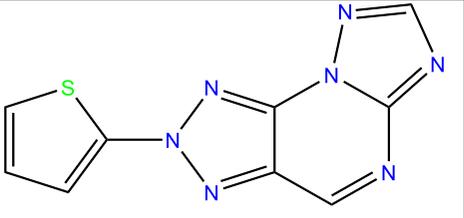
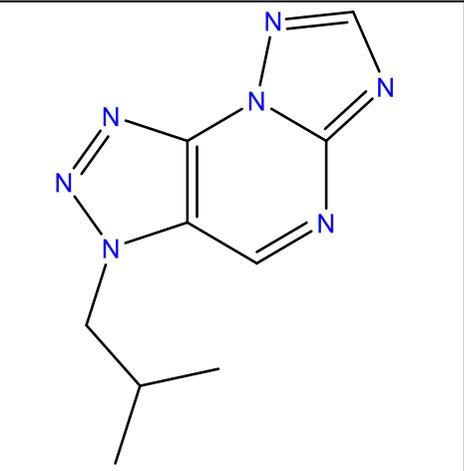
22.		RU-1024		HBr	16,8±0,3
23.		RU-1017		HBr	16,6±7,1
24.		RU-1019		HCl	13,0±5,6

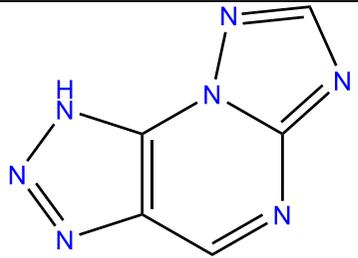
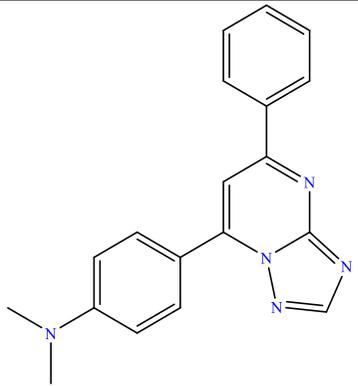
25.		RU-1298		HCl	11,5±0,7
26.		HC-0436		-	44,3±2,8*
27.		HC-0442		-	41,8±4,3*

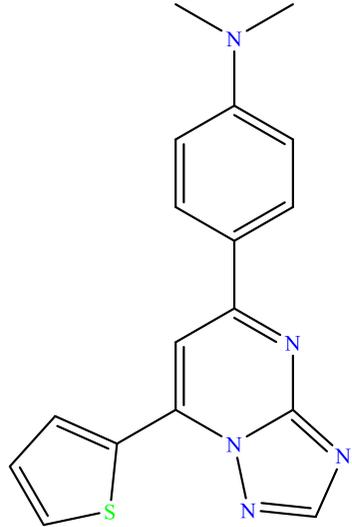
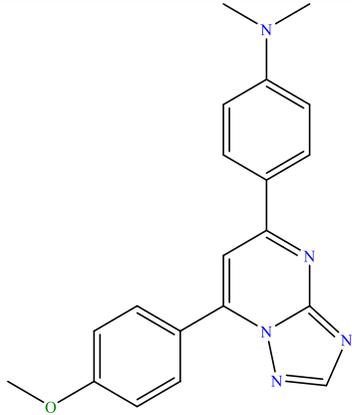
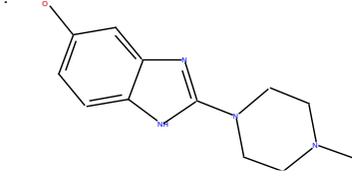
28.	 <p>1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидины</p>	GEB-779		-	41,3±2,2*
29.		HC-0440		-	39,2±7,8*

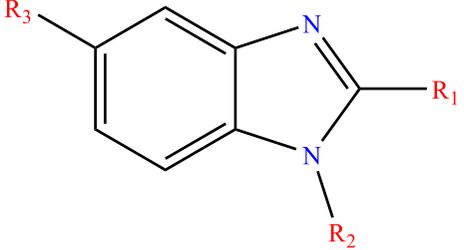
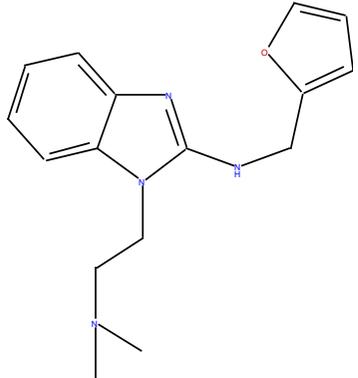
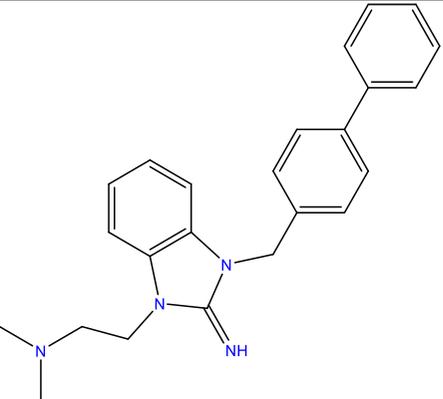
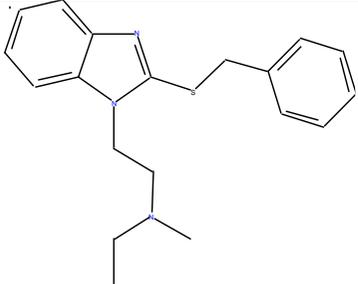
30.		GEB-637		-	38,5±4,8*
31.		HC-0438		-	36,2±7,1
32.		HC-0445		-	29,1±5,8

