

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Осман Элиас

АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА
– ИНГИБИТОРОВ КИНАЗЫ GSK3B

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
Сиротенко Виктор Сергеевич

Волгоград, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Социальная значимость проблемы тромбозов	12
1.2. Образование тромбов	13
1.2.1. Адгезия тромбоцитов	14
1.2.2. Механизм адгезии тромбоцитов к эндотелию	17
1.2.3. Скопление тромбоцитов	19
1.3. Фармакологическая коррекция нарушений системы гемостаза	22
1.4. GSK-3 β в процессах тромбообразования	28
1.5. Фармакологическая активность производных 2-оксиндола	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Определение активности киназы гликогенсинтазы типа 3 β (GSK-3b) <i>invitro</i>	34
2.2. Изучение влияния производных 2-оксиндола на функциональную активность тромбоцитов <i>invitro</i>	34
2.3. Исследования на первичных перитонеальных макрофагах	36
2.3.1. Выделение перитонеальных макрофагов	36
2.3.2. Выделение моноцитов периферической крови	37
2.3.3. Определение оксида азота (NO)	38
2.3.4. Определение цитокинов	39
2.3.5. Определение жизнеспособности клеток (МТТ-тест)	39
2.3.6. Определение жизнеспособности клеток (ЛДГ-тест)	39
2.4. Изучение влияния соединения К-167 на функциональную активность тромбоцитов <i>in vivo</i>	40
2.5. Изучение острой токсичности	42
2.6. Влияние соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами	43
2.7. Исследование влияния соединения К-167 на пуриновые рецепторы тромбоцитов	44
2.8. Измерение уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика	45
2.9. Метод определения секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов	47

2.10. Изучение влияния соединения К-167 на уровень тромбосана А2 и 6-кето-простагладина F1 α	48
2.11. Метод интегральной оценки системы гемостаза (тромбоэластография).....	49
2.12. Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс.....	49
2.13. Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током..	51
2.14. Модель тромбоза глубоких вен	53
2.15. Изучение антитромботических свойств соединения К-167 на модели тромбоза сонной артерии в условиях инфаркта миокарда	54
2.16. Метод изучения влияния тестируемого соединения на время кровотечения	54
2.17. Исследование влияния соединения К-167 на уровень эндотелина-1 и фактора Виллебранда без и в условиях экспериментального сепсиса	55
2.18. Исследование влияния соединения К-167 на параметры тромбоэластограммы без и в условиях экспериментального сепсиса	55
2.19. Статистическая обработка данных.....	56
ГЛАВА 3. ПОИСК В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА GSK-3 β	57
ГЛАВА 4. АНТИАГРЕГАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА <i>INVITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	61
4.1. Поиск соединений с антиагрегантной активностью в ряду производных 2-оксиндола, проявляющих GSK3 β -ингибирующую активность, <i>invitro</i>	62
4.2. Зависимость антиагрегантного эффекта производных 2-оксиндола от химической структуры.....	64
4.3. Антиагрегантная активность наиболее активного соединения К-167 <i>in vivo</i> ..	68
4.4. Изучение острой токсичности соединения К-167	69
Заключение	71
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ К-167 НА РАЗЛИЧНЫЕ ЗВЕНЬЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА.....	72
5.1. Влияние соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов, стимулированную различными агонистами	72

5.2. Влияние соединения К-167 на пуриновые рецепторы тромбоцитов.....	74
5.3. Влияние соединения К-167 на баланс тромбоксана и простациклина	76
5.4. Влияние соединения К-167 на секреторную функцию тромбоцитов.....	78
5.5. Изучение влияния соединения К-167 на параметры тромбоэластограммы	81
Заключение	82
ГЛАВА 6. АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ К-167	86
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ К-167 НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СЕПСИСА.....	92
7.1. Влияние соединения К-167 на секреторную функцию макрофагов.....	92
7.2. Исследование влияния соединения К-167 на параметры тромбоэластограммы крыс в условиях системной воспалительной реакции	93
7.3. Влияние соединения К-167 на уровень эндотелина-1 и фактора Виллебранда в плазме крыс с экспериментальным сепсисом	96
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.	99
ВЫВОДЫ	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
Список литературы	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром, ишемический инсульт, нарушение периферического кровообращения в конечностях, осложнения сахарного диабета и пр. – заболевания, сопровождающиеся повышением тромбогенного потенциала крови. Вопрос профилактики этих патологий является краеугольной проблемой в современной медицине.

Основными элементами, которым принадлежит ключевая роль в процессах тромбообразования, являются тромбоциты. Адгезия, активация, агрегация являются основными стадиями образования внутрисосудистого сгустка. Пусковым механизмом процесса тромбообразования служит взаимодействие тромбоцитов с эндогенными проагрегантными веществами и молекулами адгезии (фактор Виллебранда и коллаген).

В результате многоцентровых рандомизированных исследований была установлена высокая значимость антитромбоцитарной терапии в лечении и профилактике ишемической болезни, атеросклероза, цереброваскулярных заболеваний, а также периферических сосудистых заболеваний. Однако несмотря на эффективность и высокую степень доказательности современные лекарственные средства обладают рядом побочных явлений, ограничивающих их практическое применение.

Согласно литературным данным, внутриклеточный сигнальный посредник GSK-3 β принимает активное участие в процессах запуска тромбоцитарного каскада и, соответственно, агрегации тромбоцитов. На кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ проведены исследования новых производных 2-оксиндола, демонстрирующие их высокий ингибирующий потенциал в отношении GSK-3 β .

Исходя из вышеперечисленного, поиск новых соединений с антиагрегантной активностью в ряду производных 2-оксиндолов является актуальным.

Цель исследования

Поиск высокоэффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов в ряду производных 2-оксиндола и изучение их антитромбогенной активности.

Задачи исследования:

1. Изучение GSK3В-ингибирующей активности производных 2-оксиндола. Определение величин ИК50. Выявление закономерностей структура-активность.
2. Изучение антиагрегантной активности новых производных 2-оксиндола на моделях АДФ-индуцированной и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*. Выявление закономерностей структура-активность.
3. Определение влияния наиболее активных соединений на секрецию медиаторов воспаления ЛПС-стимулированными макрофагами. Определение цитотоксичности.
4. Исследование величины острой суточной токсичности соединений, проявляющих наибольшую антиагрегантную активность, расчет условно-терапевтического индекса. Определение соединения-лидера для изучения специфической фармакологической активности.
5. Изучение аспектов механизма действия соединения-лидера на рецепторные (GP VI, P2Y₁, P2Y₁₂, TxA₂, PARs) и сигнальные механизмы активации тромбоцитов (TxA₂, 6-кето-простагландин F₁ α, внутриклеточный пул кальция, секреция АТФ).
6. Изучение влияние наиболее активного соединения на тромбогенный потенциал крови крыс в норме и при экспериментальной патологии, вызванной введением ЛПС.

Степень разработанности проблемы

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения. Ключевая роль в развитии указанной нозологии отводится процессам тромбообразования. Ведущим звеном в лечении и профилактике тромботических событий являются антиагрегантные средства. Однако, существующие на данный момент средства имеют ряд побочных эффектов (гастропатии, кровотечения, тромбоцитопении и др.), существенно осложняющих терапию. Кроме того, описаны случаи резистентности пациентов к антиагрегантным средствам, а также явления остаточной реактивности тромбоцитов, что способствует назначению двойной антитромбоцитарной терапии. Последнее существенно повышает риск кровотечений [Бойцов С.А., 2023; Домбровский М.М., 2018; Angiolillo D.J., 2021; Costa F., 2023; Smits P.C., 2022; Wang J., 2023; Xiong Y., 2020]. Рецепторный ландшафт тромбоцитов представлен множеством рецепторов к высокомолекулярным белкам и физиологическим агонистам, система вторичных мессенджеров включает физиологически разнообразную ферментативную систему [Khodadi E., 2020; vanderMeijden P.E.J., 2019]. Указанные компоненты могут являться потенциальными мишенями для поиска и создания новых антиагрегантных средств. Киназа GSK3B представляет особый интерес, как новая мишень для антитромбоцитарного воздействия, в отношении которой на данный момент нет средств в клинической практике [Liu D., 2015; Ma Q., 2019; Moore S.F., 2021; Ya F., 2021; Yang R.P., 2019].

Научная новизна исследования

В ряду новых производных 2-оксиндола впервые выявлены ингибиторы GSK3B, проявляющие антиагрегантную активность. Изучена антиагрегантная и антитромботическая активность наиболее активных соединений. Впервые показан эффект и терапевтический потенциал фармакологического ингибирования GSK-3b при различных тромботических состояниях. Проведена оценка острой токсичности соединения-лидера.

Научно-практическая значимость

Выявлено наиболее активное соединение К-167, проявляющее выраженные антиагрегантные и антитромбогенные свойства. Установлен механизм антиагрегантного действия соединения К-167. Показано, что новый класс производных 2-оксиндола может служить основой для поиска и создания на его основе новых высокоэффективных корректоров повышенного тромбогенного потенциала крови.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленных задач были использованы высокотехнологичные чувствительные методы исследования, имеющиеся в Волгоградском государственном медицинском университете. Объектом исследования явились новые производные 2-оксиндола. Эксперименты выполнены с использованием лабораторных животных: кролики породы Шиншилла (опыты *invitro*), нелинейные мыши- и крысы-самцы (опыты *exvivo* и *in vivo*), как виды, рекомендованные для изучения новых веществ, влияющих на систему гемостаза. Исследования выполнены согласно руководству по доклиническим исследованиям под редакцией А.Н. Миронова, а также 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».

Степень достоверности полученных результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом и качеством выполненных исследований, проведенных на кроликах, мышах и крысах-самцах. В контрольных и опытных группах количество проб (животных для опытов *exvivo* и *in vivo*) было достаточным для применения статистических методов обработки данных. В работе использованы расчеты среднего значения и стандартной ошибки среднего значения с применением встроенных функций ПО MSExcel 2020, методы регрессионного

анализа, критерии попарного и множественного сравнения данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Производные 2-оксиндола являются перспективными для разработки ингибиторов киназы GSK3b.
2. Соединение К-167 способствует выраженному снижению агрегации тромбоцитов *invitro* и *in vivo*.
3. Соединение К-167 по значению острой токсичности относится к 3 классу малотоксичных веществ. Соединение К-167 в микромолярных концентрациях ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами, а также обладает низкой цитотоксичностью.
4. Соединение К-167 проявляет выраженные антитромботические свойства на моделях артериального тромбоза, индуцированных хлоридом железа (III) и электрическим током, а также на модели тромбоза нижней полой вены. Производное 2-оксиндола К-167 способствует выраженному снижению тромбогенного потенциала крови в условиях экспериментального инфаркта миокарда и системной воспалительной реакции.
5. Антиагрегантное действие соединения К-167 сопровождается снижением уровня секретируемого тромбоксана, а также блокированием рецепторов к тромбоксану.

Личный вклад автора

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола. Автору принадлежит ведущая роль в проведении исследования на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XXVI и XXVII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 79, 80 и 81-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием, IX Международной научно-практической конференции, Пятигорск, International Conference on post-COVID Healthcare, Medical Research and Education, Malaysia.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, 2 из них в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, иллюстрирована

23

таблицами, 10 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VII), обсуждения результатов, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 12 отечественных и 179 иностранных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Существенным осложнением сердечно-сосудистых заболеваний, которое может привести к инфаркту миокарда, острому ишемическому инсульту или венозной тромбоэмболии, является тромбоз., возникающий внутри кровеносных сосудов и препятствующий нормальному кровотоку.

Исследования механизма образования тромбов в кровеносных сосудах открыли новые возможности для исследования состава тромбов, что может помочь в понимании механизмов заболевания и лежит в основе улучшения терапии [Alkarithi G., 2021]. Тромбы состоят из фибрина, эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Известно, что тромбоциты тромбоируются и гемостазируют с момента их открытия Биззоzero в 1880-х годах [Coller B.S., 2011].

Основными этапами внутрисосудистого тромбообразования являются адгезия, активация и агрегация тромбоцитов. Тромбоциты могут взаимодействовать друг с другом и с другими клетками посредством ряда биоактивных веществ, секретируемых их внутриклеточными гранулами [GolebiewskaEwelina M., 2015]. Помимо взаимодействия тромбоцитов с эндогенными веществами и адгезией посредством молекул фактора Виллебранда и коллагена, кровяные пластинки активно образуют агрегаты с другими форменными элементами крови (лейкоциты, нейтрофилы), а также взаимодействуют с компонентами иммунной системы.

Аспирин, клопидогрель и дипиридамол являются наиболее часто используемыми антитромбоцитарными препаратами во всем мире. Все они имеют убедительные доказательства предотвращения образования тромбов в кровеносных сосудах.

К сожалению, у части людей развивается резистентность к этим препаратам (ишемические явления при приеме антиагрегантов), побочные эффекты от лечения или аллергические реакции. При длительном профилактическом

применении комбинирование антиагрегантов связано с повышенным риском кровотечения, хотя этот повышенный риск часто уравнивается более низким риском повторного ишемического инсульта в ближайшем будущем [Kamarova M, 2022].

1.1. Социальная значимость проблемы тромбозов

Хотя тромбоз является прежде всего медицинской проблемой, он также имеет значительные социальные последствия, которые не следует недооценивать. Он может привести к инвалидности, снижению производительности труда и даже смерти. Кроме того, тромбозу подвержены не только пожилые люди; он может затронуть любого, независимо от возраста или пола. Действительно, исследования показывают, что молодые люди становятся все более уязвимыми из-за таких факторов, как малоподвижный образ жизни и неправильное питание. Значение тромбоза в обществе невозможно переоценить. Это оказывает влияние не только на отдельных людей, но и на их семьи и сообщества. Стоимость лечения тромбоза может быть непомерно высокой, создавая финансовую нагрузку на семьи и системы здравоохранения. В результате повышение осведомленности о тромбозе и его профилактике имеет решающее значение [Kamarova M., 2022].

Простые изменения образа жизни, такие как регулярные физические упражнения и здоровое питание, могут значительно снизить риск развития этого состояния. Мы можем улучшить свое общее состояние здоровья и самочувствие, одновременно снизив нагрузку на общество в целом, приняв активные меры по предотвращению тромбоза.

Одним из наиболее серьезных социальных последствий тромбоза является влияние, которое он может оказать на трудовую жизнь людей. Многие пациенты с тромбозом не могут работать в течение длительного периода времени, что приводит к финансовым трудностям и социальной изоляции. Фактически,

тромбоз является одной из основных причин невыхода на работу, что может усугубить социальные и экономические проблемы отдельных лиц и сообществ. Тромбоз может иметь серьезные последствия для психического и эмоционального здоровья людей, помимо влияния на их трудовую жизнь. Многие люди с тромбозом глубоких вен или другими видами тромбоза испытывают тревогу и депрессию из-за своего состояния. В результате люди могут стать еще более изолированными, что затрудняет им поиск помощи и поддержки. Наконец, тромбоз имеет серьезные социальные последствия для глобальных систем здравоохранения. Ожидается, что заболеваемость тромбозом будет расти по мере старения населения мира и перехода к малоподвижному образу жизни. Это ляжет значительным бременем на системы здравоохранения, которым необходимо будет инвестировать в новые технологии и методы лечения и профилактики тромбоза [ViraniS.S., 2023].

Подводя итог, можно сказать, что тромбоз — это сложное заболевание, имеющее серьезные социальные последствия для отдельных лиц, сообществ и систем здравоохранения во всем мире. Для решения этих проблем важно, чтобы поставщики медицинских услуг, политики и общественные организации работали вместе, чтобы повышать осведомленность о тромбозе, способствовать профилактике и раннему вмешательству, а также предоставлять поддержку и ресурсы людям, страдающим этим заболеванием. Таким образом, важной является задача уменьшения социальных последствий тромбоза путем оптимизации фармакологической поддержки и повышения качества жизни пациентов.

1.2. Образование тромбов

Свертывание крови — это механизм, с помощью которого высшие организмы останавливают кровотечение после повреждения сосуда. Быстрое

прекращение кровотока достигается сначала образованием гемостатической пробки за счет адгезии и агрегации тромбоцитов [KoltaiK., 2017].

За циркулирующими тромбоцитами следует формирование нерастворимой фибриновой сети. Активация тромбоцитов вызывает высвобождение многочисленных белков и малых молекул, которые ускоряют и увеличивают образование пробок тромбоцитов. Тромбоциты также усиливают реакции коагуляции, создавая каркас на поверхности своей мембраны, и они играют важную роль в процессах заживления ран и репарации. Фибринолитическая система удаляет фибриновый сгусток в процессе репарации [JensenM.S., 2013].

В норме сложные и динамичные процессы гемостаза и фибринолиза тщательно сбалансированы. Любые нарушения гемостатического или фибринолитического компонентов нарушают баланс, что приводит к чрезмерному кровотечению или тромбозу [Menegatti M., 2020].

1.2.1. Адгезия тромбоцитов

Тромбоциты предпочтительно циркулируют вблизи сосудистых стенок при физиологических условиях после повреждения сосудов [Tangelder G. J., 1985]. Однако они не взаимодействуют с эндотелиальными клетками, которые придают врожденную устойчивость к тромбозу. Когда непрерывность эндотелиального слоя нарушается и обнажается нижележащий субэндотелиальный матрикс, происходит скоординированная серия действий для закрытия дефекта, как показано на рисунке 1. Тромбоциты являются основными участниками этого процесса, и многочисленные субстраты могут опосредовать их прилипание к артериальной стенке в ответ на повреждение.

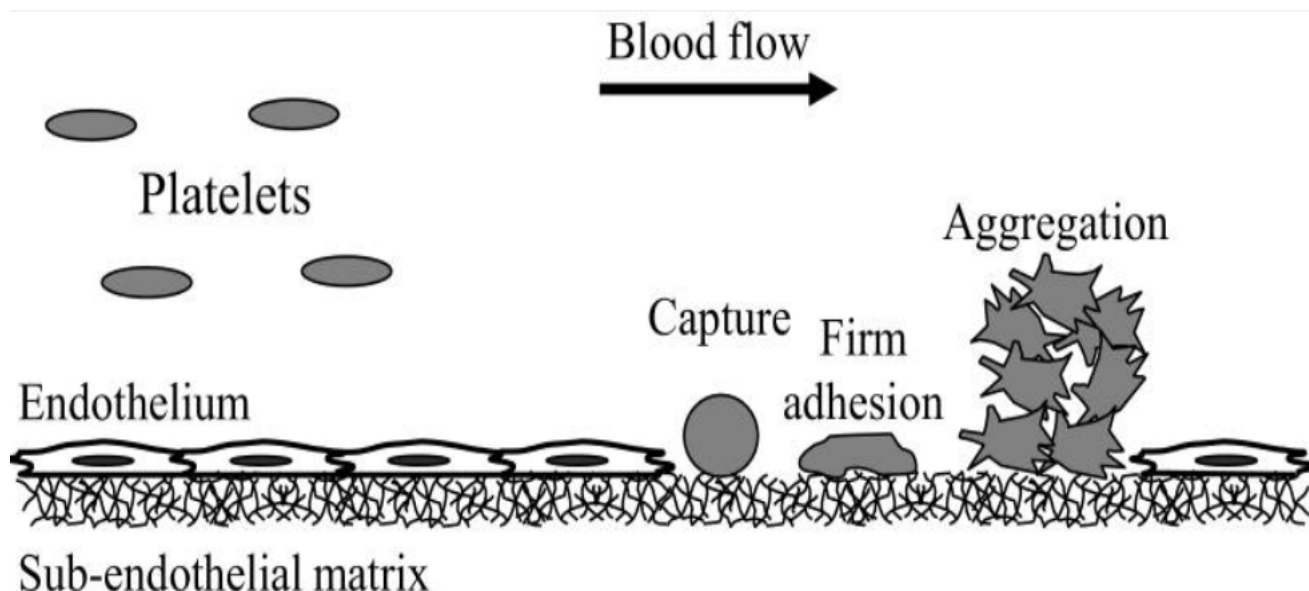


Рисунок 1. Последовательность стадий агрегации тромбоцитов[Chen, 2005].