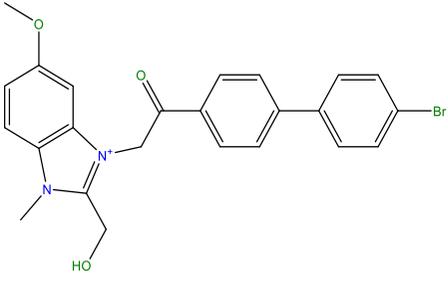
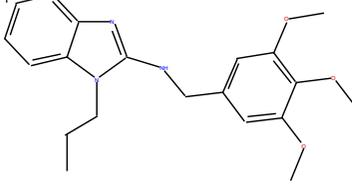
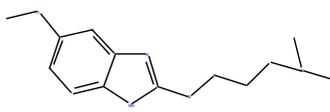
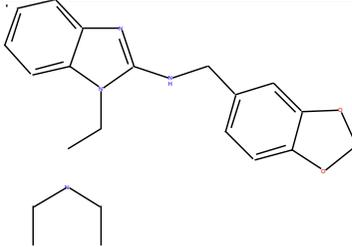
33.		HC-0444	 <chem>CN(C)c1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)cc2C4=CC=C(OC)C=C4</chem>	-	28,8±10,6
34.		HC-0580	 <chem>CN(C)c1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)cc2C4=CC=CC=C4</chem>	-	23,4±3,3

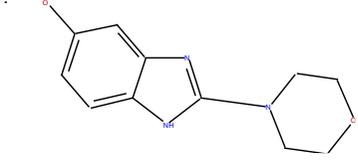
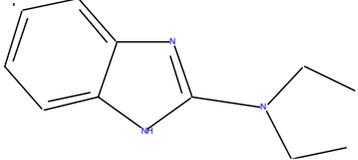
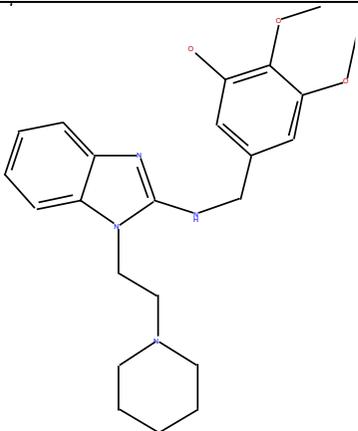
35.		GEB-652		-	23,3±5,5
36.		GEB-742		-	21,9±3,5
37.		GEB-659-2b		-	18,3±4,7

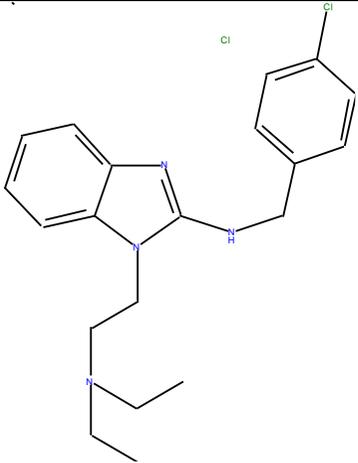
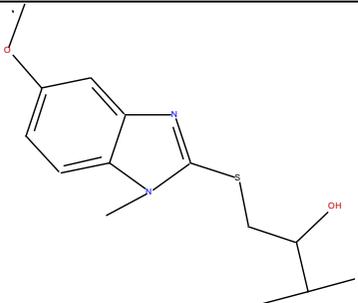
38.		GEB-456-1		-	16,4±3,9
39.		HC-0443		-	16,1±3,6

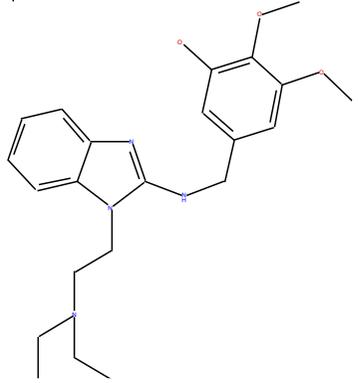
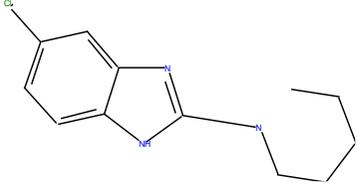
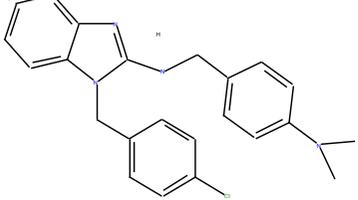
40.		HC-0439		-	15,8±4,2
41.		HC-0441		-	15,1±3,5
42.		AZH-43		2HCl	45,7±6,9*

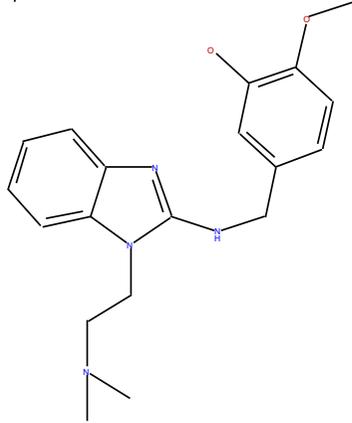
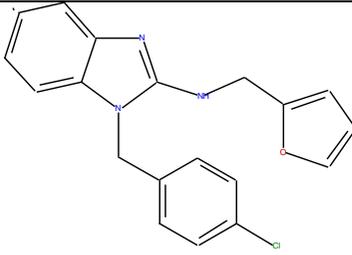
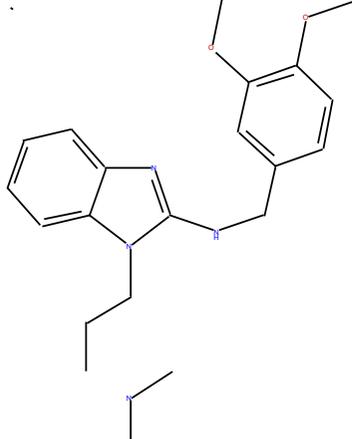
43.	 <p>1H-бензимидазолы</p>	AZH-22		2HCl	43,4±1,5*
44.		AZH-141		HBr	40,2±11,5
45.		AZH-59		2HCl	40,0±7,7*