На рис. 1 показана последовательность событий, связанных с взаимодействием тромбоцитов со стенками сосуда после их повреждения. Слева покоящиеся тромбоциты циркулируют в дискоидной форме; повреждение сосудов (описанное как оголение эндотелия) приводит к захвату тромбоцитов, твердой адгезии к субэндотелию и изменению формы тромбоцитов. Справа рекрутируется больше тромбоцитов (адгезия или агрегация тромбоцитов).

Взаимодействия между комплексом GP Ib -IX-V и доменом A1 фактора фон Виллебранда (vWF) в обнаженном субэндотелии являются важным первым шагом в адгезии тромбоцитов в месте повреждения [Chen, 2005]. vWF представляет собой мультимерный белок, генерируемый эндотелиальными клетками и мегакариоцитами; он обнаруживается в эндотелиальных клеточных структурах Вейбеля-Паладе, тромбоцитарных гранулах, в растворимой форме в плазме и в субэндотелиальном матриксе. В то время как кинетика этих взаимодействий варьируется в зависимости от гидродинамических условий, иммобилизованного фактора Виллебранда достаточно, чтобы индуцировать прикрепление тромбоцитов в потоке [Savage B., 1996]. Скорость сдвига, мера градиента скорости кровотока по отношению к расстоянию от артериальной

стенки, является основной движущей силой участия vWF в адгезии тромбоцитов [Liao S., 2018].

Скорость сдвига выражается в обратных секундах (с^{-1}) и является прямой функцией скорости кровотока и обратной функцией площади поперечного сечения. Исследования человеческой крови *ex vivo* показывают, что комплекс GPIb-vWF является основным адгезивным контактом, начинающим прикрепление тромбоцитов при высоких скоростях сдвига ($> 1000 \text{ с}^{-1}$), как это наблюдается в артериальных микрососудах или артериолах [Rumbaut Rolando E., 2004; Konstantinides S., 2006]. Более того, при значительном уменьшении площади поперечного сечения сосуда (что может происходить в результате тромбоза, атеросклеротической бляшки, вазоконстрикции и т. д.) скорость сдвига может значительно увеличиваться, а взаимодействия GPIb-vWF могут преобладать [Ruggeri Z. M., 2006].

В дополнение к своей роли в опосредовании взаимодействия тромбоцитов со стенками сосудов vWF также служит молекулой-носителем фактора свертывания крови VIII. Значимость vWF в гемостазе и тромбозе у людей иллюстрируется болезнью Виллебранда, группой нарушений свертываемости крови, характеризующихся различной степенью дефицита данного фактора [Laffan M., 2004].

Эндотелиальные клетки действуют как барьер между тромбоцитами в циркулирующей крови и различными формами коллагена, обнаруженными в субэндотелиальном матриксе [Farndale R. W., 2006]. Однако рецепторы тромбоцитов GPVI и $\alpha 2\beta 1$ нуждаются в захвате тромбоцитов, опосредованном взаимодействиями GPIb-vWF, для обеспечения взаимодействия с коллагеном. В условиях потока как GPVI, так и $\alpha 2\beta 1$ способствуют индуцированной коллагеном активации тромбоцитов, хотя точный порядок этих взаимодействий неизвестен. Исследования *ex vivo* на тромбоцитах человека, например, показывают, что раннее связывание комплекса GPIb с vWF вызывает конформационный сдвиг в субъединице рецептора коллагена $\alpha 2\beta 1$, повышая его сродство к коллагену и, таким образом, облегчая взаимодействие GPVI-коллаген [Perrella G., 2021].

Другие предполагают, что и GPVI, и $\alpha 2\beta 1$ играют важную совместную роль в опосредовании адгезии тромбоцитов в месте повреждения, при этом GPVI сначала передает сигналы, а затем активирует $\alpha 2\beta 1$ [Sarratt K. L. , 2005].

Другие субстраты, способные связываться с тромбоцитами и активировать их в субэндотелии, включают ламинин, тромбоспондин, фибронектин и витронектин. Эти субстраты могут связываться с ранее упомянутыми интегринами ($\alpha \text{IIb}\beta 3$ и $\alpha 2\beta 1$), а также с дополнительными интегринами $\beta 1$ и $\beta 3$ [Bennett J.S. 2009].

1.2.2. Механизм адгезии тромбоцитов к эндотелию

При отсутствии оголения и серьезных нарушений целостности эндотелия ряд воспалительных состояний может привести к адгезии тромбоцитов к эндотелиальным клеткам. Эти процессы могут быть вызваны ингибированием эндогенных систем, ограничивающих адгезию тромбоцитов, или усилением высвобождения эндотелием химических веществ, усиливающих адгезию тромбоцитов. Более того, некоторые из этих воспалительных ситуаций вызывают адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, в основном в посткапиллярных венулах микроциркуляторного русла, с наличием в этих местах лейкоцитарно-тромбоцитарной адгезии [Navarrete S., 2023].

Адгезия тромбоцитов к эндотелиальным клеткам была зарегистрирована экспериментально при ряде воспалительных состояний, включая ишемически/реперфузионное повреждение, воздействие эндотоксина, серповидно-клеточную анемию и гиперхолестеринемию, среди прочих [Taylor A., 2005].

Некоторые воспалительные заболевания связаны с активацией эндотелия и высвобождением Р-селектина из гранул, называемых тельцами Вейбеля-Паладе. Воздействие Р-селектина на поверхность эндотелия может увеличить адгезию

тромбоцитов за счет связывания с комплексом GPIb на тромбоцитах. В экспериментальных моделях серповидно-клеточной анемии и эндотоксемии этот путь, по-видимому, опосредует адгезию тромбоцитов [Wood Katherine C., 2004].

P-селектин эндотелиальных клеток также способствует начальным транзиторным контактам лейкоцитов с эндотелиальными клетками (перекатыванию), что происходит до их стабильного прикрепления к эндотелию. Лиганд-1 гликопротеина P-селектина (PSGL-1) представляет собой противолиганд лейкоцитов. Адгезия тромбоцитов к эндотелию при различных воспалительных ситуациях в значительной степени зависит от адгезии лейкоцитов, поскольку адгезия тромбоцитов предотвращается истощением циркулирующих нейтрофилов. Ишемия/реперфузионное повреждение, эндотоксемия, гиперхолестеринемия и повреждение глазных ран связаны с лейкоцитозависимой адгезией тромбоцитов [Cooper D., 2004; Tailor A., 2005].

Тромбоцитарный P-селектин-лейкоцит PSGL-1 является вероятным медиатором адгезивных взаимодействий тромбоцитов и лейкоцитов. Однако было предложено несколько других механизмов, опосредующих эти взаимодействия, в том числе тромбоцитарный GPIb α -лейкоцитарный CD11b/CD18, молекула межклеточной адгезии тромбоцитов-2 (ICAM-2)-лейкоцитарно-лимфоцитарная функция-ассоциированный антиген-1 (LFA-1) и тромбоцитарный антиген-1, соединительная молекула адгезии-3 (JAM-3) и лейкоцитарный макрофагальный антиген-1 (Mac-1) [Simon D.I., 2000].

Эти данные указывают на сложную взаимозависимость между адгезией тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию при воспалении, которая все еще изучается.

Эндотелиальный vWF также хранится в тельцах Вейбеля-Паладе и высвобождается в ответ на те же стимулы, которые вызывают высвобождение эндотелиального P-селектина. Недавно выпущенный тип vWF, также известный как сверхбольшой (UL) vWF, крупнее и липче, чем vWF, обнаруженный в плазме. ADAMTS-13, металлопротеаза плазмы, обычно расщепляет эту мультимерную форму [Dong J.F., 2005].

P-селектин связывает ULVWF с поверхностью эндотелия и усиливает адгезию тромбоцитов посредством взаимодействия с комплексом GPIb на тромбоцитах [Padilla A., 2004]. В отсутствие расщепления мультимеры ULVWF образуют длинные нитевидные структуры с видом «бусины на нитке», которые облегчают прикрепление тромбоцитов [Simon D.I., 2000].

Дефицит ADAMTS-13 был связан с несколькими клиническими случаями тяжелого тромбоза, включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру [Moake J.L., 2002] и тяжелые инфекции [Ono T., 2006].

ADAMTS-13 и vWF могут быть потенциальными терапевтическими мишенями при тромбозах, вызванных воспалением [Chauhan A. K., 2008].

Другим предполагаемым механизмом адгезии тромбоцитов к эндотелию при воспалении является тромбоцитарный GPIIb /IIIa посредством его известного взаимодействия с фибриногеном [Savage B., 1996]. В экспериментальной модели ишемически-реперфузионного повреждения GPIIb /IIIa тромбоцитов опосредует адгезию тромбоцитов к фибриногену, отложившемуся на поверхности эндотелия. В этих моделях фибриноген связывается с эндотелием через молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) на поверхности воспаленных эндотелиальных клеток [Khandoga A., 2002].

1.2.3. Скопление тромбоцитов

Агрегация включает адгезию тромбоцитов к тромбоцитам и необходима для эффективного гемостаза после прилипания их к месту повреждения. Тромбоциты активируются после адгезии различными агонистами, включая аденозиндифосфат (АДФ) и коллаген, обнаруживаемый в областях повреждения сосудов. Эти агонисты действуют путем прикрепления к определенным рецепторам на поверхности тромбоцитов. Присутствие этих рецепторов вызывает каскад последующих действий, которые в конечном итоге повышают

внутрицитоплазматическую концентрацию ионов кальция. Внутриклеточный кальций тромбоцитов увеличивается за счет притока через плазматическую мембрану и высвобождения из внутриклеточных запасов [Varga- Szabo D., 2009].

Рецепторы, связанные с G-белками, такие как $P2Y_1$, $P2Y_{12}$, тромбоксановые и PARs-рецепторы активируют фосфолипазу $C\beta$ ($PLC\beta$), тогда как рецепторы, действующие через нереперторные тирозинкиназные пути, такие как рецептор коллагена $GpVI$, преимущественно активируют фосфолипазу $C\gamma$ ($PLC\gamma$) [Varga- Szabo D., 2008].

При активации $PLC\beta$ или $PLC\gamma$ образуются два вторичных мессенджера: диацилглицерин (DAG) и инозитолтрифосфат (IP3). Приток кальция опосредован DAG, тогда как кальций из внутриклеточных резервов высвобождается IP3. Более того, некоторые взаимодействия, такие как связывание АТФ с лиганд-управляемым рецептором ионного канала $P2X_1$, могут напрямую запускать приток кальция из внеклеточного пространства [Miyagappan, S., 2004].

Увеличение концентрации свободного кальция в тромбоцитах приводит к ряду структурных и функциональных изменений тромбоцитов. Тромбоцит претерпевает глубокую морфологическую трансформацию из диска в шиповидную сферу (процесс, называемый изменением формы). Гранулы тромбоцитов централизуются, а их содержимое опорожняется в просвет открытой канальцевой системы, где в конечном итоге высвобождается наружу. Повышение уровня кальция в тромбоцитах повышает активность мембранной фосфолипазы $A2$, которая высвобождает арахидоновую кислоту из мембранных фосфолипидов. Фермент циклооксигеназа 1 (ЦОГ-1) превращает арахидоновую кислоту в промежуточный продукт простагландин $H2$ ($PGH2$). Тромбоксансинтаза далее метаболизирует $PGH2$ в $TXA2$ [Gryglewski R., 2008].

$TXA2$ является мощным активатором тромбоцитов. Длинные выступы мембраны, вызванные реакцией изменения формы, позволяют тромбоцитам взаимодействовать друг с другом с образованием агрегатов. Изменение формы опосредовано цитоскелетом тромбоцитов, состоящим из организованной сети

микротрубочек и актиновых филаментов и ряда ассоциированных белков, связанных с различными сигнальными молекулами тромбоцитов.

Основной молекулой адгезии, участвующей в агрегации тромбоцитов, является мембранный белок, комплекс GPIIb /IIIa. GPIIb /IIIa представляет собой интегриновый рецептор, присутствующий в высокой плотности на тромбоцитах, как на плазматической мембране, так и на α -гранулах [Midoh N., 2010]]. Он существует в неактивной форме в покоящихся тромбоцитах. Активация тромбоцитов почти всеми агонистами индуцирует конформационные изменения («передача сигналов наизнанку») GPIIb /IIIa, которые становятся способными связывать растворимый фибриноген плазмы. В свою очередь, связывание лиганда GPIIb /IIIa приводит к конформационным изменениям, направленным в цитоплазму («передача сигналов снаружи-внутри»). Точная последовательность событий, ведущих к этим сигнальным событиям, полностью не выяснена [Ma Y. Q., 2007; Shattil SJ., 2004].

Тем не менее, связанный с рецептором фибриноген действует как мостик между двумя молекулами GPIIb /IIIa на соседних тромбоцитах [Varga-Szabo D., 2008]. Это последний общий путь агрегации тромбоцитов, индуцированный химическими агонистами. Однако vWF заменяет фибриноген в качестве мостиковой молекулы между GPIIb /IIIa для агрегации тромбоцитов, индуцированной условиями высокого сдвига, хотя агрегация тромбоцитов при более низком сдвиге опосредуется связыванием фибриногена с GPIIb /IIIa [Goto S., 1998].

Активированные тромбоциты привлекают новые тромбоциты к развивающейся гемостатической пробке посредством многочисленных петель усиления обратной связи: они высвобождают агонисты тромбоцитов (такие как АДФ и серотонин, хранящиеся в гранулах) и синтезируют *de novo* проагрегантный TXA₂. Высвобождение АДФ и TXA₂ помогает поддерживать рекрутинг циркулирующих тромбоцитов, стимулируя присоединение их большего количества к гемостатической пробке, образовавшейся в местах повреждения сосудов. Наконец, тромбоциты важны для вторичного гемостаза,

поскольку они обеспечивают высокоэффективную каталитическую поверхность для активации каскада коагуляции. Активированные тромбоциты служат сайтами связывания ферментов и кофакторов системы свертывания крови, которые впоследствии эффективно продуцируют тромбин, мощный агонист тромбоцитов [Rumbaut R. E., 2010].

1.3. Фармакологическая коррекция нарушений системы гемостаза

В настоящее время доступно несколько лекарств, которые могут подавлять активность тромбоцитов с помощью различных механизмов действия. Все эти препараты подразделяются на многочисленные классы на основе принципов доказательной медицины с учетом эффективности и возникновения побочных эффектов.

Антитромбоцитарные препараты классифицируются как пероральные и парентеральные [Iqbal A. M., 2022]. Пероральные агенты далее дифференцируются в зависимости от их механизма действия:

Наиболее часто используемым пероральным антитромбоцитарным препаратом является ацетилсалициловая кислота. Он действует путем необратимого ингибирования активности фермента циклооксигеназы в пути производства простагландинов (PGH₂). Тромбоксан A₂ и PGI₂ являются предшественниками этого простагландина. Тромбоксан A₂ стимулирует агрегацию тромбоцитов и вазоконстрикцию [Rucker D., 2022], а ЦОГ1 опосредует его синтез, тогда как PGI₂ ингибирует агрегацию тромбоцитов и вызывает вазодилатацию, а ЦОГ2 опосредует его продукцию. Низкие дозы аспирина (от 75 мг до 150 мг) могут полностью или почти полностью ингибировать ЦОГ1, тем самым ингибируя синтез TXA₂, хотя для ингибирования ЦОГ2 необходимы более высокие дозы [Warner T. D., 2011].

Тиенопиридины ингибируют агрегацию тромбоцитов в ответ на аденозиндифосфат (АДФ) [Cattaneo M., 2011]. Эти лекарства превращаются в активные вещества системой CYP450 печени, которая может необратимо блокировать рецептор тромбоцитов P2Y₁₂.

Прасугрел является самым мощным из этих препаратов, он имеет самое быстрое начало действия и превосходит клопидогрел у пациентов со стентированием коронарных артерий [Galli M., 2022].

Тиклопидин больше не используется из-за гепатотоксичности [Previtera A. M., 2010]. Тикагрелор — новый обратимый антагонист рецепторов P2Y₁₂ с быстрым началом действия. По сравнению с клопидогрелем достигается значительный уровень ингибирования тромбоцитов [Kubica J., 2014].

Ингибиторы гликопротеинов тромбоцитов, которые часто используются при остром коронарном синдроме, блокируют рецепторы гликопротеинов IIb/IIIa (GpIIb -IIIa) на тромбоцитах, уменьшая их агрегацию. Поскольку эти препараты доступны только внутривенно, их вводят только для краткосрочного лечения [Hashemzadeh M., 2008].

Ворапаксар ингибирует опосредованную тромбином активацию клеток и тромбоцитов мощным, селективным и обратимым образом посредством активации рецепторов PAR-1, но его применение связано с усилением кровотечения [Morrison J, T., 2022].

Дипиридамол обладает антиагрегантным и сосудорасширяющим действием, а также способностью ингибировать фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов тромбоцитов [Allahham M., 2022]. Этот фермент превращает аденозинмонофосфат (АМФ) в 5'АМФ, который способствует накоплению циклического АМФ внутри тромбоцитов и ингибирует их агрегацию. Он также предотвращает поглощение тромбоцитами аденозина, который повышает уровень циклического АМФ.

Цилостазол также обладает сосудорасширяющим, антитромбоцитарным и антипролиферативным действием. Он также ингибирует гиперпролиферацию гладкомышечных клеток и гиперплазию интимы после повреждения эндотелия [GotoS., 2005].

В процессе совершенствования антиагрегантной терапии в настоящее время признано, что комбинация блокаторов рецепторов АДФ-P2Y₁₂, таких как клопидогрел, прасугрел или тикагрелор, с аспирином еще больше снижает риск острых тромботических событий [Wiviott S. D., 2007; Wallentin L., 2009].

При оценке изолированных тромбоцитов добавление аспирина к тяжелой блокаде P2Y₁₂ может привести к минимальному дальнейшему подавлению активности тромбоцитов.

Антагонисты P2Y₁₂ подавляют не только АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, но и пути активации тромбоцитов TXA₂ [Armstrong P.C.J., 2011].

Ингибирование ЦОГ во всем организме повышает риск тромбоза, поскольку аспирин ингибирует ЦОГ в других местах, помимо тромбоцитов. Снижение выработки PGI₂ в сосудах, например, может уменьшить цАМФ тромбоцитов, повысить их реактивность и, следовательно, увеличить риск тромбоза. Усиленное ингибирование тромбоцитов аспирином, наряду с мощной блокадой рецептора P2Y₁₂, может быть недостаточным для противодействия этому тромботическому эффекту [Dawson J., 2022].

Аспирин также увеличивает риск кровотечения, особенно в желудочно-кишечном тракте, повышает кровяное давление и способствует задержке жидкости, что вызывает дополнительные опасения по поводу общей терапевтической ценности комбинации аспирина с мощными блокаторами P2Y₁₂ третьего поколения.

Блокада P2Y₁₂-рецепторов также повышает чувствительность тромбоцитов к ингибирующим эффектам PGI₂ [Cattaneo M., 2007] и NO [Kirkby N. S., 2013]. Это указывает на то, что активация P2Y₁₂ уменьшает ингибирующие эффекты сигнальных путей циклических нуклеотидов внутри тромбоцитов; любая активация P2Y₁₂ значительно повышает возбудимость тромбоцитов. Когда рецептор P2Y₁₂ подавлен, высвобождение аденилатциклазы, эффекты PGI₂ и NO, действующие через сигнальные пути цАМФ и цГМФ, не ингибируются, и, следовательно, их ингибирующее действие усиливается по сравнению с неингибированным рецептором P2Y₁₂. Поскольку PGI₂ и NO обладают

синергетическим ингибирующим действием на тромбоциты, их сочетание с блокаторами рецепторов P2Y₁₂ приводит к значительному трехстороннему синергетическому эффекту [Chan M. V., 2016].

Как отмечалось ранее, ДАТТ с аспирином и антагонистами рецепторов P2Y₁₂ является краеугольным камнем терапии артериального тромбоза; тем не менее, у 10% пациентов с ОКС сохраняются рецидивирующие тромботические эпизоды, а ДАТТ увеличивает риск кровотечения. Большая эффективность этих методов будет перевешиваться повышенным риском кровотечения [McFadyen J. D., 2018; Schaff M., 2013]. Важно отметить, что появляются различия между свертыванием крови и тромбозом. Эксперименты *in vivo* выявили иерархическую структуру внутри растущих тромбов, которая была определена как состоящая из двух разных областей:

ядро коагуляции, состоящее из плотно упакованных, полностью активированных тромбоцитов, представляющих первичный участок отложения фибрина, который сильно зависит от активности АДФ, ТХА₂ и тромбина; и внешняя кора, диссеминированный тромб, содержащий, напротив, рыхло упакованные тромбоциты, которые находятся в состоянии пониженной активации, регулируемой различными механизмами, такими как PI3K, активация PDI и передача сигналов P_{2b}, что делает эти тромбоциты устойчивыми [Stalker T. J., 2013].

Благодаря этим расширенным знаниям можно будет изменить коагуляцию, не нанося ей вреда.

Поскольку тромбин – одна из основных причин образования сгустка, он является важной мишенью для антитромботической терапии. Такая терапия направлена против событий, которые приводят к активации самого тромбина и рецепторов тромбина.

Прямые ингибиторы фактора Ха предотвращают превращение протромбина в тромбин под действием фактора Ха. Добавление ривароксабана, ингибитора фактора Ха, к ДАТТ приводит к значительному снижению смертности от

сердечно-сосудистых заболеваний за счет увеличения кровотечения [Mega J., 2009].

В дополнение к хорошо известным мишеням, о которых сообщалось ранее, таким как рецепторы ЦОГ-1, P2Y₁₂ и тромбин, новые исследования выявили широкий спектр терапевтических мишеней тромбоцитов. Ингибирующие токсины, антитела, миметики лигандов, аптамеры на основе нуклеотидов и растворимые рекомбинантные формы рецепторов находятся в стадии разработки в качестве средств модулирования путей адгезии, опосредованных GPVI, адгезивной функции и передачи сигналов GPIIb-III-V, α IIb β 3, фосфатидилинозитол-3-киназы-бета (P13Kbeta) и активации протеиндисульфид-изомеразы [Boncler M., 2023].

Также было показано, что семейство тиолизомераз протеиндисульфидизомеразы (PDI) имеют решающее значение для образования тромбов и высвобождаются из активированных тромбоцитов и эндотелиальных клеток в областях повреждения сосудов. Важно отметить, что ингибирование PDI предотвращает развитие тромбоцитарного тромба и продукцию фибрина [Furie B., 2014].

Поскольку ингибирование PDI антителами или низкомолекулярными ингибиторами предотвращает образование тромбов, были предприняты попытки получить ингибиторы PDI [Flaumenhaft R., 2015]. Изокверцетин, флавоноид кверцетин, и ML359 являются двумя ингибиторами PDI, которые продемонстрировали многообещающие результаты в исследованиях вен и атеротромбоза.

В настоящее время разрабатываются инновационные подходы к нацеливанию на α IIb β 3. Это наиболее распространенный рецептор тромбоцитов, активируемый передачей сигналов «изнутри наружу» и имеющий несколько лигандов, отличных от фибриногена и фактора Виллебранда . [Reheman и др., 2005].

Доступные в настоящее время ингибиторы α IIb β 3 (абциксимаб, эпитифибатид и тирофибан) снижают ИМ и смертность, но связаны со

значительным кровотечением. На ранних этапах исследований находятся такие препараты, как RUC-4, который препятствует связыванию Mg^{2+} с $\alpha IIb\beta 3$ [Li J., 2014], и методы лечения, нацеленные исключительно на активный $\alpha IIb\beta 3$, такие как scFvSCE5, активатор урокиназы плазминогена, слитый с антителом, которое преимущественно связывается с активированным $\alpha IIb\beta 3$ [Fuentes R.E., 2015].

Несколько членов семейства интегринов, в том числе $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 6\beta 1$ (основной рецептор ламинина) [Schaff M., 2013] также исследуются в качестве потенциальных антитромбоцитарных мишеней.

Наконец, учитывая большое разнообразие рецепторов тромбоцитов, которые, как было показано, играют роль в образовании тромбов и регуляции других функций тромбоцитов, рассматривается несколько дополнительных мишеней, которые могут включать антагонисты CD40/CD40L, P-селектин/PSGL-1, Toll-подобные рецепторы и GLP-1R [Cameron-Vendrig A., 2016] и ингибиторы сигнальных молекул Syk [Stegner D., 2014] и БТК [Kamel S., 2015], даже несмотря на то, что все еще существует риск увеличения кровотечения.

Хотя эти лекарства полезны для снижения риска сердечного приступа и инсульта, они не лишены недостатков.

Опасность кровотечения является существенным недостатком антитромбоцитарных препаратов. Эти лекарства могут вызывать сильное кровотечение, особенно при использовании с другими лекарствами, такими как препараты для разжижения крови или нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) [Abraham N. S., 2022].

Это может привести к серьезным проблемам и, в редких случаях, к смерти.

Другим недостатком является возможность лекарственного взаимодействия [Zhou Q., 2015].

Антитромбоцитарные препараты могут взаимодействовать с другими лекарствами, например, с теми, которые используются для лечения высокого артериального давления или диабета. Это может иметь негативные последствия и снизить эффективность обоих препаратов.

Наконец, длительное применение антитромбоцитарных препаратов может увеличить риск желудочно-кишечных проблем, таких как язва желудка и кровотечение [Østergaard K., 2012].

Поэтому существует потребность в новых антитромбоцитарных препаратах, способных эффективно ингибировать активацию тромбоцитов, не вызывая побочных эффектов. Исследования по разработке таких лекарств уже дали многообещающие результаты, и в настоящее время тестируются несколько потенциальных кандидатов.

Таким образом, потребность в новых антитромбоцитарных препаратах проистекает из ограничений существующих препаратов и растущей распространенности тромботических явлений во всем мире. Разработка эффективной и безопасной антитромбоцитарной терапии не только улучшит результаты лечения пациентов, но и снизит затраты на здравоохранение, связанные с осложнениями этих состояний.

1.4. GSK-3 β в процессах тромбообразования

GSK-3 β , или киназа гликогенсинтазы 3 бета, представляет собой протеинкиназу, которая играет важную роль в различных физиологических процессах, таких как клеточная пролиферация, дифференцировка и апоптоз [Li D., 2008]. Недавние исследования показали, что GSK-3 β также играет значительную роль в процессе тромбообразования при различных сердечно-сосудистых заболеваниях. Активация тромбоцитов является важным этапом в инициации тромбообразования. Было обнаружено, что GSK-3 β участвует в активации тромбоцитов, регулируя экспрессию и активность различных сигнальных молекул [Moore S., 2021].

Кроме того, было показано, что GSK-3 β влияет на каскад коагуляции, регулируя такие факторы, как тканевой фактор и фактор фон Виллебранда [Mooge S., 2013].

Путь PI3k/Akt является критическим сигнальным путем, который играет одну из ключевых ролей в активации тромбоцитов [O'Brien K. A., 2011].

Когда кровеносные сосуды повреждаются, тромбоциты активируются, образуя сгусток, который предотвращает чрезмерное кровотечение. Путь PI3k/Akt активируется несколькими агонистами, включая тромбин и коллаген, которые стимулируют активацию рецепторов на поверхности тромбоцитов. После активации путь PI3k/Akt инициирует каскад событий, которые приводят к изменению формы тромбоцитов, секреции гранул и агрегации [Chen Z., 2019].

Akt фосфорилирует несколько нижестоящих мишеней, участвующих в перестройке цитоскелета и высвобождении гранул. Исходя из этого, поиск новых антиагрегантов с GSK-3 β -ингибирующей активностью является интересной и актуальной задачей.

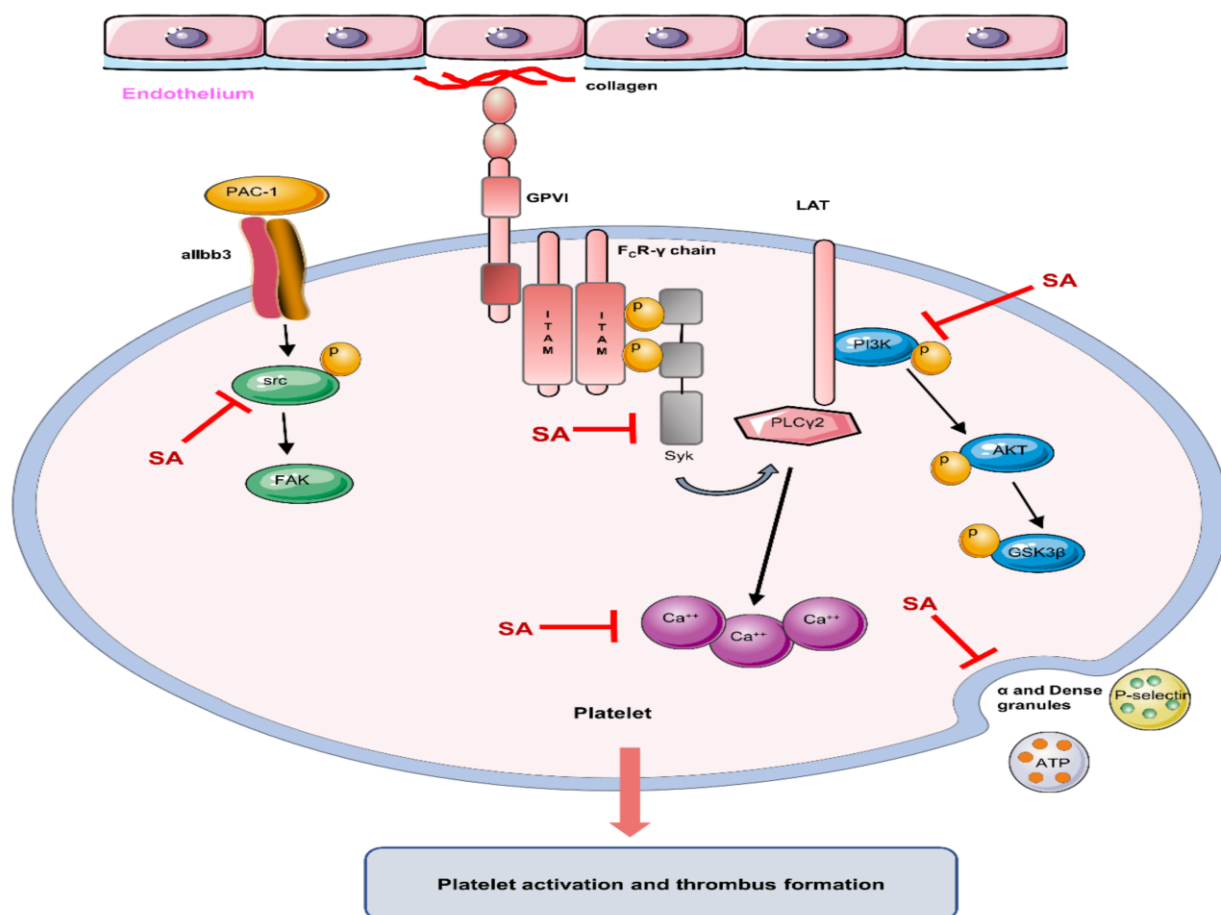


Рисунок 2. Роль киназы GSK3 β в регуляции функциональной активности тромбоцитов [Chen Z., 2019].

1.5. Фармакологическая активность производных 2-оксиндола

Было продемонстрировано, что оксиндол является фармакологически полезным каркасом с несколькими биологическими свойствами, важными для медицинской химии [Eremeev R.O., 2023; Khetmalis Y.M., 2021; Wei C., 2023].

Спектр фармакологической активности производных 2-оксиндола можно объяснить наличием различных функциональных групп и заместителей в исходной молекуле.

Было продемонстрировано, что многие производные оксиндола проявляют противораковое [Dey P., 2020], антибактериальное, ингибирующее глюкозидазу [Jin B., 2022], противовирусное [Ye N., 2016], противолейшманиальное [Khetmalis Y. M., 2021], противотуберкулезное, антиоксидантное [Midoh N., 2010], ингибирующее тирозиназу [Suthar S. K., 2017], ингибирующее PAK4, противоревматоидное действие, а также способность к снижению внутриглазного давления, и это лишь некоторые из них [Khetmalis Y. M., 2021].

Исследования показали, что производные 2-оксиндола могут ингибировать агрегацию тромбоцитов, влияя на различные сигнальные пути, участвующие в активации тромбоцитов. Было также обнаружено, что эти соединения оказывают другие полезные эффекты на сердечно-сосудистую систему, такие как уменьшение воспаления и улучшение функции эндотелия. Несколько производных 2-оксиндола были разработаны в качестве потенциальных антиагрегантов, в том числе N-ацилгидразоны (Рис.2), которые ингибируют агрегацию тромбоцитов путем модуляции ферментов каскада арахидоновой кислоты.[Mirfazli S. S., 2014].

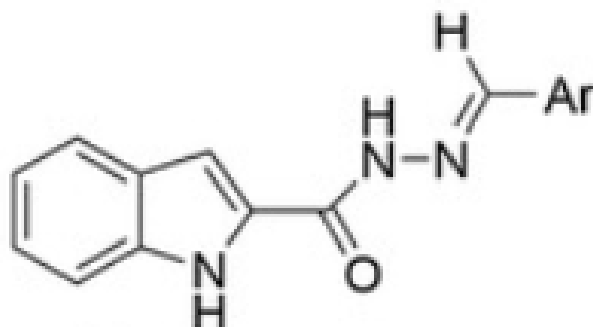


Рисунок 3. Химическая формула производных N- ацилгидразона.

Ринхофиллин (рис. 3), также другое производное, заметно ингибирует агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную АДФ или тромбином, возможно, путем подавления притока Ca^{2+} и повышения уровня цитоплазматического свободного кальция в тромбоцитах [Chen С. Х., 1992].

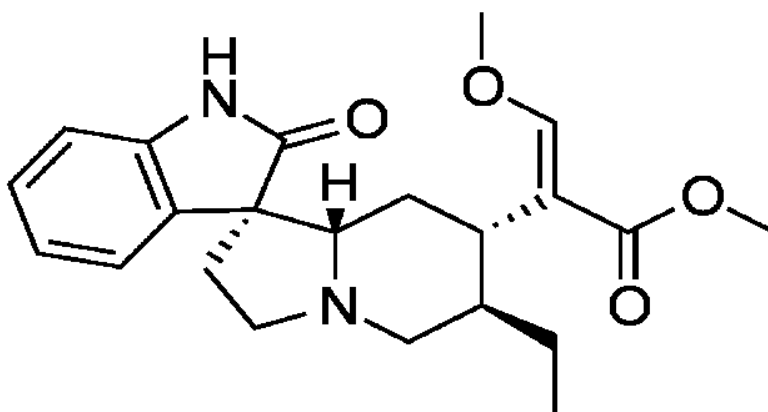


Рисунок 4. Химическая формула соединения Ринхофиллин.

Согласно литературным данным, некоторые производные 2-оксиндола (рис. 5), ингибирующие активность фермента GSK-3 β , являются перспективными для поиска и создания новых антитромбоцитарных препаратов [Czeleń P., 2021].

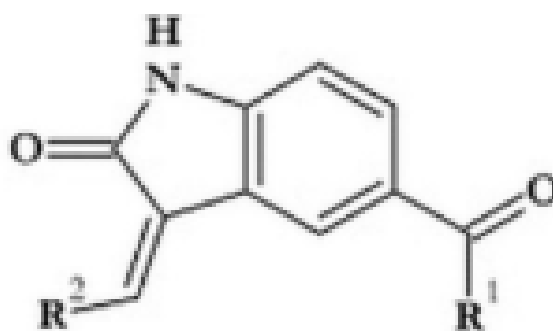


Рисунок 5. Оксиндольное ядро, используемое при создании лигандов.

В настоящее время для лечения тромбоза используются антитромбоцитарные препараты. Большинство лекарств блокируют активацию тромбоцитов и снижают риск образования тромбов. С другой стороны, антитромботическое лечение сопряжено с риском кровотечений, которые необходимо тщательно контролировать.

Понимание роли GSK-3 β в воспалении и агрегации тромбоцитов позволяет по-новому взглянуть на патофизиологию заболевания. Дальнейшее изучение этого фермента может привести к разработке новых методов лечения, которые помогут облегчить симптомы и улучшить результаты лечения пациентов.

Оксиндолы недавно привлекли внимание как возможные антитромбоцитарные препараты, способные ингибировать фермент GSK-3 β . Из-за этих характеристик они являются перспективным вариантом для создания новых антитромбоцитарных препаратов, которые могли бы устранить ограничения современной терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было исследовано 20 новых соединений, относящихся к химическому классу производных 2-оксиндола.

Данные соединения синтезированы в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза под руководством к.х.н. Н.А. Лозинской.

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 обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

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

2.1. Определение активности киназы гликогенсинтазы типа 3 β (GSK-3 β)

invitro

Активность GSK3 β (человеческая активная рекомбинантная) определяли биолюминесцентным методом с помощью набора ADP-GloTM Kinase Assay (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили при 27 °C в 96-луночном белом планшете с плоским дном (Greiner Lumitrac 655074, США) в конечном инкубируемом объеме 25 мкл. Инкубационная смесь содержала 5 нг GSK3 β , 0,2 мкг/мл субстрата GSK3 β YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(pS)EDEEE, полученного из человеческой мышечной гликогенсинтазы типа 1 (аминокислоты 636–661) и 25 мкМ АТФ в буферном растворе, содержащем 40 мМ Трис-HCl (pH 7,50), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл БСА, 50 мкМ ДТТ. Тестируемые соединения вносили в 1,25% растворе ДМСО и инкубировали в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 60 мин. Измерение люминесценции проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия), время интегрирования 1000 мс. В качестве положительного контроля использовали экспериментальный ингибитор GSK3 β 3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)-1*H*-пиррол-2,5-дион (SB-216763, >98% по ВЭЖХ, Sigma, США) [Lozinskaya N.A., 2019 г.].

2.2. Изучение влияния производных 2-оксиндола на функциональную активность тромбоцитов *invitro*

Для проведения исследований *in vitro* выбраны половозрелые кролики-самцы породы Шиншилла, а для проведения исследований *in vivo* – 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. Исследования *invitro* проводились на богатой тромбоцитами плазме кроликов с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов Биола АЛАТ-2 (Россия). Для получения богатой тромбоцитами плазмы кроликов проводили забор цельной крови из ушной краевой вены кроликов в пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия цитрата. Далее кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин на центрифуге MultiCentrifuge CM 6M (Elmi, Латвия). Все исследованные соединения растворялись в дистиллированной воде. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота растворялась в 30 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим добавлением дистиллированной воды до необходимого объема. Исследуемые соединения и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота были изучены в диапазоне концентраций 100,0-1,0 мкМ. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ (Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкМ. В основе данной методики лежит оптический метод детекции степени изменения светопропускания плазмы богатой тромбоцитами (PRP), при добавлении веществ, стимулирующих процессы агрегации (в условиях постоянного перемешивания). Обязательным условием для протекания процессов агрегации является механическое перемешивание плазмы при 800 об./мин, которое проводится с помощью магнитной мешалки, прилагаемой к агрегометру.

Для получения контрольной пробы в стеклянную кювету агрегометра вносится 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы с магнитной мешалкой и после включения записи агрегатограммы, на 10 секунде регистрации процесса в кювету добавляется индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 5мкМ [KwonH.W., 2016].

Для изучения антиагрегантной активности исследуемых соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляется 10 мкл раствора тестируемого образца в определенной концентрации. Проба инкубируется в специализированной ячейке агрегометра при поддержании постоянной температуры 37°C в течение 5 минут, после чего пробу переносят в

регистрирующую ячейку и производят запись агрегатограммы. На 10 секунде процесса в кювету добавляется индуктор агрегации АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Запись агрегатограммы производится в течение 5 минут, при перемешивании пробы магнитной мешалкой (800 об/мин). Так же, в другой кювете исследуют активность остальных тестируемых образцов.

При регистрации процесса агрегации тромбоцитов получали кривые, отражающие нарастание светопропускания опытной пробы. Степень агрегации оценивали по величине амплитуды агрегатограммы на 5 минуте процесса. Расчёт ингибирующего влияния на агрегацию тромбоцитов (ИнАТ) изучаемых соединений проводили по формуле:

$$\text{ИнАТ} = 100 - (B/A) \times 100\%, \text{ где}$$

А-степень агрегации тромбоцитов крови кроликов без изучаемых соединений;
В-степень агрегации тромбоцитов после инкубации плазмы богатой тромбоцитами с изучаемыми соединениями.