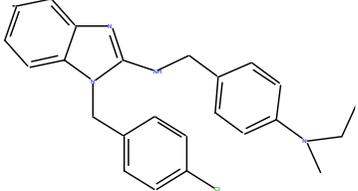
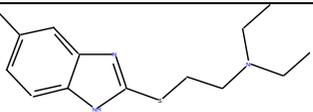
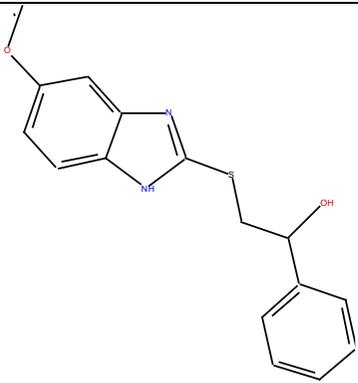
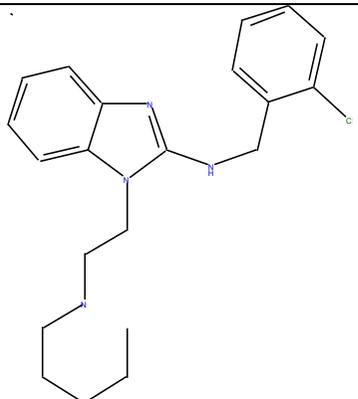
46.		AZH-44		2HCl	39,1±4,5*
47.		AZH-137		HBr	39,0±2,5
48.		AZH-17		HCl	39,0±6,0*
49.		AZH-55		2HBr	39,0±10,6
50.		AZH-72		2HCl	37,6±9,6

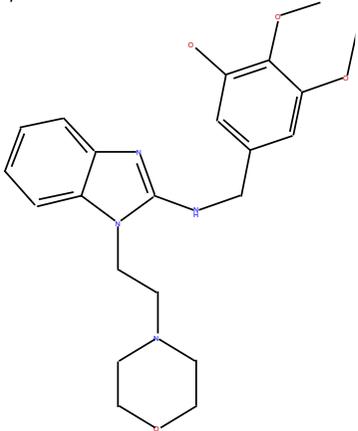
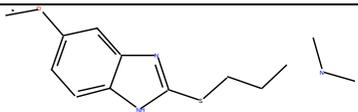
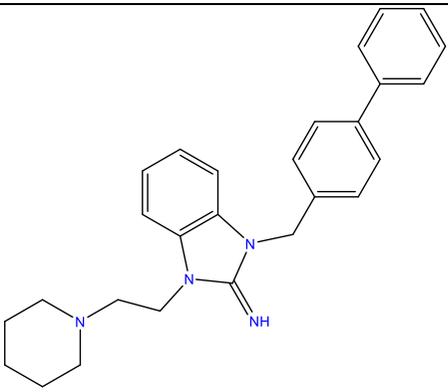
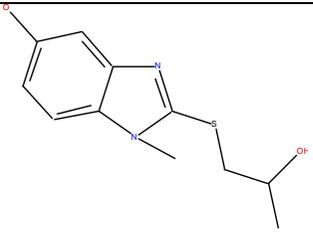
51.		AZH-52		2HCl	37,2±5,6*
52.		AZH-45		2HCl	34,9±12,8
53.		AZH-18		2HCl	33,8±3,7*

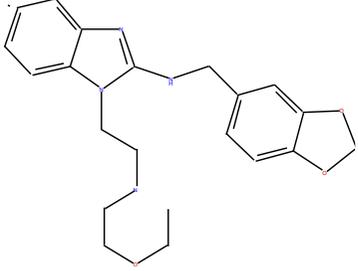
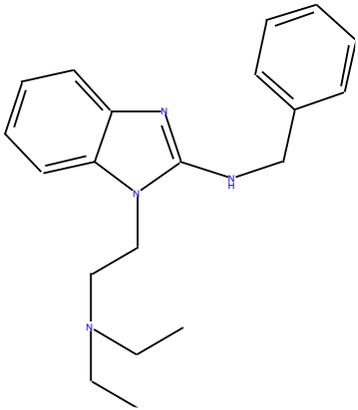
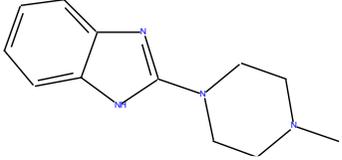
54.		AZH-24	 <chem>CCCCN1C2=CC=CC=C2N=C1NC3=CC=C(Cl)C=C3</chem>	2HCl	33,3±11,0*
55.		AZH-63	 <chem>COc1ccc2c(c1)n(C)c3c2SCC(O)C3</chem>	HCl	33,0±2,1*