Для веществ с наиболее высокой антиагрегантной активностью и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты рассчитывали величину IC_{50} (концентрация, ингибирующая агрегацию тромбоцитов на 50%).

2.3. Исследования на первичных перитонеальных макрофагах

2.3.1. Выделение перитонеальных макрофагов

Перитонеальные макрофаги (ПМ) выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей. Для аккумуляции ПМ внутрибрюшинно вводили 1

мл 3% раствора пептона. Через 2 часа (для нейтрофилов) или 3 суток (для макрофагов) мышей подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией. Клетки перитонеального экссудата получали, асептически промывая брюшную полость 5 мл стерильного раствора Хенкса (+4-6 °C) без ионов кальция и магния. Подсчет общего количества клеток и оценку их жизнеспособности проводили в счетной камере Горяева (Россия) окраской 0,4% трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Доля живых клеток превышала 95%. Концентрацию клеток доводили до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной питательной среде DMEM (Gibco), дополненной 2 mM L-глутамина (Gibco), 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (BioClot, Германия), с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco). Высевали 200 мкл/лунку в 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея). Оставляли на 2 ч. при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, после чего лунки промывали для удаления неадгезивных клеток. После 24 часов инкубации отбирали 20 мкл супернатанта и вносили 20 мкл растворов тестируемых веществ.

2.3.2. Выделение моноцитов периферической крови

Кровь была взята у доноров-людей для выделения мононуклеарных клеток периферической крови после подписания информированного согласия. Около 20 мл крови было собрано путем венопункции от здоровых, некурящих, молодых взрослых доноров в стерильные пробирки, содержащие гепарин. Кровь разбавляли равным объемом фосфатно-буферного физиологического раствора (PBS), осторожно перемешивали путем инверсии и наслаивали на 5 мл Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, США) в пластиковых пробирках объемом 15 мл [38]. Содержимое пробирок центрифугировали при 2000 об./мин. в течение 30 мин. при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли и отбрасывали, а слой мононуклеарных клеток собирали, переносили в другие

пробирки объемом 15 мл и трижды промывали PBS центрифугированием при 1000 об./мин. в течение 10 мин. при комнатной температуре. Супернатант отбрасывали, а гранулированные клетки ресуспендировали в 1,0 мл модифицированной среды Eagle's Medium от Dulbecco (DMEM, Gibco, Великобритания). Для подсчета клеток и оценки жизнеспособности клеток использовали гемоцитометр. Жизнеспособность клеток >95% определяли с помощью 0,4% трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию клеток доводили до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде DMEM (Gibco) с добавлением 2 мм L-глутамина (Gibco), 10% инаktivированной при нагревании фетальной бычьей сыворотки (BioClot, Германия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco), а затем наносили 0,2 мл/лунка в 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Корея). Культуре давали возможность развиваться в течение 1 ч. при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, после чего лунки промывали для удаления неадгезивных клеток, а затем заполняли 0,2 мл полной среды DMEM.

2.3.3. Определение оксида азота (NO)

Накопление нитрит-аниона (стабильного конечного продукта распада NO, продуцируемого iNOS) в супернатантах определяли с помощью стандартного реактива Грисса, который основан на диазотировании нитрит-аниона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии диазосоединения с *N*-(1-нафтил)этилендиамином с образованием окрашенного производного. Для этого 50 мкл супернатантов, отобранных спустя 22 часа после инкубации ПМ с тестовыми и контрольными соединениями, смешивали с 50 мкл 1% сульфаниламида в 2,5% H₃PO₄ и 50 мкл 0,1% *N*-(1-нафтил)этилендиамина в 2,5% H₃PO₄. После инкубации при 23 °С в течение 10 минут в термостатируемом шейкере определяли оптическую плотность при длине волны 550 нм. Преобразование оптической

плотности в мкМ NO проводили по стандартной кривой (0-100 мкМ NaNO₂, разведенного в среде DMEM).

2.3.4. Определение цитокинов

Клеточный супернатант центрифугировали при 1000 g 20 минут и определяли концентрацию фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкина 6 (IL-6) путем ИФА с помощью коммерческих наборов (Cloud-cloneELISAKit) на микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

2.3.5. Определение жизнеспособности клеток (МТТ-тест)

После 24 ч. инкубации клеток с тестируемыми соединениями в каждую лунку вносили 20 мкл раствора МТТ, инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 4 часов. Культуральную среду удаляли, клетки лизировали и растворяли кристаллы формазана в 150 мкл ДМСО. Планшеты встряхивали при комнатной температуре в течение 10 минут и измеряли оптическую плотность в микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 565 нм.

2.3.6. Определение жизнеспособности клеток (ЛДГ-тест)

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клеточном супернатанте определяли спектрофотометрически по убыли NADH в смеси содержащей

пируват: 10 мкл супернатантов, отобранных спустя 24 часа после инкубации ПМ с тестовыми и контрольными соединениями, смешивали с 250 мкл 0,194 нМ/л раствора NADH растворенного в 54 мМ фосфатном буферном растворе, pH 7,5. Затем к смеси добавляли 25 мкл 6,48 мМ раствора пирувата. Определяли оптическую плотность при длине волны 340 нм в течении 20 мин. Преобразование оптической плотности в клеточную жизнеспособность проводили по стандартной кривой (интактные клетки + ДМСО – 100%, интактные клетки + Тритон X-100 – 0%).

2.4. Изучение влияния соединения К-167 на функциональную активность тромбоцитов *in vivo*.

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 Биола АЛАТ-2 (Россия). Тестируемыми образцами являлась богатая тромбоцитами плазма 72 беспородных половозрелых крыс самцов массой 250,0-300,0 г, которым за 2 часа до исследования внутривенно вводили соединение лидер К-167, проявившее наиболее высокую антиагрегантную активность *invitro*, ацетилсалициловую кислоту с помощью металлического атравматического зонда. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 5мкМ. Перед началом исследования выполнялся подсчет тромбоцитов. Каждая проба должна содержать 800-900 тыс./мкл тромбоцитов.

Калибровка прибора проводится по дистиллированной воде, согласно инструкции. При этом светопропускание дистиллированной воды принимается за 0%, а светопропускание PRP за 100%.

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

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

Для оценки активности соединений определяется $\Delta\%$ ингибирования функциональной активности тромбоцитов.

Расчёт ингибирующего влияния на агрегацию тромбоцитов (ИнАТ) изучаемых тестируемых образцов проводили по формуле:

$$\text{ИнАТ} = 100 - (B/A) \times 100\%, \text{ где}$$

А-степень агрегации тромбоцитов крови крыс без изучаемых соединений;

В-степень агрегации тромбоцитов после инкубации плазмы богатой тромбоцитами с тестируемыми образцами.

Соединение К-167 было изучено в дозе 1,7 мг/кг (доза, эквимоллярная IC_{50} , полученной в опытах *invitro*) и в дозах 1, 10 и 20 мг/кг, препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 14,6 (доза, эквимоллярная IC_{50} , полученной в опытах *invitro*), 29,3, 58,6 и 117,3 мг/кг. Для всех тестируемых образцов рассчитывали величину ED_{50} (эффективная доза, в которой вещество ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

2.5. Изучение острой токсичности

Объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывали исходя из массы тела. Тестируемый образец К-167, растворенный в воде очищенной вводили в возрастающих дозах 11,2, 112,0, 560,0, 1120,0 и 2240,0 мг/кг, мышам-самцам внутрибрюшинно.

После введения соединения-лидера К-167 за животными было установлено наблюдение с целью выявления смертности или токсических признаков в течение 14 дней исследования. В первые сутки на протяжении 6 часов после введения вещества регистрировали сроки развития интоксикации и гибель животных [Миронов А.Н., 2012; Саноцкий И.В., 1975], в последующие дни - 2 раза в день (утром и вечером).

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

Начиная с группы животных, получавших дозу, предшествующую той, при введении которой наблюдалась гибель хотя бы одного животного и у всех последующих групп с возрастанием дозы производили оценку параметров негативного влияния на неврологический статус: наличие тремора, судорожного синдрома, изменения подвижности, двигательной активности, стереотипного поведения, седации.

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

По результатам гибели животных рассчитана величина ЛД₅₀ исследуемой субстанции соединения К-167 по методу Литчфилда и Уилкоксона, с использованием регрессионного анализа (Microsoft Excel 2007) [Миронов А.Н., 2012]. Также установлена принадлежность соединения-лидера К-167 к классу токсичности лекарственных средств [Березовская И.В., 2003; Саноцкий И.В., 1975].

2.6. Влияние соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами

Функциональную активность тромбоцитов, стимулированных различными индукторами, оценивали согласно вышеописанному методу Born G, в модификации Габбасова В.А. (1989). Исследования выполняли как на богатой тромбоцитами плазме 6 кроликов (человека в случае использования в качестве индуктора PAR1-агонист) по вышеописанному способу, так и на суспензии отмытых тромбоцитов кролика.

Для отмывания тромбоцитов богатую тромбоцитами плазму дважды центрифугировали с буфером (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM глюкозы and 0,35 бычьего альбумина, pH 6.7), а затем отмытые тромбоциты ресуспензировали в финальном буфере с вышеуказанным составом, но с pH 7.35.

Влияние соединения К-167 на процессы агрегации тромбоцитов, вызванной различными индукторами, изучали в диапазоне концентраций 1×10^{-4} – 1×10^{-6} М. Тестируемые образцы добавляли за 5 минут до инициации процесса агрегации. Концентрации индукторов составляли: для АДФ – 5 мкМ, коллагена - 4 мкг/мл, U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) - 3 мкМ, PAR1-агониста – 30 мкМ. Влияние К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и коллагеном, было изучено на богатой тромбоцитами плазме кролика. Действие К-167 на

агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистом PAR1 рецепторов, изучалось на богатой тромбоцитами плазме здоровых доноров. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную U46619, исследовали на суспензии отмытых тромбоцитов кролика. Для оценки активности соединений определяли $\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов и величину EC_{50} .

2.7. Исследование влияния соединения К-167 на пуриновые рецепторы тромбоцитов

Исследование проводили на плазме богатой тромбоцитами 6 кроликов самцов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг и 18 крысах самцах массой 250-300 г. Активацию $P2Y_1$ -рецепторов тромбоцитов проводили в безкальциевой среде, с добавлением 5 мМ ЭДТА, в кальциевой среде в случае $P2Y_{12}$ -рецепторов. В качестве индуктора активации данных рецепторов использовали АДФ в концентрации 70 нМ и 200 нМ для изучения влияния на $P2Y_{12}$ -рецепторы [Сакаев М.Р., 2000].

Активацию тромбоцитарных $P2Y_1$ -рецепторов проводили в безкальциевой среде, в буфере, содержащем трис-HCl - 0,472 г., натрия хлорида - 2,456 г., ЭДТА - 0,504 г. Навеску доводили до 300 мл дистиллированной водой с измерением pH раствора (pH=7,8). Активацию тромбоцитарных $P2Y_{12}$ -рецепторов проводили в кальциевой среде, в буфере, содержащем трис-HCl - 0,472 г., натрия хлорида - 2,456 г., ЭДТА - 0,504 г., $CaCl_2$ - 1 мМ. Навеску растворяли в 300 мл дистиллированной воды с измерением pH раствора (pH=7,8).

Для получения контрольной пробы в кювету анализатора вносится 7 мл буфера и проводится запись в течение 5 минут, а затем вносится 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Через 2 минуты в кювету добавляется индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 70 нМ (200 нМ).

При изучении антиагрегантной активности соединений в кювету с 7 мл буфера и 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляется 100 мкл раствора исследуемого соединения в определенной концентрации. Кювета помещается в ячейку и начинается запись агрегатограммы. Проба прописывается в течение 5 минут, после чего в кювету добавляется индуктор агрегации АДФ в концентрации 70 нМ (200 нМ). Запись агрегатограммы производится в течение 5 минут, при перемешивании пробы магнитной мешалкой (800 об/мин). Аналогичным способом в другой кювете исследуют антиагрегантную активность остальных тестируемых образцов. Влияние соединения К-167 на P2Y₁-рецепторы тромбоцитов оценивали в концентрации 1 мкМ. В аналогичной концентрации проводили исследование вещества сравнения MRS-1279 (высоко селективный блокатор P2Y₁-рецепторов тромбоцитов). В случае изучения влияния тестируемых образцов на P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов в качестве препарата сравнения был использован клопидогрел. Соединение К-167 и клопидогрел вводились за 2 часа до проведения эксперимента внутривенно.

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

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

А-степень активации тромбоцитов крови кроликов без тестируемых соединений (контрольный образец);

В-степень активации тромбоцитов после инкубации PRP с тестируемыми соединениями (опытные образцы).

2.8. Измерение уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика

Исследования проводили на 6 кроликах самцах породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. Отмывку тромбоцитов выполняли по ранее описанному методу. Измерение уровня внутриклеточного кальция проводили дважды: в суспензии отмывтых тромбоцитов кроликов, индуцированных тромбином, с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM в кальциевой (CaCl_2 1мМ) и безкальциевой среде согласно методике [RyuS.K., 2006] на планшетном ридере TECAN (Австрия).

В первый ряд планшеты помещали 300 мкл отмывтых тромбоцитов крыс с 5 мкМ Fura-2/AM и инкубировали смесь 30 мин при 37°C (для определения наличия собственной флуоресценции зонда). Далее в лунки планшеты вносили 300 мкл отмывтых тромбоцитов крыс с 5 мкМ Fura-2/AM и 0,5 ед/мл тромбина и инкубировали 30 мин при 37°C (позитивный контроль).

Затем проводили инкубацию 300 мкл отмывтых тромбоцитов крыс с 5 мкМ Fura-2/AM, 0,5 ед/мл тромбина и тестируемым образцом 30 мин при 37°C (опытная проба).

После инкубации проводили измерение интенсивности флуоресценции на планшетном ридере при длине волны возбуждения 340 nm и 380 nm и длине волны испускания 510 nm. Флуоресценцию мерили в 4 точках в каждой лунке.

Концентрация катионов кальция рассчитывалась с помощью уравнения [Schaeffer and Blaustein, 1989]:

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

где

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

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

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

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

Исследуемое соединение К-167 было изучено в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ с последующим вычислением значения IC_{50} , препарат сравнения верапамил был исследован в концентрации 100 мкМ.

2.9. Метод определения секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов

Эксперименты были выполнены на цельной крови 6 кроликов-самцов с использованием двухканального люмиагрегометра Chronolog 700 (Chronolog, США) [Ambrosio A.L., 2017]. Исследуемое соединение К-167 изучали в диапазоне концентраций 100-1 мкМ. Влияние на уровень секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов изучали люминисцентным методом при добавлении люциферин-люциферазы (Chronolog Corp., США). Проводили стандартизацию каждого образца. Для этого 900 мкл разбавленной (1:1) физиологическим раствором цельной крови, предварительно прогретой в инкубационной ячейке, помещали в канал для измерения. Далее в тест-систему добавляли 100 мкл раствора Chrono-Lume и данную смесь инкубировали 2 минуты, после чего вносили в пробу 5 мкл АТФ-стандарта. Проводили наблюдение за люминисценцией. При этом сигнальный максимум должен лежать между 60% и 20%.

При исследовании влияния соединения К-167 на секрецию АТФ из плотных гранул тромбоцитов помещали кюветы с 450 мкл физиологического раствора и 450 мкл крови в инкубационную ячейку на 5 минут. В прогретую кювету с образцом крови добавляли раствор исследуемого соединения и инкубировали 5 мин. Затем помещали кювету с исследуемым образцом в измерительную ячейку, вносили 100 мкл раствора Chrono-Lume. Проводили инкубацию в течение 2 минут, после чего добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Одновременно проводили измерение значения импеданса погруженных в тест-систему электродов с целью оценки уровня агрегации тромбоцитов. Как только сигналы АТФ начинали уменьшаться, останавливали

тест. Люминисцентный метод с использованием реактива люциферин-люцифераза позволил количественно оценить уровень секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов, а значение импеданса дало возможность оценить антиагрегационную активность тестируемых образцов.

2.10. Изучение влияния соединения К-167 на уровень тромбоксана А2 и 6-кето-простагладина F1 α

Эксперименты были выполнены на 36 крысах самцах массой 250-300 г. Влияние соединения К-167 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на уровень тромбоксана В2 (ТxB2) и 6-кето простагландина (PGF1 α) осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием набора на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200, который воспроизводили спустя 2 часа после однократного внутрижелудочного введения тестируемых образцов с помощью стандартных наборов ELISAKit (Enzo, США) [Rao M.L., 2014]. Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. В качестве биоматериала для исследования производили забор крови из брюшной аорты крыс, с последующим получением плазмы богатой тромбоцитами по ранее описанному методу. Исследуемое соединение и препарат сравнения были изучены в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *ex vivo*, которые составили для соединения К-167 11,2 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты – 92,3 мг/кг.

2.11. Метод интегральной оценки системы гемостаза (тромбоэластография)

Для более полной оценки влияния на различные звенья системы гемостаза была проведена оценка изменений параметров тромбоэластограммы крыс при однократном внутрижелудочном введении на двухканальном тромбоэластографе TEG5000 (Haemonetics Corporation, Финляндия) [Carter K.T., 2020; Chowdhury A., 2021]. Исследование выполнено на 18 крысах-самцах. Соединение К-167 и ацетилсалициловую кислоту вводили однократно внутрижелудочно за 2 часа до забора крови в дозах 11,2 и 92,3 мг/кг соответственно. Забор цельной крови осуществляли из брюшной аорты у крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг). В образцах крови проводили измерение параметров тромбоэластограммы: R, мин; K, мин; угол α , град. и MA, %.

2.12. Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс

Исследование проводили на 42 беспородных половозрелых крысах самцах массой 250,0-300,0 г. Антитромботическое действие соединения К-167 и препаратов сравнения было изучено с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990]. Все исследованные образцы растворялись в воде очищенной. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Соединение К-167 и препарат сравнения вводились крысам внутрижелудочно однократно за 2 часа до инициации процессов тромбообразования. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутривентрально), затем послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. На участок длиной около 1 см накладывали ватный диск размером 2x8 мм, пропитанный 50% раствором

хлорида железа (III) (0,025 мл). Для изолирования окружающих тканей под сонную артерию прокладывали парафиновую бумагу. Ультразвуковой датчик аппарата «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург) устанавливался на расстоянии 1 см от ватного диска по ходу кровотока в сонной артерии (Рис. 2.1.). Регистрация кровотока проводилась до полной окклюзии сосуда тромбом.

Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота были исследованы в дозах 11,2 и 92,3 мг/кг соответственно. С целью расчета показателя ED_{50} в дальнейшем соединение К-167 было изучено в дозах 5,6 и 2,8 мг/кг. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота исследовалась в дозах 46,2 и 184,6 мг/кг. Оценку антитромботического действия тестируемых образцов проводили по показателю времени образования тромба. Далее производили расчет показателя ED_{50} с использованием метода регрессионного анализа.