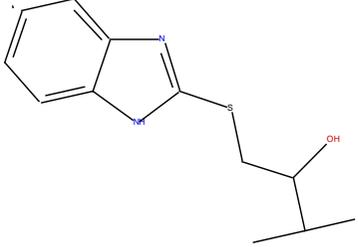
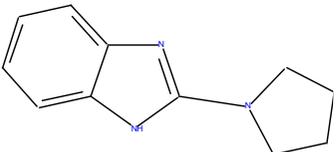
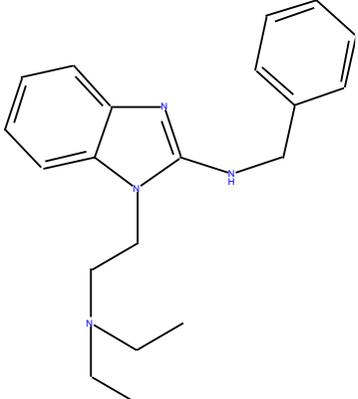
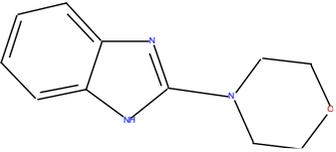
56.		AZH-20		2HCl	31,6±4,1*
57.		AZH-48		2HCl	31,3±8,8*
58.		AZH-65		2HCl	31,2±6,9*

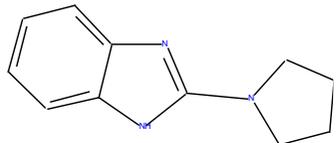
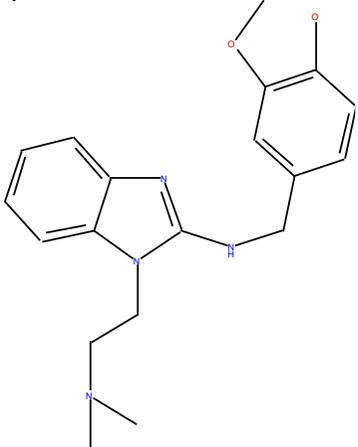
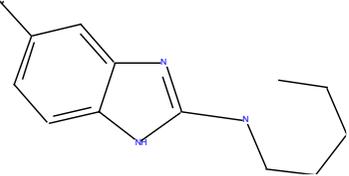
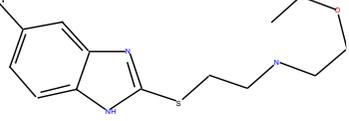
59.		AZH-68		2HCl	30,9±6,0*
60.		AZH-67		HCl	30,5±10,5
61.		AZH-69		2HCl	30,3±7,9

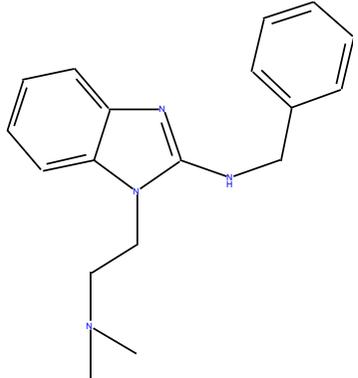
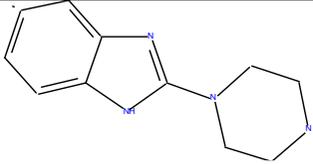
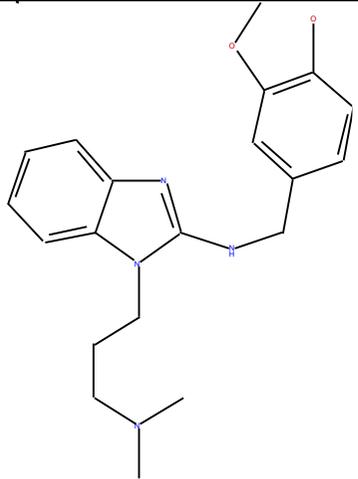
62.		AZH-66		2HCl	30,2±5,0*
63.		AZH-53		2HCl	30,0±6,3
64.		AZH-62		HCl	29,8±8,8
65.		AZH-23		2HCl	29,5±7,2

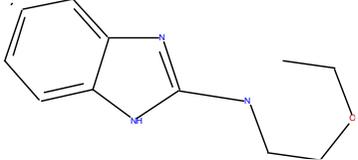
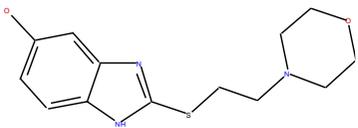
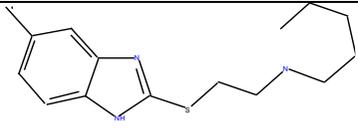
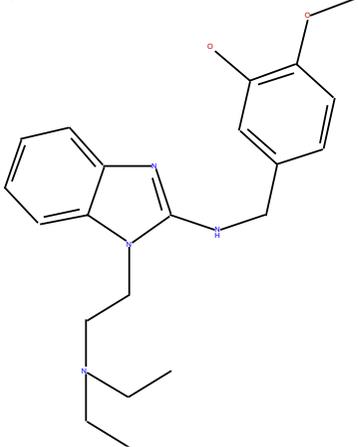
66.		AZH-19		2HCl	29,0±6,6
67.		AZH-54		2HBr	29,0±1,3
68.		AZH-135		HBr	28,6±6,5
69.		AZH-60		HCl	27,6±6,6

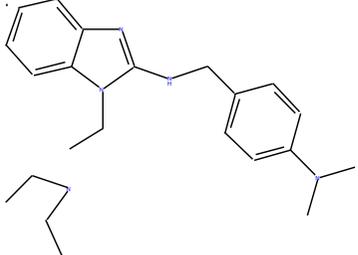
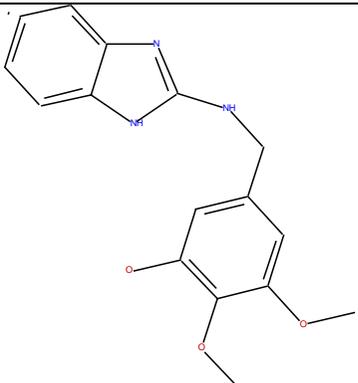
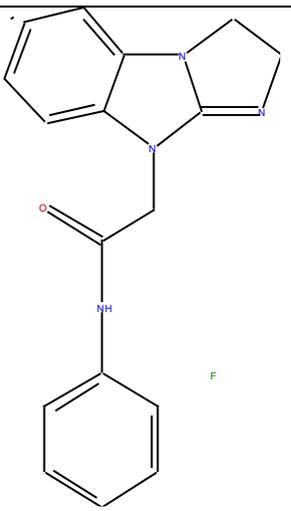
70.		AZH-73		2HCl	$27,4 \pm 7,2$
71.		AZH-26		2HCl	$26,8 \pm 5,2$
72.		AZH-42		2HCl	$26,2 \pm 0,2$