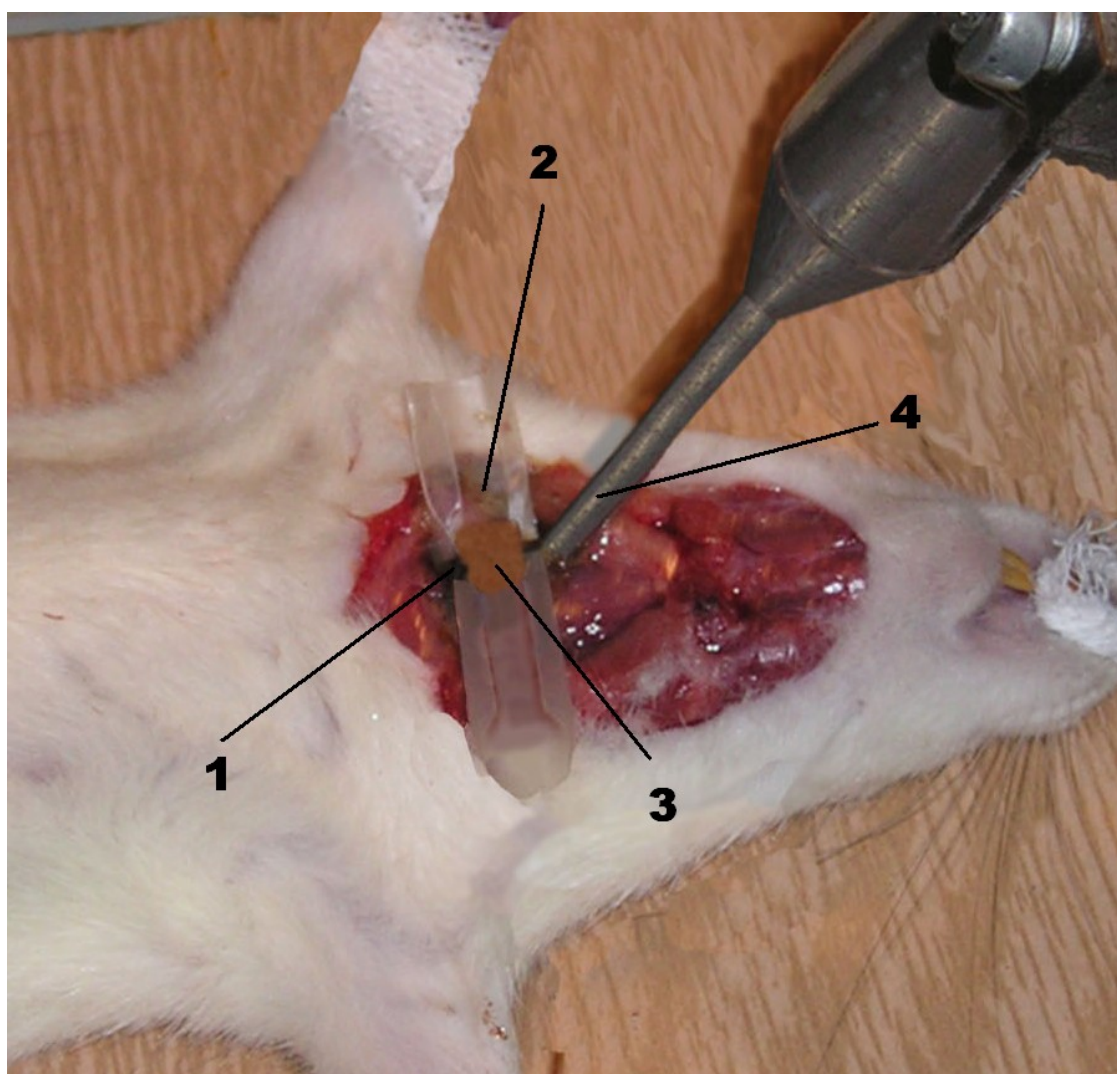


Рисунок 2.1. Моделирование артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III).

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

2.13. Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током

Моделирование тромбоза проводили 42 беспородным крысам самцам массой 250,0-300,0 г. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Воспроизведение данной модели тромбоза выполняли спустя 2 часа после внутрижелудочного однократного введения тестируемых образцов [Guglielmi G., 1991; ZhaoX., 2016]. Наркотизацию животных проводили хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно), затем послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. К участку сосуда длиной 1 см подводили титановые электроды, на место их контакта с артерией наносили акустический гель. Для изолирования окружающих тканей под сонную артерию подводили парафиновую бумагу. На расстоянии 1 см от данного участка по ходу кровотока устанавливали датчик аппарата «Минимакс-Допплер-К» («СП Минимакс», Санкт-Петербург, Россия) с рабочей частотой ультразвукового зондирования 25 МГц (Рис. 2.2.).

Индукция тромбоза сонной артерии проводилась постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока при этом соответствует 50 мА. Воздействие на сосуд осуществлялось до момента полной окклюзии сонной артерии тромбом.

Исследуемое соединение К-167 исследовали в дозах 2,8, 5,6 и 11,2 мг/кг. Препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 46,2, 92,3 и 184,6 мг/кг.

В качестве параметра, характеризующего антитромботические свойства исследуемых веществ, использовали интервал времени от момента начала электростимуляции до полной окклюзии каротидной артерии. Далее производили расчет показателя ED_{50} с использованием метода регрессионного анализа.

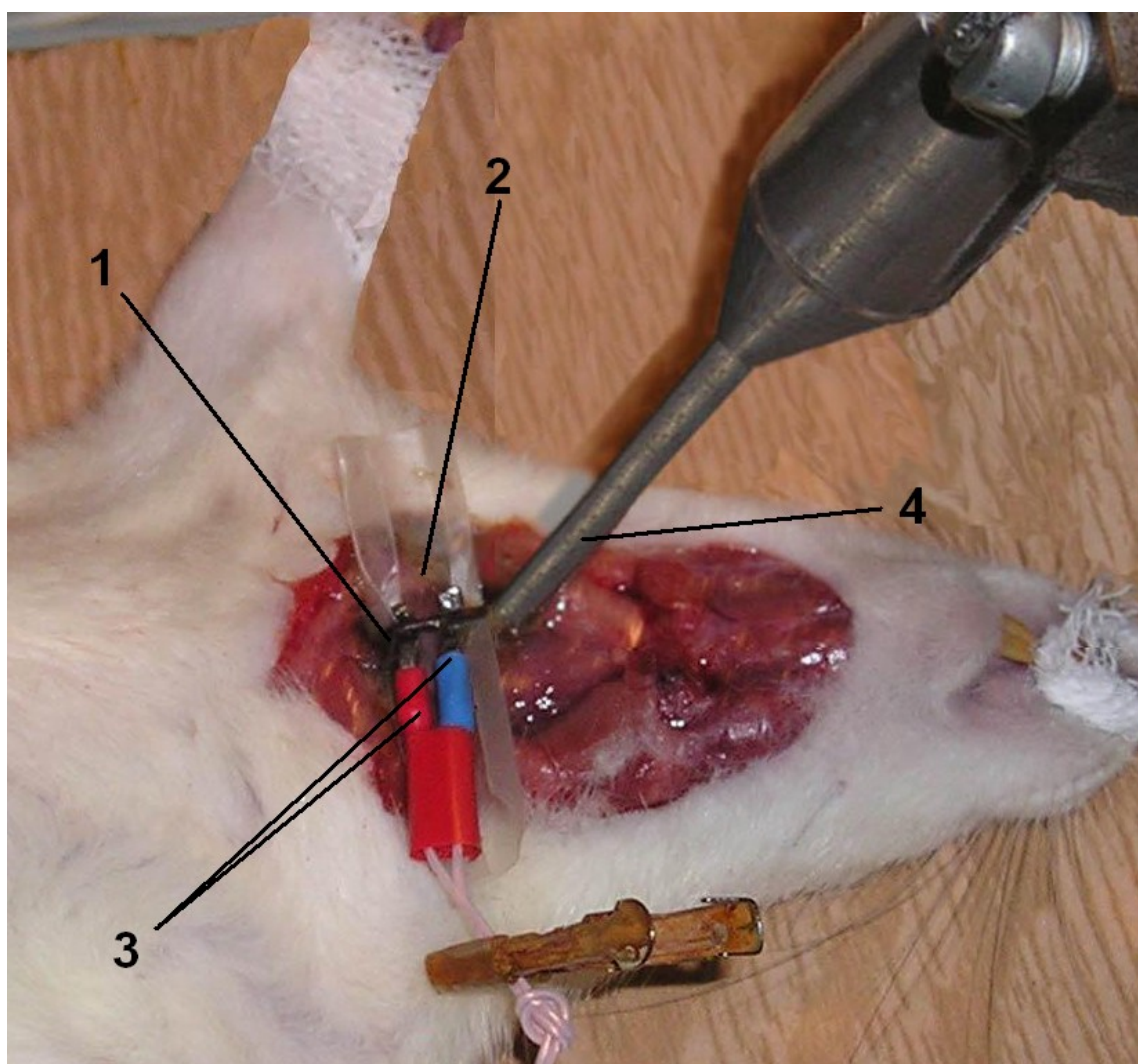


Рисунок 2.2. Моделирование артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.

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

2.14. Модель тромбоза глубоких вен

С целью изучения антитромботического действия соединения К-167 и препарата сравнения в отношении венозной системы была выбрана модель перевязки нижней поллой вены крыс [Спасов А.А., 2021; AlbadawiH., 2017; JinQ.-Q., 2017]. Эксперименты были выполнены на 24 половозрелых беспородных крысах самцах массой 250-300 г. У крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг внутривентрально), проводили послойную лапаротомию, оттеснение кишечника, разделение нижней поллой вены и аорты, и осуществляли перевязку нижней поллой вены на 1 см выше места бифуркации. Брюшная часть аорты при этом должна быть незатронутой. Затем брюшную полость ушивали и через 24 часа крыс повторно наркотизировали и производили лапаротомию с последующим извлечением тромбов из нижней поллой вены. Тромбы взвешивали. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Тестируемое соединение К-167 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота вводились внутривентрально за 2 часа до осуществления перевязки нижней поллой вены, в дозах 11,2 и 92,3 мг/кг, соответственно (ED_{50} антиагрегантной активности *ex vivo*). Для чистоты эксперимента включали группу ложно-оперированных животных, которой проводили лапаротомию и ушивание брюшной полости, с целью исключения влияния хирургической манипуляции на образование тромба или гибель животных.

2.15. Изучение антитромботических свойств соединения К-167 на модели тромбоза сонной артерии в условиях инфаркта миокарда

Формирование некоронарогенного инфаркта миокарда проводили изопротеренолом 12 белым беспородным крысам самцам массой 250-300 г. Изопротеренол вводили двукратно с интервалом 24 часа в дозе 85 мг/кг подкожно в область паховой складки [MohamedA.R., 2014].

Соединение К-167 растворялось в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Введение раствора тестируемого образца крысам начинали не ранее, чем через 24 часа после последней инъекции изопротеренола. Через 2 часа после введения тестируемого образца проводили исследование антитромботического действия с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [KurzK.D., 1990].

2.16. Метод изучения влияния тестируемого соединения на время кровотечения

Исследование выполнялось на 24 белых беспородных мышах самцах массой 20-25 г. У мышей, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) отсекали 3 мм с кончика хвоста. Хвост быстро помещали в пробирку с физиологическим раствором, температуру которого (37°C) поддерживали с помощью термостата и регистрировали время от момента отсекания кончика хвоста до момента прекращения вытекания крови из хвостовой вены [GreeneT.K., 2010]. После прекращения кровотечения кончик хвоста обрабатывали раствором бриллиантового зеленого. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в

эквивалентном объеме. Исследуемое соединение К-167 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота вводились пластмассовым атравматическим зондом внутрижелудочно за 2 часа до начала эксперимента. Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота были изучены в дозах ED_{50} антиагрегантной активности, полученных в опытах *ex vivo*, которые составили 511,2 и 92,3 мг/кг, соответственно.

2.17. Исследование влияния соединения К-167 на уровень эндотелина-1 и фактора Виллебранда без и в условиях экспериментального сепсиса

Исследование выполнено на 36 крысах-самцах. Соединение К-167 и препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту вводили однократно внутрижелудочно за 2 часа до начала исследования. Определение уровня эндотелина-1 и фактора Виллебранда осуществляли методом ИФА (согласно инструкции к наборам) в плазме крови крыс на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro (Tecan, Австрия). Для получения образцов плазмы производили забор цельной крови из брюшной аорты наркотизированных хлоралгидратом животных с помощью шприца, содержащего 3,8% раствор натрия цитрата. Экспериментальный сепсис моделировали путем внутривенного введения раствора липополисахарида (ЛПС) в дозе 2 мг/кг за 4 часа до введения исследуемых веществ.

2.18. Исследование влияния соединения К-167 на параметры тромбоэластограммы без и в условиях экспериментального сепсиса

Исследование выполнено на 18 крысах-самцах. Забор образцов крови и метод определения параметров тромбоэластограммы осуществляли по способу, описанному в пункте 2.10. Экспериментальный сепсис моделировали с помощью

раствора липополисахарида (ЛПС) (2 мг/кг, внутривенно) за 4 часа до введения исследуемых веществ.

2.19. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием встроенных функций программного обеспечения Microsoft Excel 2020, а также программы GraphPad Prism 8.0. 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.

ГЛАВА 3. ПОИСК В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА GSK-3 β

GSK3 β -опосредованное фосфорилирование фрагмента гликогенсинтазы мышц человека типа 1 оценивали в присутствии 25 мкМ АТФ с помощью люминесцентного анализа с помощью ADP-GloTM. В качестве положительного контроля использовали АТФ-конкурентный ингибитор SB21676315. Мы обнаружили, что скаффолд 3-арилиден-2-оксиндола явно более предпочтителен по сравнению с 3,3-дизамещенными 2-оксиндолами для ингибирования GSK3 β . Среди последних были идентифицированы только два активных соединения – К-215 и К-237.

После оценки IC₅₀ соединение-лидер 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (К-167) было идентифицировано как наномолярный ингибитор GSK3 β . Структурно сходные производные 3-бензилиден-2-оксиндола К-110, К-165 и К-170 являются субмикромольными ингибиторами GSK3 β , что указывает на благоприятную роль акцепторов электронодонорной заместительной связи в 3-арилиденовом фрагменте. Ацетамидные и карбаматные боковые цепи в положении 5 2-оксиндола хорошо переносятся, в то время как объемистый бензамид делает соединение К-248 значительно менее активным. Однако карбаматная группа склонна к гидролизу и может быть подвержена метаболизму. Таким образом, можно сделать вывод, что ацетамидный фрагмент в положении 5 является более привлекательным для дальнейших усилий по оптимизации и улучшению селективности ингибиторов этого класса.

Важность двойной углерод-углеродной связи в положении 3 ядра 2-оксиндола демонстрируется рядом соединений, содержащих sp³-гибридизованный атом C³ (KL-29, К-215, KL-30,2, таблица 3.1). Было обнаружено, что аналоги 3-гидрокси-3-алкила практически неактивны, за исключением соединения К-237, которое сохраняет микромольное значение IC₅₀. Эти данные подчеркивают важность 3-арилиденового фрагмента для ингибирования GSK3 β 2-оксиндолами.

Таблица 3.1.

Ингибирующая активность соединений в отношении GSK3B *invitro* (n = 3)

№ п/п	Тестируемый образец	R ¹	R ²	Δ% ингибирования GSK3B (10 мкМ, M±SD), %	IC ₅₀ ±SE GSK3B ингибирующей активности, мкМ
1.	K-110			84,16±12,92*	0,233±0,041
2.	K-165			91,82±2,95*	0,155±0,018
3.	K-167		H	95,7±4,45*	0,0042±0,0007
4.	K-170			69,29±11,46*	0,348±0,012
5.	K-215			71,29±4,75*	1,231±0,344
6.	K-237			64,25±5,68*	1,717±0,411
7.	K-248			58,94±7,97*	4,343±0,217
8.	KL-15			35,15±12,45	>>50

№ п/п	Тестируемый образец	R ¹	R ²	Δ% ингибирования GSK3B (10 мкМ, M±SD), %	IC ₅₀ ±SE GSK3B ингибирующей активности, мкМ
9.	KL-16			44,91±7,84*	34,44±17,66
10.	KL-29			-3,55±6,54	>>50
11.	KL-3		H	37,85±4,32*	6,72±0,13
12.	KL-30,2			15,58±4,76	>>50
13.	KL-33			26,81±2,65	>>50
14.	KL-34			27.46±2.31	>>50
15.	KL-4		NO ₂	85,9±4,67*	1,77±0,08
16.	KL-7		H	32,76±4,77*	13,49±3,16

№ п/п	Тестируемый образец	R ¹	R ²	Δ% ингибирования GSK3B (10 мкМ, M±SD), %	IC ₅₀ ±SE GSK3B ингибирующей активности, мкМ
17.	KL-9		H	49,2±8,63*	5,68±1,6
18.	OIP-NO ₂ -O		NO ₂	80,13±0,13*	12,75±3,54
19.	OIP-NO ₂ -O ₂		NO ₂	87,6±1,87*	20,01±3,68
20.	SB-216763	—	—	93,23±14,50*	0,0084±0,002
21.	Ацетилсалициловая кислота	—	—	—	—

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

«—» — нет данных.

Модификация гетероциклического фрагмента в положении 3 была изучена с использованием производных пиридина, пиразола и фурана. Все они проявляли активность в микромолярном диапазоне, уступающую соединению K-167. Наибольшую активность продемонстрировал 3-(5-этоксикарбонилпиразол-4-илметилен)-5-нитро-2-оксиндол KL-4. Интересно отметить, что, вопреки ожиданиям, введение 5-нитрозамениителя в структуру K-167 привело к снижению активности. Это указывает на неаддитивные взаимодействия между R1 и R2, что может усложнить будущую работу по оптимизации этих соединений для повышения GSK3B-ингибирующей активности.

ГЛАВА 4. АНТИАГРЕГАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА *INVITRO* И *IN VIVO*

Ключевая роль активации тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в патогенезе ишемических нарушений в различных органах определяет целесообразность использования антиагрегантных средств и других методов, для их лечения и профилактики [Fuetnes M., 2017] [Zhang Y., 2017]. Но, несмотря на это антитромбоцитарные средства не всегда проявляют необходимую активность и имеют побочные эффекты [Morales Vidal S.G., 2013]. Исходя из этого, является целесообразным проводить поиск новых антиагрегантных средств, с более выраженной активностью и с наименьшими побочными эффектами.

При этом первым этапом исследования является выявление высокоактивных субстанций в опытах *in vitro* [Миронов А.Н., 2012]. Однако более полно учесть суммарное влияние различных факторов на процесс образования агрегатов кровяных пластинок в сосудистом русле можно только при выполнении опытов в условиях целого организма *in vivo*, а также точнее оценить антиагрегационный эффект исследуемых соединений по сравнению с исследованиями *in vitro* [Gao W., 2017].

Успешное применение нового потенциального антиагрегантного средства в клинической практике возможно при наличии данного вида активности, превосходящего известные антиагрегантные препараты [Миронов А.Н., 2012].

Поэтому для характеристики особенностей действия исследуемых соединений и их активности, вызываемые ими эффекты должны быть сравнены с эталонными препаратами, по возможности близкими по механизму действия к изучаемому средству. Поэтому целью настоящих исследований явился поиск высокоактивных соединений в ряду производных 2-оксиндола в опытах *in vitro*, а также оценка антиагрегантного действия наиболее активной субстанции в

условиях целого организма животного *ex vivo* на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

4.1. Поиск соединений с антиагрегантной активностью в ряду производных 2-оксиндола, проявляющих GSK3b-ингибирующую активность, *invitro*

В таблице 4.1 представлены данные скрининга соединений с установленной GSK-3b-ингибирующей активностью на предмет антиагрегантного действия. Из 20 исследуемых соединений было выявлено 4 соединения, проявивших дозозависимое ингибирование агрегации тромбоцитов *invitro* на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. По значению IC_{50} уровень активности всех 4 соединений превосходил таковой для препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. Так, соединение под шифром К-165 было активнее ацетилсалициловой кислоты в 6 раз, образец К-167 проявлял активность в 10,3 раза выше, чем препарат сравнения. Вещества под шифрами К-215 и К-248 также оказывали антиагрегантное действие более выраженное, чем ацетилсалициловая кислота и превосходили ее по активности в 9,1 и 4,4 раза, соответственно.

Таблица 4.1.