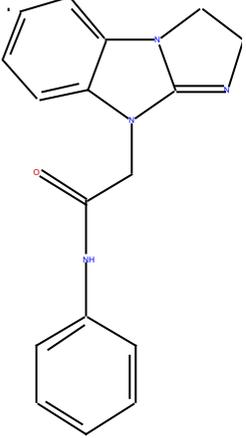
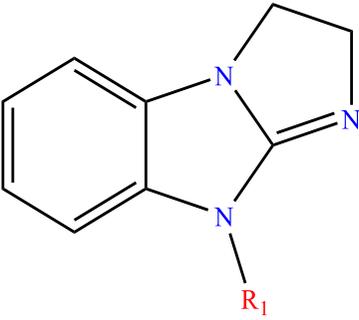
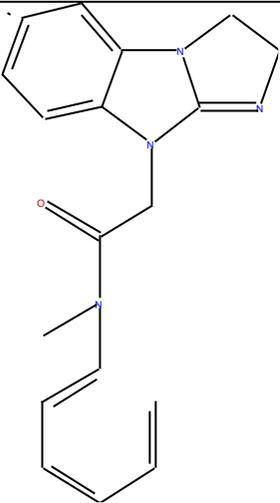
73.		AZH-61		HCl	26,1±4,4
74.		AZH-47		2HCl	24,7±3,3
75.		AZH-25		2HCl	24,5±3,3
76.		AZH-51		2HCl	24,1±6,5

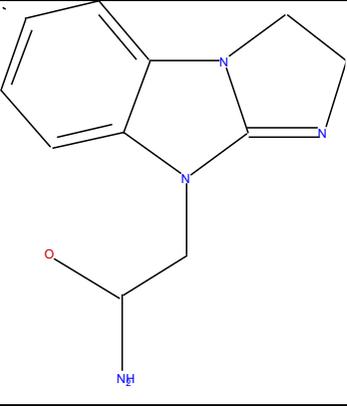
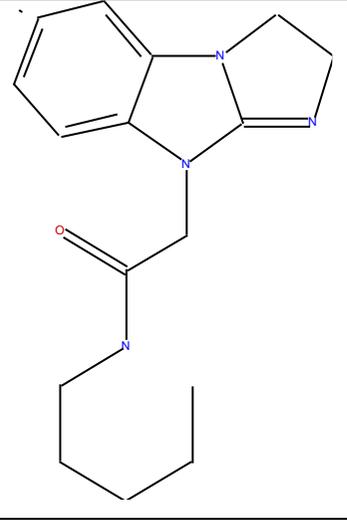
77.		AZH-46		2HCl	23,6±6,9
78.		AZH-70		2HCl	23,2±1,6
79.		AZH-49		2HCl	22,7±6,5
80.		AZH-57		2HCl	22,4±3,4

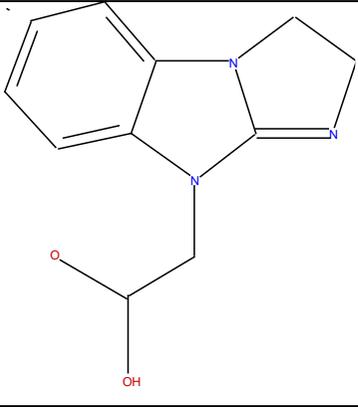
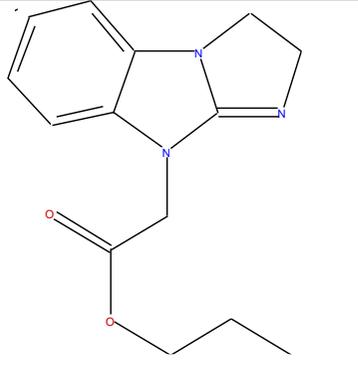
81.		AZH-27		2HCl	20,9±4,4
82.		AZH-41		2HCl	20,6±3,7
83.		AZH-71		2HCl	19,4±4,8

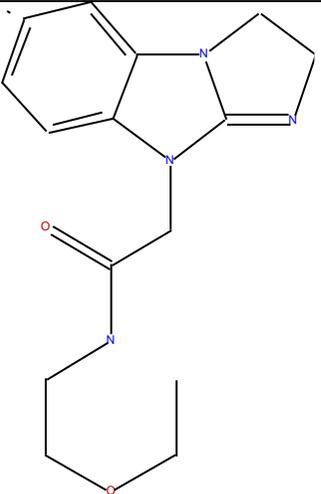
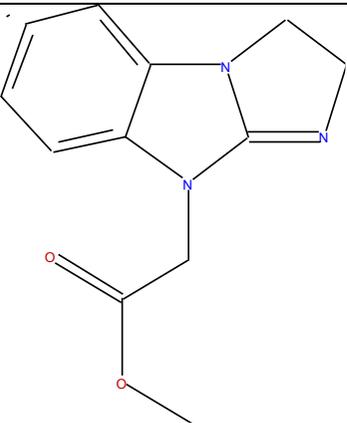
84.		AZH-50		2HCl	19,4±6,3
85.		AZH-58		2HCl	19,3±2,3
86.		AZH-56		2HCl	19,3±5,0
87.		AZH-21		2HCl	18,3±6,5

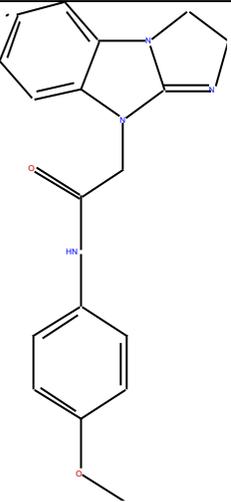
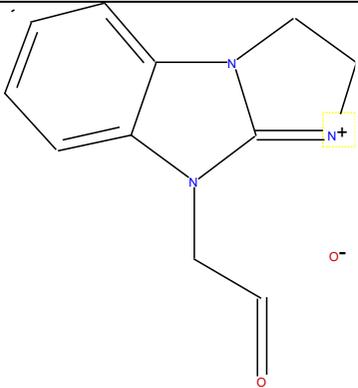
88.		AZH-74		2HCl	18,1±6,2
89.		AZH-16		HCl	15,7±1,2
90.		RU-1301		HCl	54,9±1,7*

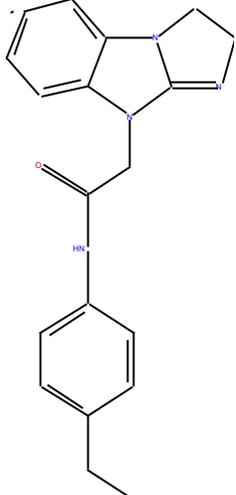
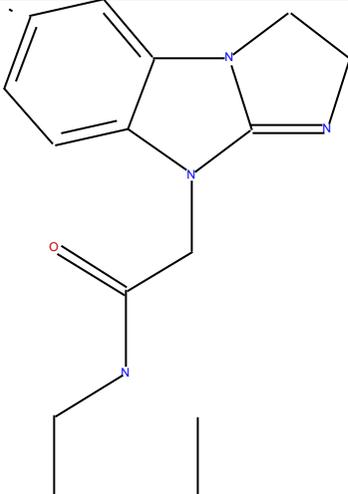
91.		RU-1303		HCl	54,0±2,0*
92.	 <p data-bbox="360 1070 797 1161">N9-2,3- дигидроимдазобензимидазолы</p>	RU-1307		HCl	45,6±9,1*

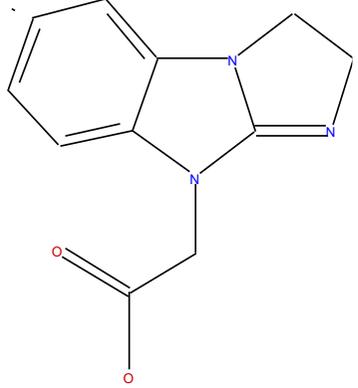
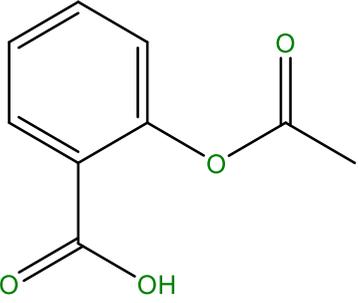
93.		RU-1316	 <chem>NC(=O)CCN1C2=CC=CC=C2N3C=CC=N31</chem>	HCl	39,6±1,4*
94.		RU-1317	 <chem>C1CCN(C1)CC(=O)N2C3=CC=CC=C3N4C=CC=N42</chem>	HCl	39,3±4,1*

95.		RU-1016	 <chem>CC(O)CN1C2=CC=CC=C2N3CCN=C31</chem>	HCl	38,0±0,5*
96.		RU-1294	 <chem>CCOC(=O)CN1C2=CC=CC=C2N3CCN=C31</chem>	HCl	36,0±9,9*

97.		RU-1299	 <chem>C1CCN(C1)CC(=O)CN2C3=CC=CC=C3N=C2</chem>	HCl	33,4±4,6*
98.		RU-1293	 <chem>COC(=O)CN2C3=CC=CC=C3N=C2</chem>	HBr	30,9±0,4*

99.		RU-1311		HCl	30,1±5,9*
100.		RU-1295		Betaine	26,3±3,9*

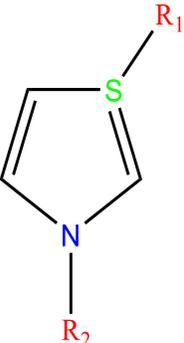
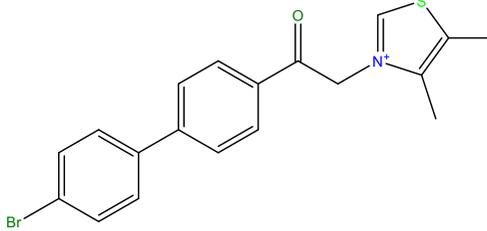
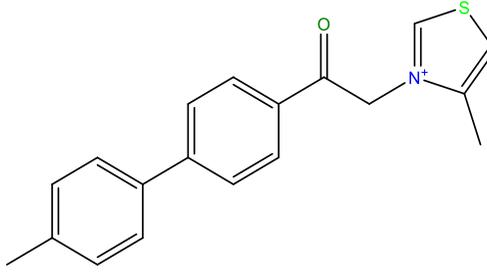
101.		RU-1312	 <chem>CCN(CC(=O)Nc1ccc(CC)cc1)c2c3c(c4ccccc4n23)N5CCCC5</chem>	HCl	25,9±3,4*
102.		RU-1297	 <chem>CCN(CC(=O)Nc1ccc(CC)cc1)c2c3c(c4ccccc4n23)N5CCCC5</chem>	HCl	9,6±2,5