Антиагрегантная активность соединений проявляющих GSK-3b-ингибирующую активность и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов *invitro* ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} антиагрегантной активности, мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	Ацетилсалициловая кислота	56,5 $\pm$ 2,1*	20,51 $\pm$ 5,4*	11 $\pm$ 3,7	81,0

2.	K-215	84,0±3,3*	47,8±3,4*	22,6±7,2	8,9
3.	K-165	67,2±4,1*	43,1±6,5	33,0±8,1	13,5
4.	K-248	72,3±6,9*	37,2±6,2	19,3±5,4	18,5
5.	K-167	75,6±3,0*	55,6±9,2*	26,5±5,8*	7,9
6.	OIP-NO2-O	40,3±3,9*	-	-	-
7.	OIP-NO2-O2	38,5±4,3*	-	-	-
8.	K-237	20,9±5,4	-	-	-
9.	K-170	4,5±1,3	-	-	-
10.	K-110	26,7±8,4*	-	-	-
11.	KL-29	47,1±5,4*	-	-	-
12.	KL-33	48,3±2,4*	-	-	-
13.	KL-30,2	27,9±1,3	-	-	-
14.	KL-34	31,6±5,7*	-	-	-
15.	KL-15	17,1±7,2	-	-	-
16.	KL-16	15,2±9,9	-	-	-
17.	KL-3	18,1±4,3	-	-	-
18.	KL-4	41,2±5,3	-	-	-
19.	KL-6	38,9±6,9	-	-	-
20.	KL-7	31,1±5	-	-	-
21.	KL-9	41,5±9,9	-	-	-

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

Таким образом, в результате проведенного скрининга было определено соединение-лидер K-167 для более углубленного изучения.

4.2. Зависимость антиагрегантного эффекта производных 2-оксиндола от химической структуры

Так как все исследуемые соединения, в той или иной степени, проявили антиагрегантную активность, то можно заключить, что определенный вклад в активность производных 2-оксиндола вносит базовая структура.

Рисунок 4.1. Базовая структура производных 2-оксиндола.

В ходе анализа структур соединений, проявивших наиболее высокий уровень антиагрегантной активности (К-215, К-167, К-248 и К-165), было отмечено, что в положениях R1 и R2 этих молекул находятся следующие заместители: -фенил, -циклопропилпиридин, -бензамид, -метилкарбамат. При этом, наибольший вклад в наличие антиагрегантной активности вносит -циклопропилпиридиновый заместитель в положении R1. Его замена на -пиридин приводит к незначительному снижению уровня активности. Наличие фенольного заместителя в положении R1 и бензамида в положении R2 также сохраняет высокий уровень антиагрегантной активности. При этом замена радикала в положении R1 на пространственно более сложный -1-паратолилпропан-1-он способствует снижению уровня антиагрегантной активности более, чем в 3 раза. Введение в положение R2 молекулы метилкарбамата способствует снижению активности.

При анализе структур с низким уровнем активности было установлено, что для данных соединений характерно наличие в положении R1 ароматических

заместителей с более длинной углеродной цепочкой. Так, введение в положение R1 -4-этиланилинового радикала способствует снижению антиагрегантной активности практически в 2 раза. При наличии в положении R1 -2-винилпиридинового, -4-винилфенольного заместителей уровень антиагрегантной активности составляет ниже 50%. Замена заместителя с шестичленным циклом на -3-метил-1Н-пиразол и -1-метил-1Н-пиразол способствует еще более выраженному снижению уровня активности. Однако, введение в положение R2 нитрогруппы приводит к повышению активности в более, чем 2 раза.

При сохранении в положении R1 ароматических шестичленных заместителей с одним атомом углерода в цепи и наличии в положении R2 алифатических азот-содержащих заместителей наблюдалось выраженное снижение антиагрегантной активности.

Таблица 4.2.

Химические структуры и уровень антиагрегантной активности производных 2-оксидола в концентрации 100 мкМ *invitro* ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	R ¹	R ²	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов
1.	K-215			84,0±3,3*
2.	K-167		H	75,6±3,0*
3.	K-248			72,3±6,9*
4.	K-165			67,2±4,1*

5.	KL-33			48,3±2,4*
6.	KL-29			47,1±5,4*
7.	KL-9		H	41,5±9,9*
8.	KL-4		NO ₂	41,2±5,3*
9.	OIP-NO ₂ -O		NO ₂	40,3±3,9*
10.	OIP-NO ₂ -O ₂		NO ₂	38,5±4,3*
11.	KL-34			31,6±5,7*
12.	KL-7		H	31,1±5,0*
13.	KL-30,2			27,9±1,3*
14.	K-110			26,7±8,4

15.	K-237			20,9±5,4
16.	KL-3		H	18,1±4,3
17.	KL-15			17,1±7,2
18.	KL-16			15,2±9,9
19.	K-170			4,5±1,3

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

Таким образом, в ходе анализа структурных формул исследуемых соединений и уровня их антиагрегантного действия было установлено, что безусловный вклад в наличие активности вносит базовая структура. Высокий уровень активности для производных 2-оксиндола характерен при наличии в положении R1 шестичленных ароматических заместителей с короткой углеродной цепочкой, а в положении R2 -бензамида или -метилкарбамата, или же отсутствие заместителя.

4.3. Антиагрегантная активность наиболее активного соединения K-167 *in vivo*

Для более полной оценки антиагрегантного действия соединения K-167 с учетом влияния целостного организма, было проведено исследование *in vivo* при однократном внутрижелудочном введении исследуемого вещества крысам-самцам. Препарат сравнения и соединение K-167 проявили дозозависимое подавление функциональной активности тромбоцитов, что позволило рассчитать значение ED₅₀ (таблица 4.3). По данному показателю соединение K-167 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 8,2 раза.

Таблица 4.3.

Антиагрегантная активность соединения K-167, ацетилсалициловой кислоты *in vivo* (M±SEM) (n=5)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED ₅₀ , мг/кг
1	K-167	1,0	16,6±4,2	11,2
		1,7	39,6±4,5*	
		10,0	48,3±8,6*	
		20,0	68,6±6,3*	
2	Ацетилсалициловая кислота	14,6	12,4±3,4	92,3
		29,3	28,4±4,9	
		58,6	40,0±5,0*	
		117,3	58,0±3,9*	

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

4.4. Изучение острой токсичности соединения К-167

Исходя из полученных данных далее было проведено исследование острой токсичности наиболее активного соединения под шифром К-167.

В опытной группе мышей, получавших соединение К-167 в дозе 11,2 мг/кг, не отмечали тенденцию снижения реакции на болевые и тактильные раздражители после введения вещества. Состояние мышей в последующие дни наблюдения не отличалось от контрольной группы.

В опытных группах мышей, получавших К-167 в дозе 112,0 мг/кг состояние мышей, характеризовалось настороженностью, пугливостью. Через 1 час после введения вещества отмечали незначительное снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, снижение спонтанной подвижности, умеренную седацию в течение 3-4 часов. Через 24 часа общее состояние мышей восстанавливалось и в последующие дни наблюдения их поведение нормализовалось и не отличалось от контрольной группы.

В группе мышей, получавших соединение К-167 в дозе 560,0 мг/кг отмечали снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, спонтанной подвижности, седацию. Через 6 часов с момента введения исследуемого соединения наблюдалась гибель двух особей. В последующие дни состояние выживших мышей восстанавливалось до уровня контрольной группы.

При увеличении дозы соединения К-167 до 1120,0 мг/кг 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 последующие дни наблюдения общее состояние выживших мышей несколько отличалось от контрольной группы, отсроченной гибели не выявлено. На 14 сутки эксперимента у животных сохранялась седация, уменьшение подвижности, состояние шерстного покрова было неопрятным.

При введении соединения К-167 в дозе 2240,0 мг/кг у животных отмечали выраженное снижение спонтанной подвижности, признаки седации, уменьшение

реакции на болевые и тактильные раздражители, увеличение частоты дыхания. В течение первых суток наблюдения отмечена гибель всех особей.

На рисунке 4.2. представлена зависимость гибели мышей от логарифма исследуемых доз.

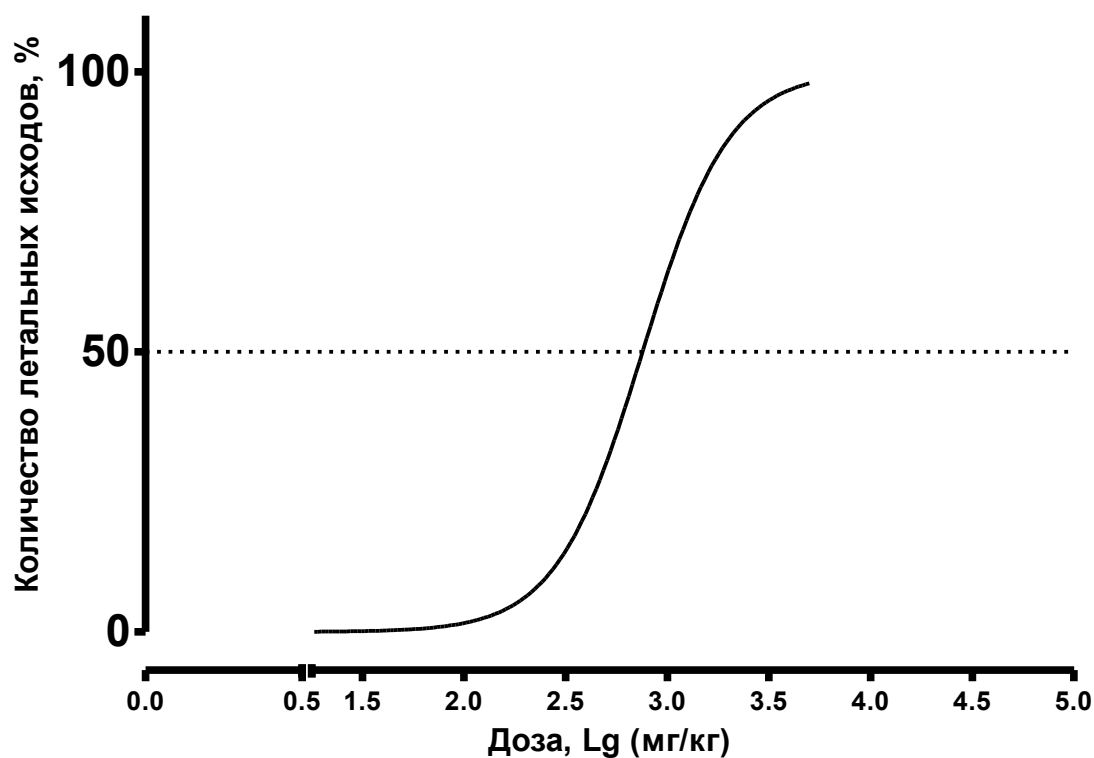


Рисунок 4.2. Логарифм дозы и значение острой токсичности соединения К-167.

Проведенное исследование по изучению острой токсичности соединения К-167 позволило рассчитать значение ЛД₅₀ и условный терапевтический индекс (таблица 4.4).

Таблица 4.4.

Острая токсичность и условный терапевтический индекс (УТИ) соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты

№ п/п	Тестируемый образец	LD ₅₀ , мг/кг	УТИ
1.	К-167	754,4	67,4

2.	Ацетилсалициловая кислота	350,0	3,8
----	---------------------------	-------	-----

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования было установлено, что класс производных 2-оксиндола ингибиторов GSK3b является перспективным для поиска и создания на его основе новых антиагрегантных средств. Выявленное соединение-лидер под шифром К-167 превосходило по активности препарат сравнения в 10,2 раза в опытах *invitro*, а в исследованиях *in vivo* в 8,2 раза.

Исследования по изучению острой токсичности позволили установить значение ЛД50 для соединения К-167, которое составило 754,4 мг/кг. Это позволяет отнести данное соединение к 3 классу малотоксичных веществ. Согласно литературным данным указанный параметр для ацетилсалициловой кислоты составляет 350,0 мг/кг. Установленная летальная доза (ЛД50), а также доза, в которой соединение К-167 способствует эффективному снижению функциональной активности тромбоцитов (ED50), позволяют провести оценку терапевтической широты исследуемого соединения. По значению условного терапевтического индекса соединение К-167 превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 17,7 раза, что указывает на более высокий уровень безопасности данного соединения.

На следующем этапе исследования представилось целесообразным изучить влияние соединения К-167 на различные звенья системы гемостаза.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ К-167 НА РАЗЛИЧНЫЕ ЗВЕНЬЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

5.1. Влияние соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов, стимулированную различными агонистами

Стимуляция тромбоцитов коллагеном приводит к запуску outside-in механизма активации и распространения сигнала с участием комплекса PI3K-Akt-GSK-3 β и ведущего к клеточной активации и высвобождению вторичных медиаторов АДФ и тромбоксана A₂. Эти агонисты вместе с локально продуцируемым тромбином вносят вклад в клеточную активацию, стимулируя рецепторы, связанные с гетеротримерными G-белками, которые индуцируют различные сигнальные события и действуют синергетически, вызывая полную активацию тромбоцитов [DeHelianD., 2020; SorianoJerezE.M., 2021]. При изучении влияния соединения К-167 на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов было установлено, что в концентрации 100 мкМ соединение К-167 способствует ингибированию агрегации кровяных пластинок на 99,8%. В концентрациях 10 и 1 мкМ соединение К-167 подавляет процессы агрегации на 94,5 и 18,8% соответственно. Значение IC₅₀ для соединения К-167 при этом составило 3,0 мкМ, в то время как для препарата сравнения данный параметр составил 4,5 мкМ (таблица 5.1). Схожий уровень активности соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты, при использовании в качестве индуктора процессов агрегации тромбоцитов коллагена, объясняется тем, что при активации гликопротеинового рецептора VI на поверхности тромбоцитов передача сигнала внутрь клетки осуществляется как через путь PI3K-Akt-GSK-3 β , так и с дальнейшей активацией процессов синтеза тромбоксана A₂ [ChenH., 2022; SunY., 2023].

Таблица 5.1.

Антиагрегантная активность соединения К-167 на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов *invitro* ($M \pm m$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	К-167	99,8±0,1*	94,5±4,1*	18,8±5,1	3,0
2.	Ацетилсалициловая кислота	83±1,9*	61,8±2*	31,7±1,8*	4,5

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

Использование в качестве индуктора селективного агониста PAR1-рецепторов тромбоцитов позволило изучить влияния соединения К-167 на протеазо-активируемые рецепторы на поверхности тромбоцитов. В концентрации 100 мкМ соединение К-167 не оказывало выраженного эффекта в отношении процессов агрегации тромбоцитов, стимулированных PAR1-агонистом (таблица 5.2), что позволяет сделать вывод об отсутствии у соединения К-167 подобного механизма действия.

Таблица 5.2.

Антиагрегантная активность соединения К-167 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной селективным PAR1-агонистом *invitro* ($M \pm m$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	К-167	11,9±3,0	-	-	-

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

В ходе активности внутриклеточной циклооксигеназы тромбоцитов происходит синтез и секреция тромбоксана A₂, мощного проагрегантного вещества. Секретируемый тромбоксан оказывает стимулирующее действие на свои рецепторы на поверхности циркулирующих тромбоцитов. Соединение К-167 способствовало дозозависимому ингибированию агрегации тромбоцитов, стимулированных селективным агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 (таблица 5.3). Значение IC₅₀ для соединения К-167 при этом составило 43,7 мкМ

Таблица 5.3.

Антиагрегантная активность соединения К-167 на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной селективным агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	К-167	96,1±0,7*	23,4±5,0*	14,0±3,2	43,7

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

5.2. Влияние соединения К-167 на пуриновые рецепторы тромбоцитов

В таблицах 5.4. и 5.5. представлены данные по изучению влияния соединения К-167 на пуриновые P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов. В концентрации 1 мкМ вещество сравнения MRS-2179 (селективный антагонист P2Y₁ рецепторов тромбоцитов) способствовало ингибированию активации P2Y₁ рецепторов тромбоцитов на 93,4%. Исследуемое соединение К-167 в концентрации 1 мкМ способствовало снижению уровня активации тромбоцитов на 7,1%. В качестве референсного средства при изучении P2Y₁₂-антагонистического действия был выбран клопидогрел. Соединение К-167 при однократном внутривенном

введении способствовало ингибированию активации $P2Y_{12}$ рецепторов тромбоцитов на 12,4%, в то время как клопидогрел в дозе, эквимолярной дозе соединения К-167, способствовал подавлению активации $P2Y_{12}$ рецепторов на 56,7%.

Таблица 5.4.

Влияние соединения К-167 и MRS-2179 (1 мкМ) на активацию тромбоцитов, вызванную стимуляцией $P2Y_1$ рецепторов тромбоцитов *invitro* ($M \pm SEM$) (n=6)

6. № п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования активации тромбоцитов
1	Контроль	
2	К-167	$7,1 \pm 1,2$
3	MRS-2179	$93,4 \pm 2,8^*$

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA

($p < 0,05$)

Таблица 5.5.

Влияние соединения К-167 и клопидогрела на $P2Y_{12}$ рецепторы тромбоцитов *in vivo* ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов
1	К-167	11,2	$12,4 \pm 2,1$
2	Клопидогрел	$16,2^*$	$56,7 \pm 3,8^\#$

*-доза, эквимолярная дозе К-167

#- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA

($p < 0,05$)

Проведенное исследование позволяет исключить влияние на пуриновые рецепторы тромбоцитов из возможного механизма антиагрегантного действия соединения К-167.

5.3. Влияние соединения К-167 на баланс тромбоксана и простациклина

Методом ИФА было проведено исследование по влиянию соединения К-167 на процессы синтеза тромбоксана A_2 . В дозе ED_{50} антиагрегантной активности соединение К-167 способствовало снижению продукции тромбоксана на 75,6%. Дальнейшее изучение соединения К-167 в дозах 5,8 и 2,8 мг/кг, позволило установить, что в указанных дозах соединение К-167 подавляет продукцию тромбоксана на 41,2 и 17,4% соответственно (таблица 5.6). ED_{50} для соединения К-167 при этом составило 7,3 мг/кг. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота, являясь неизбирательным ингибитором ЦОГ, также способствовала дозозависимому ингибированию синтеза тромбоксана с показателем ED_{50} 32,5 мг/кг (таблица 5.6). По способности оказывать влияние на синтез простациклина соединение К-167 значительно уступало ацетилсалициловой кислоте. В дозах ED_{50} антиагрегантной активности соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота способствовали снижению синтеза простациклина на 9,0 и 56,4% соответственно (таблица 5.7).

Таблица 5.6.

Влияние соединения К-167 на уровень TxB_2 в тромбоцитах, стимулированных арахидоновой кислотой *in vivo* ($M \pm SEM$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень TxB_2 , пкг/мл	$\Delta\%$ снижения уровня TxB_2	ED_{50} , мг/кг
1.	Контроль		$172,8 \pm 6,9$		
2.	К-167	2,8	$142,7 \pm 8,5$	$17,4 \pm 4,9$	7,3
3.		5,6	$101,7 \pm 9,3^*$	$41,2 \pm 5,4^*$	
4.		11,2	$42,2 \pm 6,3^*$	$75,6 \pm 3,6^*$	

5.	Ацетилсалициловая кислота	23,1	120,1±10,6*	30,5±6,1*	32,5
6.		46,2	36,5±10,9*	78,9±6,3*	
7.		92,3	20,6±6,2*	88,1±3,6*	

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA
($p < 0,05$)

Таблица 5.7.

Влияние соединения К-167 на уровень 6-кето-простогландина F1 α в плазме крыс *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень 6-кето- простогландина F1 α , пкг/мл	$\Delta\%$ снижения уровня 6-кето- простогландина F1 α
1.	Контроль		21304,7±846,6	
4.	К-167	11,2	19388,5±397,4	9,0±1,9
7.	Ацетилсалициловая кислота	92,3	9293,5±709,0*	56,4±3,3*

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA
($p < 0,05$)

Таким образом, по способности влиять на баланс тромбоксана и простациклина соединение К-167 способствует выраженному снижению продукции тромбоксана, однако на способность генерировать простациклин данное вещество влияния не оказывает. Это позволяет исключить влияние соединения К-167 на сосудистый эндотелий.

5.4. Влияние соединения К-167 на секреторную функцию тромбоцитов

Важным компонентом внутриклеточного сигнального каскада тромбоцитов является кальций, секретируемый из депо хранения, а также пул кальция из внеклеточного пространства. Методом флуоресцентного анализа было установлено, что соединение К-167 способно оказывать влияние на содержание внутриклеточного кальция в тромбоцитах как в кальциевой, так и в бескальциевой среде (таблица 5.8. и 5.9).

Таблица 5.8.