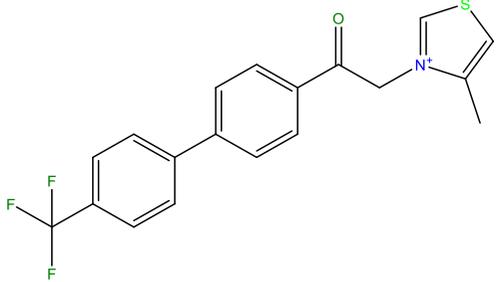
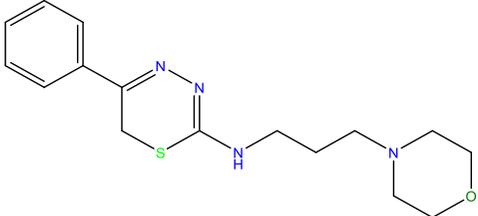
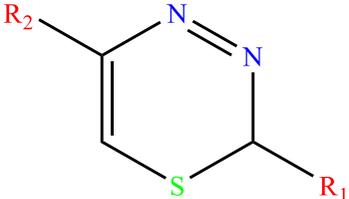
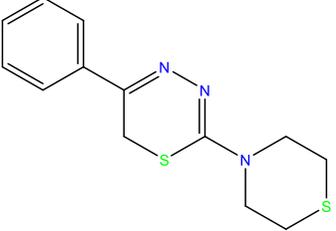
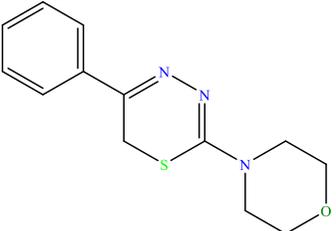
103.		RU-651		HBr	8,4±2,2
104.		 Ацетилсалициловая кислота			56,5±2,1*

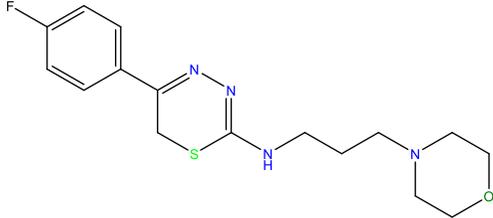
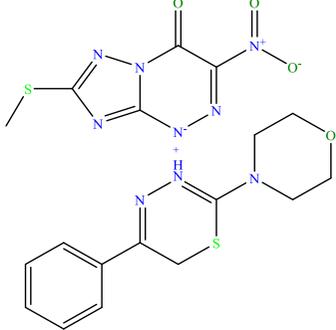
*-данные достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

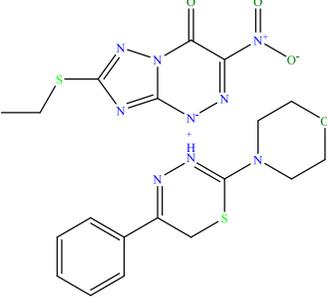
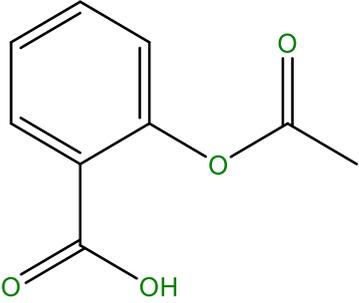
Таблица 3.5.

Антиагрегантная активность серосодержащих гетероциклических соединений на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* ($M \pm m$) ($n=6$)

№ п/п	Химический класс	Тестируемый образец	Структурная формула	Солевой компонент	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов
					100 мкМ
1.	 3H-тиазолы	AZHT-9		HBr	68,7±4,2*
2.	3H-тиазолы	AZHT-7		HBr	65,8±4,7*

3.		AZHT-8		HBr	40,9±5,1*
4.		L-14		2HBr	70,8±3,7*
5.	 6H-1,3,4-тиадиазины	L-36		HBr	65,8±8,8*
6.		L-17		HBr	64,6±1,8*

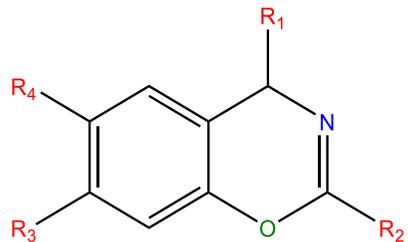
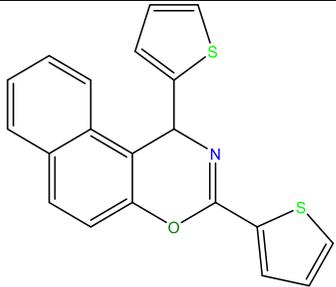
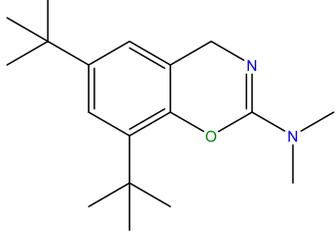
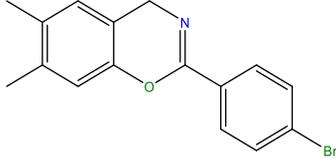
7.		L-91		2HBr	57,3±2,4*
8.		L-17-TT1		-	22,0±1,9*