Влияние соединения К-167 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином (0,5 ед./мл) в кальциевой среде *invitro* ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация, мкМ	Уровень внутриклеточно го кальция, нМ	$\Delta\%$ ингибирования уровня внутриклеточно го кальция	IC ₅₀ , мкМ
1.	Суспензия тромбоцитов + тромбин (контроль)		234,6 $\pm$ 2,1		
2.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + К-167	100	66,6 $\pm$ 9,6*	71,6 $\pm$ 4,1	10,6
		10	102,8 $\pm$ 1,1*	56,2 $\pm$ 0,4	
		1	187,2 $\pm$ 30,7	20,2 $\pm$ 13,1	
3.	Суспензия тромбоцитов + тромбин +	100	88,6 $\pm$ 19,4*	43,3 $\pm$ 10,6	

	Верапамил				
--	-----------	--	--	--	--

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

Таблица 5.9.

Влияние соединения К-167 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином (0,5 ед./мл) в безкальциевой среде *invitro* ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ	$\Delta\%$ ингибирования уровня внутриклеточного кальция	IC ₅₀ , мкМ
4.	Суспензия тромбоцитов + ЭДТА + тромбин (контроль)		102,8±5,6		
5.	Суспензия тромбоцитов + ЭДТА + К-167 + тромбин	100	13,9±6,5	86,5±6,3	12,6
		10	55,8±9,5	45,7±9,2	
		1	97,2±2,8	5,5±2,7	
6.	Суспензия тромбоцитов + ЭДТА + Верапамил + тромбин	100	100,4±0,4	2,3±0,4	

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

Функциональную активность тромбоцитов возможно оценить по уровню секретируемой АТФ из плотных гранул хранения. Проведение исследования по определению уровня секретируемой АТФ позволяет судить о действии антитромбоцитарных препаратов, а также об остаточной реактивности тромбоцитов [BuyukyilmazG., 2014]. Показано, что активация внутриклеточного сигнального пути Akt/PI3K/GSK-3 β сопровождается секрецией молекул АТФ [XiangK., 2014]. Поэтому представилось необходимым изучить влияние соединения К-167 на секрецию молекул АТФ из плотных гранул тромбоцитов. Средний уровень секретируемой АТФ в контрольных образцах крови составил 65,9 нМ. Соединение К-167 и препарат сравнения способствовали достоверному, дозозависимому снижению концентрации АТФ, что обусловлено их влиянием на внутриклеточный сигнальный каскад. Так, в концентрации 100 мкМ соединение К-167 способствовало снижению пула АТФ из плотных гранул тромбоцитов в 7,4 раза, в то время как ацетилсалициловая кислота – в 2,4 раза. Уровень АТФ при исследовании соединения К-167 и препарата сравнения в концентрации 10 мкМ составил 22,5 и 45,8 нМ соответственно. Дальнейшее снижение концентрации до 1 мкМ образца К-167 позволило установить, что в указанной концентрации соединение способствует снижению секреции АТФ на 14,5%, ацетилсалициловая кислота – на 13,5%. По значению IC₅₀ соединение К-167 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 8,6 раза (таблица 5.10).

Таблица 5.10.

Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на уровень секретируемой АТФ из плотных гранул тромбоцитов *invitro* (M $\pm$ SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования секреции АТФ			IC ₅₀ , мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	К-167	86,2 $\pm$ 3,3*	67,8 $\pm$ 8,9*	14,5 $\pm$ 3,1*	6,7
2.	Ацетилсалициловая кислота	57,8 $\pm$ 7,2*	28,1 $\pm$ 7,7*	13,5 $\pm$ 3,6*	57,8

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

Кальций является ключевым звеном в запуске процессов активации гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов, что приводит к необратимой агрегации кровяных пластинок. Изучение влияния соединения К-167 на уровень внутриклеточного кальция, а также на уровень секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов позволило сделать вывод, о выраженном действии исследуемого вещества на внутриклеточный сигнальный каскад тромбоцитов.

5.5. Изучение влияния соединения К-167 на параметры тромбоэластограммы

Тромбообразование представляет собой сложный процесс, в который вовлечено не только тромбоцитарное звено системы гемостаза, но и коагуляционное, заключающееся во влиянии факторов свертывания крови. Интегральным методом оценки состояния системы гемостаза является метод тромбоэластографии. Комплекс параметров, регистрируемых тромбоэластографом позволяет провести анализ влияния исследуемых соединений на различные звенья системы гемостаза. Так, по показателю R было установлено, что соединение К-167 и препарат сравнения не оказывают выраженного влияния на данный параметр, что позволяет исключить влияние тестируемых веществ на время образования первых нитей фибрина. Коэффициент K, отражающий время достижения максимальной прочности сгустка, увеличивался под действием соединения К-167 более чем, в 2 раза. Достоверно происходило снижение градуса угла альфа под влиянием соединения К-167, что указывает на способность оказывать влияние на кинетику образования сгустка. При действии соединения К-167 процесс формирования сгустка протекает значительно более медленно, чем в группе контроля и препарата сравнения. Достоверным также было снижение максимальной

амплитуды тромбоэластограмм под действием соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты, что указывает на выраженное подавление функциональной активности тромбоцитов.

Таблица 5.11.

Влияние соединения К-167 на показатели тромбоэластограммы при однократном внутривенном введении ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Показатель тромбоэластограммы			
			R, мин	K, мин	Угол α , град.	МА, %
1.	Контроль		7,8 $\pm$ 1,2	4,6 $\pm$ 0,5	51,1 $\pm$ 5,2	63,3 $\pm$ 5,1
2.	К-167	11,2	8,2 $\pm$ 0,8	9,5 $\pm$ 1,6	37,9 $\pm$ 4,0*	33,5 $\pm$ 3,0*
3.	Ацетилсалициловая кислота	92,3	8,0 $\pm$ 0,8	6,6 $\pm$ 1,0	47,5 $\pm$ 5,6	43,8 $\pm$ 3,3*

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA

($p < 0,05$)

Заключение

При действии на тромбоциты АДФ происходит последовательная активация семейства пуриновых рецепторов (P2Y1 и P2Y12) на поверхности кровяных пластинок для достижения полной, необратимой агрегации тромбоцитов [Suzuki T., 2015]. Степень влияния соединения К-167 на активацию тромбоцитов позволяет сделать вывод об отсутствии P2Y1-зависимого механизма антиагрегантного действия у исследуемого вещества. Исследование влияния соединения К-167 на P2Y12 рецептор тромбоцитов, в сравнении с блокатором данного подтипа рецепторов клопидогрелем, также позволяет исключить подобный механизм действия.

Важным этапом является дальнейшая передача сигнала внутрь клетки (outside-in) и активация пути PI3K-Akt-GSK3 β . Результирующим эффектом активации данного комплекса является стимуляция и стабилизация экспрессии гликопротеинов на поверхности тромбоцитов (GP Ib-IX-V, GP VI и др.) [O'Brien K. A., 2012], а также высвобождение ионов Ca²⁺ из внутриклеточного депо, необходимых для активности PLA2 [Burke J. E., 2009].

В местах повреждения сосудов тромбоциты скапливаются и прочно адгезируют к субэндотелиальному матриксу с помощью коллагена. Коллаген является лигандом для тромбоцитарного GP VI, экспрессируемого исключительно на тромбоцитах и мегакариоцитах [Qiao J., 2018]. Сигнальный путь рецептора GPVI сопровождается увеличением активности PLC γ 2, которая в свою очередь катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG). Образующиеся DAG и IP3 активируют протеинкиназу C (PKC) и высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо соответственно [Amelirad A., 2019]. При этом происходит усиление влияний цитозольной PLA2, катализирующей превращение арахидоновой кислоты. Последняя в свою очередь подвергается воздействию ЦОГ-1 и ТхА2-синтазы с образованием мощного проагрегантного вещества тромбоксана A2 [Lopes Pires M. E., 2017; Lucotti S., 2019; Wijeyeratne Y. D., 2011; Amofo E. B., 2022].

Мы показали, что K-167 обладает различной антиагрегантной активностью в зависимости от природы использованного агониста: коллаген > АДФ >> U46619 >> тромбин. Таким образом, наиболее чувствительными к действию K-167 являются рецепторные каскады GPVI и P2Y₁₂, сходящиеся в активации пути PI3K-Akt-GSK3 β [Moroi A. J., 2015; Bye A. P., 2016]. GSK3 β -опосредованный механизм действия K-167 также подтверждается его способностью подавлять секрецию АТФ из α -гранул [Moroi A. J., 2015]. Кроме того, АДФ и коллаген при действии на тромбоциты имеют общие, перекликающиеся пути в системе сигнальных мессенджеров, нацеленные на синтез ТхА2. Ингибирование процессов агрегации тромбоцитов, вызванных данными агонистами, косвенно может свидетельствовать о способности соединения K-167 оказывать влияние на

снижение продукции ТхА₂. Данная способность для исследуемого соединения была подтверждена в эксперименте по определению уровня ТхВ₂, стабильного метаболита ТхА₂, в плазме крови крыс методом ИФА. Кроме того, дозозависимое ингибирование агрегации отмытых тромбоцитов, стимулированных агонистом рецепторов ТхА₂ U46619, может указывать на наличие антагонистического влияния соединения К-167 на тромбоксановые рецепторы, их экспрессию или сигнальный каскад этих рецепторов.

При действии на отмытые тромбоциты раствора тромбина происходит классическая активация PAR-рецепторов (рецепторы, активируемые протеазами) на поверхности тромбоцитов, что указывает на функции этого фактора свертывания крови, выходящие за рамки коагуляционного каскада [ChandrabalanA., 2021]. Тромбин протеолитически расщепляет часть внеклеточной петли этих рецепторов. Являясь мощным индуктором, он опосредует процессы агрегации, мобилизацию кальция и изменение формы тромбоцитов, что в конечном итоге приводит к активации рецептора GP IIb/IIIa и развитию стойкой, необратимой агрегации тромбоцитов [NehajF., 2018]. При этом тромбин способствует активации кровяных пластинок как паракринным, так и аутокринным путем, приводя к мощному высвобождению молекул АДФ из активированных тромбоцитов [KreutzR.P., 2012]. Отсутствие влияния соединения К-167 на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов можно объяснить разнообразием сигнальных каскадов при активации разных подтипов PAR-рецепторов (PAR-1, PAR3 и PAR-4). Наряду с классическим вариантом активации PAR-рецепторов, сопровождающимся передачей сигнала через Gαq/11, Gα12/13 и Gαi/o белки, существует дополнительный β-аррестиновый путь, связанный с повышением активности Rho-киназы. Также установлено, что одновременно при связывании тромбина с гирудин-подобным доменом PAR-1-рецептора происходит активация PAR-3-рецептора, который в свою очередь приводит к расщеплению рецептора PAR-4 и запуску β-аррестинового пути [ChandrabalanA., 2021].

Таким образом, проведенное нами исследование позволяет предположить, что соединение К-167 проявляет антиагрегантные свойства за счет подавления активности сигнальных каскадов рецепторов коллагена и АДФ, а также нарушает секрецию содержимого гранул тромбоцитов при их активации, что, вероятно, опосредовано ингибированием GSK3 β . Механизм снижения продукции ТхА2 и подавления ТхА2-зависимой активации тромбоцитов неясен и требует дополнительного изучения. Также представляется интересным изучение влияния К-167 на стабильность тромба в условиях высоких скоростей сдвига как следствие GSK3 β -опосредованной активации интегрин α IIb β 3.

ГЛАВА 6. АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ К-167

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 необходимо исследовать антитромботическое действие потенциальных антиагрегантных средств на моделях артериальных тромбозов у интактных животных и животных с экспериментальной патологией. Патологические процессы, связанные с тромбообразованием также затрагивают систему нижней полой вены, поскольку анатомически это самый крупный сосуд в организме человека, и он играет главную роль в кровоснабжении правого предсердия. Чаще всего именно в нижней полой вене возникает тромб [Antonio A.Z., 2017] [Aviña-Zubieta A.J., 2017]. Поэтому необходимо было изучить антитромботическую активность на модели венозного тромбоза.

На следующем этапе исследования была проведена оценка антитромбогенных свойств соединения К-167 на различных моделях артериального и венозного тромбозов. В таблице 4 представлены результаты исследования антитромботической активности соединения К-167 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III). В дозе ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* соединение К-167 способствовало пролонгированию времени окклюзии сонной артерии на 114,2%, что послужило основанием для дальнейшего дозозависимого исследования. Снижение дозы до 5,6 и 2,8 мг/кг позволило установить, что в указанных дозах соединение К-67 способствует удлинению времени образования тромба на 57,9 и 22,4%, соответственно. ED₅₀ антитромботической активности для соединения К-167 при этом составила 7,3

мг/кг (таблица 6.1). Препарат сравнения также способствовал дозозависимому пролонгированию времени окклюзии сонной артерии и показатель ED_{50} для ацетилсалициловой кислоты составил 136,6 мг/кг (таблица 6.1).

Важным явилось изучение антитромботической активности в условиях экспериментальной патологии. В качестве последней была выбрана модель инфаркта миокарда, индуцированного изопротеренолом, как модель, сопровождающаяся увеличением тромбогенного потенциала крови. Так, в контрольной группе животных, которым моделировали инфаркт миокарда, наблюдалось достоверное снижение времени окклюзии сонной артерии при воздействии раствора хлорида железа, что подтверждает наличие повышенного тромбообразования при данной патологии. Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота были изучены дозозависимо с последующим расчётом показателя ED_{50} . Для соединения К-167 этот показатель составил 6,5 мг/кг, в то время как для ацетилсалициловой кислоты 118,1 мг/кг (таблица 6.1).

Таблица 6.1.

Антитромботическая активность соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) при однократном внутривенном введении ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии	$\Delta\%$ пролонгирования времени окклюзии сонной артерии	ED_{50} , мг/кг
1.	Контроль		$17,5 \pm 0,5$		
2.	Контроль (инфаркт)		$13,2 \pm 0,7^*$		
3.	К-167	11,2	$32,6 \pm 3,1^*$	$114,2 \pm 20,2^*$	7,3
4.		5,6	$24,0 \pm 0,7^*$	$57,9 \pm 4,7^*$	

5.		2,8	18,6±0,8	22,4±5,3	
6.	К-167 (инфаркт)	11,2	26,3±1,2*	99,5±9,1*	6,5
7.		5,6	18,5±0,4*	40,2±3,2*	
8.		2,8	14,7±0,3	11,1±2,5	
9.	Ацетилсалициловая кислота	184,6	29,3±1,0*	67,6±5,7*	136,6
10.		92,3	23,4±0,7*	33,8±4,1*	
11.		46,2	20,4±0,5*	16,7±2,9*	
12.	Ацетилсалициловая кислота (инфаркт)	184,6	23,2±1,0*	75,5±7,4*	118,1
13.		92,3	19,3±0,7*	46,5±5,4*	
14.		46,2	15,2±0,5	14,9±3,6	

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA

($p < 0,05$)

При моделировании артериального тромбоза воздействием на сонную артерию крыс постоянного электрического тока было установлено, что соединение К-167 в дозе ED_{50} антиагрегантной активности *in vivo* способствует увеличению времени окклюзии на 61,5%, по сравнению с группой контроля. В дозах 5,6 и 2,8 мг/кг исследуемый параметр пролонгировался на 30,7 и 21,6% соответственно. ED_{50} антитромботической активности для соединения К-167 при этом составила 9,0 мг/кг (таблица 6.2). Дозозависимое исследование препарата сравнения позволило установить, что уровень антитромботической активности для ацетилсалициловой кислоты был значительно ниже такого для соединения К-167. ED_{50} антитромботической активности для ацетилсалициловой кислоты при этом составила 98,4 мг/кг (таблица 6.2).

Таблица 6.2.

Антитромботическая активность соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током при однократном внутривенном введении ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии	$\Delta\%$ продления времени окклюзии сонной артерии	ED ₅₀ , мг/кг
15.	Контроль		14,6 $\pm$ 0,7		
16.	К-167	11,2	23,6 $\pm$ 1,3*	61,5 $\pm$ 9,2*	9,0
17.		5,6	19,1 $\pm$ 0,9	30,7 $\pm$ 6,3	
18.		2,8	17,8 $\pm$ 0,7	21,6 $\pm$ 4,8	
19.	Ацетилсалициловая кислота	184,6	27,6 $\pm$ 1,4*	88,9 $\pm$ 9,8*	98,4
20.		92,3	21,8 $\pm$ 0,9*	49,5 $\pm$ 6,0*	
21.		46,2	18,2 $\pm$ 0,8	24,4 $\pm$ 5,7	

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA

($p<0,05$)

Оценка антитромбогенных свойств соединения К-167 была проведена также в венозной системе на модели тромбоза нижней полой вены крыс (таблица 6.3). Так, в контрольной группе животных средняя масса тромбов, извлеченных из нижней полой вены составила 105,6 мг. Соединение К-167 способствовало статистически значимому снижению массы тромбов до 13,7 мг. При однократном внутривенном введении крысам ацетилсалициловой кислоты было установлено, что средняя масса тромбов составляла 82,3 мг.

Таблица 6.3.

Антитромботическая активность соединения К-167 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, мг
1.	Контроль		105,6 $\pm$ 5,5
2.	К-167	11,2	13,7 $\pm$ 5,8 ^{*#}
3.	Ацетилсалициловая кислота	92,3	82,3 $\pm$ 2,4 [*]

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

#- изменения статистически значимы относительно препарата сравнения, критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

Применение антиагрегантных средств сопровождается высоким риском развития кровотечения. Поэтому целесообразным является оценка данного побочного эффекта на доклиническом этапе исследования. На модели изучения времени кровотечения из хвостовой вены мышей было установлено, что в контрольной группе животных среднее время кровотечения составило 133,3 сек. При однократном внутрижелудочном введении соединение К-167 способствовало достоверному увеличению данного параметра в 2,3 раза. Способность пролонгировать время кровотечения безусловно указывает на наличие ингибирующего влияния на процесс тромбообразования. Однако, это может также указывать на риск возникновения кровотечения. Исследование препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты позволило заключить, что она также способствует пролонгации времени кровотечения в 2,3 раза.

Таблица 6.4.

Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на время кровотечения из хвостовой вены мышей при однократном внутрижелудочном введении ($M \pm SEM$) ($n=10$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время кровотечения, сек
4.	Контроль		133,3 $\pm$ 10,9
5.	К-167	11,2	301,3 $\pm$ 10,9 ^{*#}
6.	Ацетилсалициловая кислота	92,3	307,7 $\pm$ 9,2 [*]

*- изменения статистически значимы относительно контроля, критерий one-wayANOVA

($p < 0,05$)

Заключение

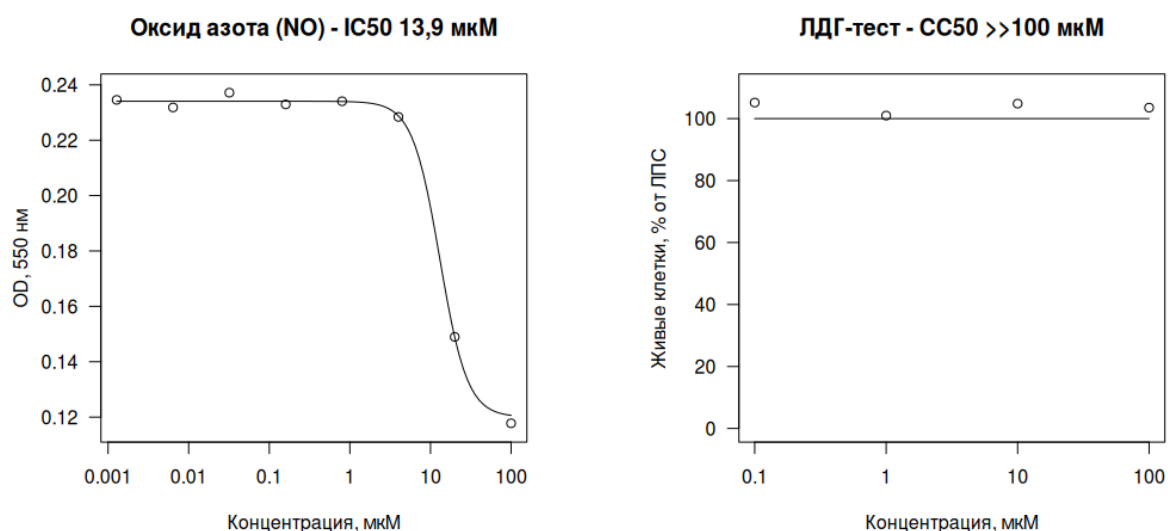
Таким образом, проведенная серия экспериментов по изучению антитромботических свойств соединения К-167 позволяет заключить, что исследуемое соединение превосходит по уровню антитромботической активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту как при моделировании артериального, так и венозного тромбозов. Исследуемое соединение способствует пролонгированию времени кровотечения аналогично ацетилсалициловой кислоте. Сравнимое с референсным препаратом увеличение времени кровотечения и превосходящая антитромботическая активность указывает на более высокую перспективность исследуемого соединения К-167 перед ацетилсалициловой кислотой, как потенциального корректора повышенного тромбогенного потенциала крови.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ К-167 НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СЕПСИСА

7.1. Влияние соединения К-167 на секреторную функцию макрофагов

Для оценки противовоспалительной активности соединения К-167 использовали *in vitro* модель активации макрофагов, индуцированную LPS. Перитонеальные макрофаги были выделены из самцов C57bl/6j мышей и обработаны LPS *E. coli* для индукции M1-поляризации. Дексаметазон использовался как положительный контроль.