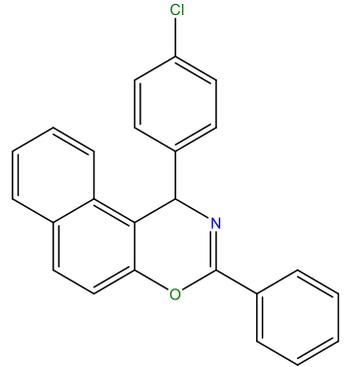
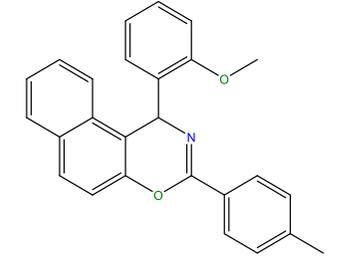
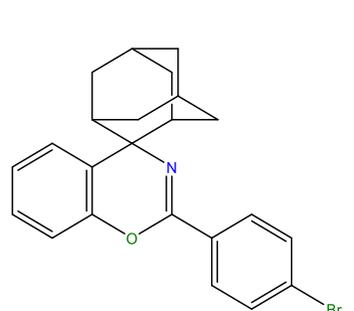
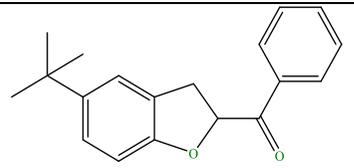
9.		L-17-TT2		-	18,8±2,2
10.	 Ацетилсалициловая кислота			56,5±2,1*	

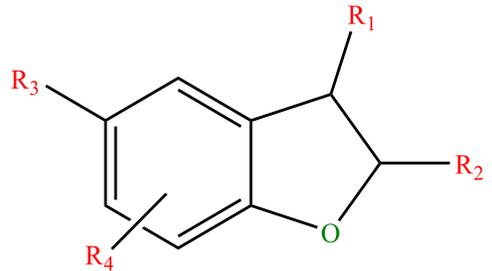
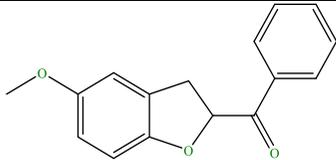
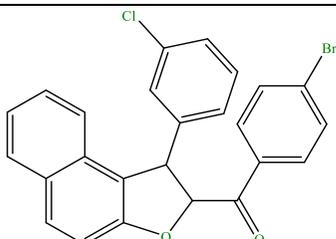
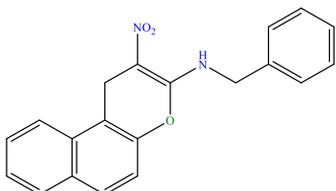
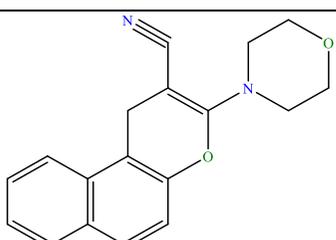
*-данные достоверны по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

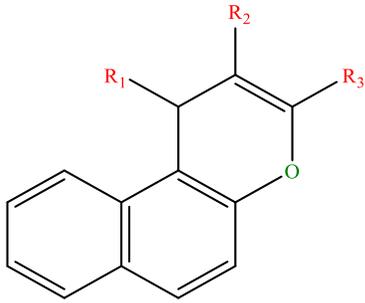
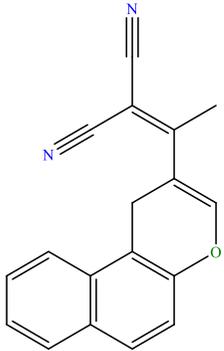
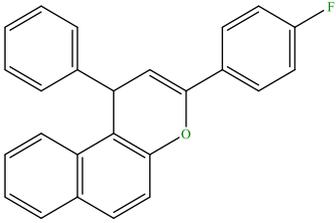
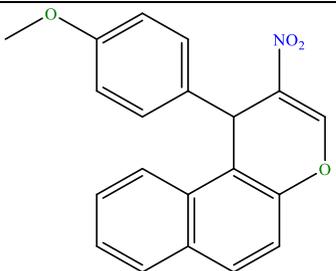
Таблица 3.7.

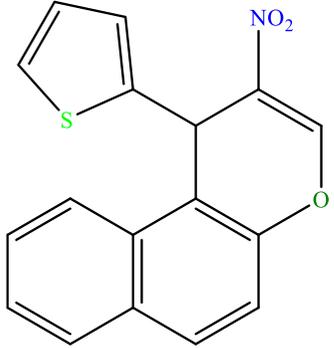
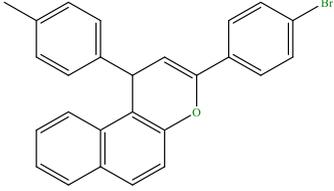
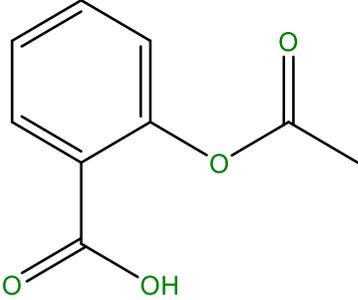
Антиагрегантная активность кислородсодержащих гетероциклических соединений на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* (Mm) (n=6)

№ п/п	Химический класс	Тестируемый образец	Структурная формула	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов
				100 мкМ
1.	 <p>4H-бензо[1,3]оксазины</p>	4		48,3±0,1*
2.		34		44,9±7,0*
3.		13		39,6±14,1*

4.		9		$35,0 \pm 9,2^*$
5.		17		$25,5 \pm 0,2^*$
6.		13417		$16,6 \pm 3,9$
7.		14330		$15,6 \pm 4,8$

8.	 <p>2,3-дигидробензофураны</p>	14328		15,4±3,9
9.		14367		10,4±1,5
10.		14382		23,6±1,9*
11.		14378		22,1±4,4

12.	 <p>4H-ксантены</p>	14376		21,8±5,9
13.		14256		20,9±4,5
14.		14392		16,8±1,6

15.		14390		14,9±1,4
16.		14368		13,2±1,4
17.	 <p data-bbox="815 1107 1205 1139">Ацетилсалициловая кислота</p>		56,5±2,1*	

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