Соединение К-167 обладает противовоспалительной активностью, ингибируя синтез оксида азота LPS-стимулированными макрофагами с IC_{50} 13,9 мкМ, а также подавляет секрецию противовоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-альфа с IC_{50} 22,4 мкМ и 16,4 мкМ соответственно. Соединение не вызывало клеточной гибели вплоть до концентрации 100 мкМ.



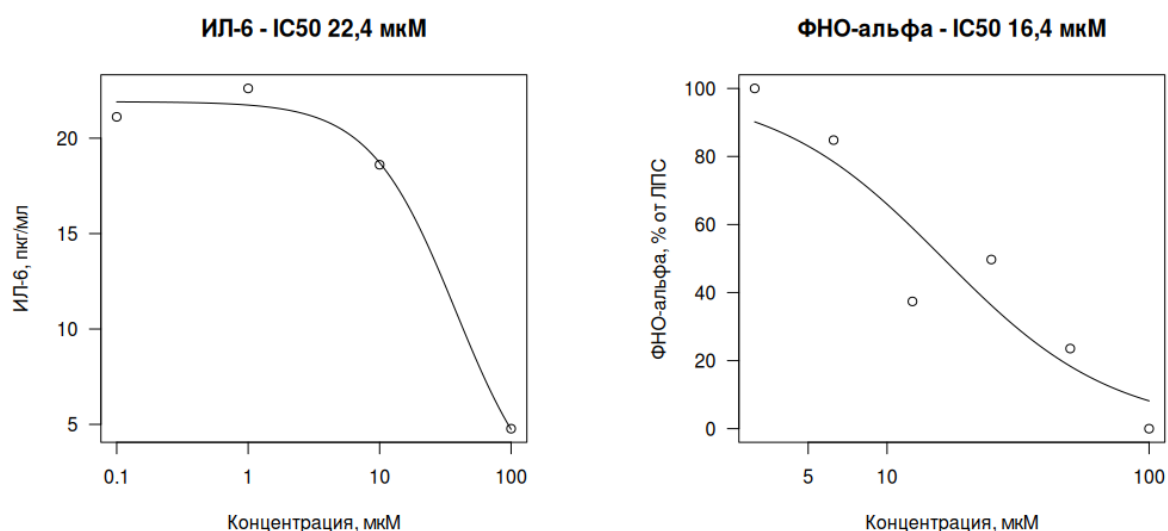


Рисунок 7.1. Влияние соединения К-167 на ЛПС-стимулированные перитонеальные макрофаги.

7.2. Исследование влияния соединения К-167 на параметры тромбоэластограммы крыс в условиях системной воспалительной реакции

Метод тромбоэластографии является показательным интегральным методом оценки состояния системы гемостаза в целом. При внутривенном введении раствора ЛПС было зафиксировано, что липополисахарид способствует достоверному изменению всех параметров тромбоэластограммы. Так, значение R уменьшалось в более чем 2 раза, что свидетельствует о более быстром образовании фибрина и запуске каскада коагуляции. Также наблюдалось снижение значения коэффициента K в 2 раза, что указывает на более быстрое образование стабильного сгустка. В 1,4 раза увеличивалось значение угла альфа, который отражает скорость образования сгустка. Достоверным было и изменение максимальной амплитуды тромбоэластограмм, что говорит об увеличении функциональной активности тромбоцитов (таблица 7.1). Изменения, наблюдаемые в тромбоэластограммах крыс, получавших раствор ЛПС,

свидетельствуют о значительном увеличении тромбогенного потенциала крови в ответ на развивающуюся системную воспалительную реакцию. Изучение влияния соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты в интактных условиях и при экспериментальном сепсисе позволило зафиксировать отсутствие влияния указанных веществ на показатель R и, следовательно, на каскад коагуляции (таблица 7.1). При однократном внутривенном введении соединения К-167 в условиях системной воспалительной реакции наблюдалось значимое увеличение коэффициента K в 3,4 раза, что свидетельствует о способности соединения К-167 замедлять процесс стабилизации сгустка в условиях ЛПС-интоксикации. Ацетилсалициловая кислота также способствовала увеличению данного коэффициента, но в 2,8 раза (таблица 7.1). Угол альфа значительно снижался при действии соединения К-167 в образцах крови животных с экспериментальным сепсисом. По сравнению с контрольной группой животных, внутривенно получавших раствор ЛПС, угол альфа при действии соединения К-167 был в 2,4 раза меньше. При действии ацетилсалициловой кислоты в тех же условиях наблюдалось незначительное снижение угла альфа в 1,4 раза (таблица 7.1). Анализ тромбоэластограмм позволил также зафиксировать выраженное влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на функциональную активность тромбоцитарного звена системы гемостаза. Так, значение максимальной амплитуды тромбоэластограмм достоверно снижалось при действии соединения К-167 в 2,3 раза по сравнению с контрольными значениями в условиях экспериментального сепсиса. Ацетилсалициловая кислота способствовала снижению максимальной амплитуды в 1,4 раза (таблица 7.1).

Таблица 7.1.

Влияние соединения К-167 на показатели тромбоэластограммы при однократном внутривенном введении ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Показатель тромбоэластограммы			
			R, мин	K, мин	Угол α , град.	МА, %
1.	Контроль (интакт)		$7,8 \pm 1,2$	$4,6 \pm 0,5$	$51,1 \pm 5,2$	$63,3 \pm 5,1$
2.	Контроль (ЛПС)		$3,8 \pm 0,4^*$	$2,8 \pm 0,5^*$	$69,6 \pm 2,8^*$	$73,7 \pm 3,1^*$
3.	К-167 (интакт)	11,2	$8,2 \pm 0,8$	$9,5 \pm 1,6^*$	$37,9 \pm 4,0^*$	$33,5 \pm 3,0^*$
4.	К-167 (ЛПС)		$4,9 \pm 0,8$	$9,6 \pm 2,3^\#$	$28,5 \pm 4,2^\#$	$31,9 \pm 4,1^\#$
5.	Ацетилсалициловая кислота (интакт)	92,3	$8,0 \pm 0,8$	$6,6 \pm 1,0^*$	$47,5 \pm 5,6^*$	$43,8 \pm 3,3^*$
6.	Ацетилсалициловая кислота (ЛПС)		$4,3 \pm 0,7$	$7,8 \pm 2,1^\#$	$50,0 \pm 3,1^\#$	$51,8 \pm 5,1^\#$

*- изменения статистически значимы относительно интактного контроля, критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

#- изменения статистически значимы относительно контроля (ЛПС), критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

Таким образом, методом тромбоэластографии было установлено, что при внутривенном введении раствор ЛПС способствует увеличению тромбогенного потенциала крови, о чем свидетельствует сокращение времени образования нитей фибрина и момента стабилизации сгустка в 2 раза, а также увеличение угла наклона графиков и максимальной амплитуды. Соединение К-167 способствовало значимому увеличению коэффициента K, отражающего время образования стабильного сгустка, уменьшению угла наклона графиков и максимальной амплитуды, что указывает на способность снижать тромбогенный потенциал крови. Причем, эффект в отношении системы гемостаза соединения К-167 оказывает как в нормальных условиях, так и в условиях экспериментального сепсиса.

7.3. Влияние соединения К-167 на уровень эндотелина-1 и фактора Виллебранда в плазме крыс с экспериментальным сепсисом

Внутривенное введение крысам липополисахарида в дозе 2 мг/кг приводит к развитию дисфункции эндотелия [Piechota-Polańczyk A., 2012; Abdul Y., 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].

При моделировании экспериментального сепсиса было установлено, что уровень эндотелина-1 в плазме крови крыс статистически значимо увеличивался в 16,1 раза, что свидетельствует о развитии дисфункции эндотелия у крыс. В группе животных без системной воспалительной реакции введение соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты не способствовало изменению уровня эндотелина-1. На фоне экспериментального сепсиса было зафиксировано, что исследуемое соединение К-167 способствовало достоверному снижению уровня эндотелина-1 на 48% (таблица 5.11), в то время как препарат сравнения не оказывал влияния на уровень исследуемого маркера.

Таблица 7.2.

Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на уровень эндотелина-1 в плазме крови крыс при однократном внутрижелудочном введении без и в условиях системной воспалительной реакции ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень эндотелина-1, пкг/мл
1.	Контроль (интакт)		$0,9 \pm 0,3$
2.	Контроль (ЛПС)		$14,5 \pm 0,5^*$
3.	К-167 (интакт)	11,2	$0,8 \pm 0,02$

4.	К-167 (ЛПС)		$7,5 \pm 0,4^{*#}$
5.	Ацетилсалициловая кислота (интакт)	92,3	$0,8 \pm 0,03$
6.	Ацетилсалициловая кислота (ЛПС)		$14,3 \pm 0,3^*$

*- изменения статистически значимы относительно интактного контроля, критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

#- изменения статистически значимы относительно контроля (ЛПС), критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

При использовании модели ЛПС-индуцированной интоксикации у крыс, было обнаружено, что количественное содержание фактора Виллебранда (vWF) в плазме животных с гиперцитокинемией достоверно увеличивалось на 56,2% по сравнению с интактной группой животных (таблица 7.3). Такое увеличение концентрации vWF подтверждает развитие эндотелиальной дисфункции в ответ на внутривенное введение токсина ЛПС. Принимая во внимание наличие гликопротеина Ib-IX-V на поверхности мембран тромбоцитов, резкое увеличение содержания vWF в плазме крови также указывает на повышенный риск тромбоза на фоне системной воспалительной реакции. Однократное внутрижелудочное введение соединения К-167 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты крысам не способствовало значимому изменению уровня vWF у интактных животных. На фоне экспериментального сепсиса соединение К-167 способствовало снижению уровня vWF на 56,5% по сравнению со значениями, полученными в группе положительного контроля (таблица 7.3). Препарат сравнения в условиях интоксикации способствовал снижению концентрации исследуемого маркера на 13,7% (таблица 7.3).

Таблица 7.3.

Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на уровень фактора Виллебранда в плазме крови крыс при однократном внутрижелудочном введении без и в условиях системной воспалительной реакции ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень vWF, нг/мл
1	Контроль (интакт)		$88,3 \pm 8,8$
2	Контроль (ЛПС)		$137,9 \pm 12,2^*$
3	К-167 (интакт)	11,2	$79,9 \pm 2,8$
4	К-167 (ЛПС)		$60,0 \pm 6,6^\#$
5	Ацетилсалициловая кислота (интакт)	92,3	$83,0 \pm 1,6$
6	Ацетилсалициловая кислота (ЛПС)		$119,0 \pm 12,1$

*- изменения статистически значимы относительно интактного контроля, критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

#- изменения статистически значимы относительно контроля (ЛПС), критерий one-wayANOVA ($p < 0,05$)

Таким образом, проведенное исследование позволило обнаружить у соединения К-167 способности статистически значимо снижать продукцию эндотелина-1 и vWF – маркеров эндотелиальной дисфункции, что позволяет предполагать наличие у исследуемого вещества эндотелиопротективных свойств, а также способности снижать риск тромбообразования в участках поврежденного эндотелия вследствие сепсиса.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Артериальные тромбозы часто служат причиной внезапной сердечной смерти, инфаркта миокарда, сосудистых осложнений сахарного диабета, снижают эффективность эндоваскулярного и чрескожного коронарного вмешательства [Петров В.И., 2019; Шляхто Е.В., 2021; AlfiY., 2017; BalaM.M., 2020; BhattD.L., 2020; AjjanR.A., 2021]. Киназа гликогенсинтазы типа 3В является регулятором функциональной активности тромбоцитов и перспективной мишенью антитромботической терапии. В результате исследования был выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3B – 3-арилиден-2-оксиндолы. Среди испытанных соединений выявлено 16 ингибиторов GSK3B, из них 4 – с субмикромольной активностью. Наиболее активное соединение 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (К-167) показало IC_{50} 4,19 нМ.

Поэтому было изучено антитромбогенное действие соединения К-167 на различных моделях артериальных и венозного тромбозов. В результате изучения влияния соединения К-167 на процессы тромбообразования, установлена его высокая антитромботическая активность при однократном внутрижелудочном способе введения на всех изученных моделях тромбозов. Так, на моделях артериального тромбоза, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и постоянного электрического тока было показано, что по значению ED_{50} соединение К-167 значительно превосходило по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту.

Важной составляющей доклинического изучения потенциальных антиагрегантных средств является исследование их активности при экспериментальной патологии [Миронов А.Н., 2012; MajithiaA., 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 К-167 была выявлена его высокая активность при однократном внутрижелудочном введении, превосходящая действие данного тестируемого образца в интактных условиях. Таким образом было показано, что соединение К-167 проявляет выраженное антитромботическое действие не только на интактных животных, но и в условиях экспериментальной патологии, сопровождающейся повышением тромбогенного потенциала крови.

Формирование венозных тромбов чаще всего затрагивает нижнюю полую вену, поскольку анатомически это самый крупный сосуд в организме человека, и он играет главную роль в кровоснабжении правого предсердия [Ройтман Е.В., 2015; TimpJ.F., 2019; AnghelL., 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 К-167 способствует уменьшению средней массы венозных тромбов по сравнению со значениями, полученными в контроле и при этом превосходит по антитромботической активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 6 раз.

Таким образом, соединение К-167 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, модель исследования времени кровотечения позволяет оценить выраженность возникновения данного побочного эффекта. При изучении влияния соединения К-167 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на время кровотечения из хвостовой вены мышей при однократном внутрижелудочном введении, наблюдалось дозозависимое удлинение данного показателя. Соединение К-167 по влиянию на

данный параметр было сопоставимо с препаратом сравнения, что также указывает на антитромбоцитарный эффект, но с другой стороны – на возможность проявления побочного эффекта в виде кровотечений, что безусловно характерно для антитромбоцитарной терапии.

В результате проведенных экспериментальных исследований по изучению механизма антиагрегантного действия соединения К-167 было установлено, что антитромбоцитарный эффект исследуемое вещество реализует через ингибирование внутриклеточного сигнального каскада тромбоцитов, сопровождающегося секрецией тромбоксана А₂, а также проявляя антагонистическое действие в отношении рецепторов к тромбоксану А₂ на поверхности тромбоцитов.

Проведенное исследование также позволило подтвердить наличие высокого тромбогенного потенциала крови в условиях экспериментального сепсиса, о чем свидетельствуют данные тромбоэластографии и уровень маркеров дисфункции эндотелия. В условиях системной воспалительной реакции соединение К-167 способствовало достоверному снижению тромбогенного потенциала крови, превосходя по активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту.

ВЫВОДЫ

1. Химический класс производных 2-оксиндола является перспективным для поиска и создания на его основе новых антиагрегантных средств, ингибиторов киназы GSK-3 β . Наибольшая GSK3 β -ингибирующая активность наблюдается при наличии 3-арилиденового заместителя.
2. Выявлено соединение К-167, превосходящее по антиагрегантной активности ацетилсалициловую кислоту в опытах *invitro* в 10,2 раза, а в тестах *in vivo* в 8,2 раза.
3. Показано, что соединение К-167 подавляет ЛПС-стимулированную воспалительную активацию макрофагов, ингибирует образование оксида азота, секрецию ИЛ-6 и ФНО-альфа с IC₅₀ мкМ, обладая низкой цитотоксичностью (CC₅₀>100 мкМ).
4. В результате исследования острой токсичности соединения К-167 было установлено, что данное вещество относится к 3 классу низкотоксичных соединений. По значению УТИ соединение К-167 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 21 раз.
5. Детальное изучение влияния соединения К-167 на различные звенья системы гемостаза позволило заключить, что соединение К-167 оказывает выраженное антитромбоцитарное действие путем подавления внутриклеточного сигнального пути PI3K-Akt-GSK3 β , что сопровождается снижением уровня, секретируемого тромбоксана А2. Дополнительно было установлено, что соединение К-167 может оказывать антагонистическое действие в отношении тромбоксановых рецепторов на поверхности тромбоцитов.
6. На модели артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III) и электрическим током установлено, что соединение К-167 превосходит по активности ацетилсалициловую кислоту в 18,7 и 11 раз соответственно.

7. В условиях экспериментального инфаркта миокарда уровень антитромботической активности для соединения К-167 превосходил таковой для ацетилсалициловой кислоты в 18,2 раза.

8. По способности предотвращать тромбообразование в венозной системе соединение К-167 превосходило ацетилсалициловую кислоту в 6 раз.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразным является дальнейший синтез новых производных 2-оксиндола с разными заместителями с целью оптимизации их GSK3B-ингибирующих и антиагрегантных свойств.
2. Созданная методология изучения антиагрегантных средств может быть использована для поиска и создания высокоэффективных корректоров нарушений в системе гемостаза, в том числе в условиях сепсиса.
3. Соединение К-167 является высокоэффективным антиагрегантным средством. По уровню антиагрегантной и антитромботической активности соединение К-167 превосходит референсный препарат ацетилсалициловую кислоту. Проведенное исследование позволяет заключить, что представляется целесообразным дальнейшее углубленное доклиническое изучение фармакологических свойств соединения К-167.

Список литературы

1. Бойцов С.А., Погосова Н.В., Аншелес А.А. и др. Кардиоваскулярная профилактика 2022. российские национальные рекомендации. Российский кардиологический журнал. 2023. Т. 28. № 5. С. 119-249. doi: 10.15829/1560-4071-2023-5452
2. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения// Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37. — № 3. — С. 32–34.
3. Домбровский М.М., Никитина Т.Г., Самсонова Н.Н., Петросян К.В., Алекян 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. Т. 2. № 1. С. 10-15.
4. 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.-27(5). С. 505-514. doi: 10.18484/2305-0047.2019.5.505
5. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М., Дрозд Н.Н., Свистунов А.А., Кучерявенко А.Ф., Малыхина Л.С., Науменко Л.В., Неведрова О.Е., Петрухина Н., Алиев О.И., Плотникова Т.М. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз. В книге: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России. Москва, 2012. С. 453-479.
6. 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.

7. Петров В.И., Шаталова О.В., Герасименко А.С., Горбатенко В.С. Сравнительный анализ антитромботической терапии у пациентов с фибрилляцией предсердий. Рациональная фармакотерапия в кардиологии.-2019.-15(1).-С. 49-53.
8. Ройтман Е.В. Современная профилактика венозных тромбоэмболических осложнений. Доказательность и обоснованность. В книге: противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы. Тезисы.-2015.-С.145-146.
9. Сакаев, М.Р. Изучение влияния некоторых синаптотропных веществ на тромбоцитарную активность: дис. канд. биол. наук: 14.00.25 /Сакаев Марат Рустамович. – СПб., 2000. – 115с.
10. Саноцкий И.В., Уланова И.П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. - М.: «Медицина», 1975. -327 с.77.
11. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Сиротенко В.С., Гайдукова К.А., Халиуллин Ф.А. Антиагрегантная активность ангипура на моделях артериального и венозного тромбоза. Эксп. и клин. фармакол. 84 (9) : 20–23. 2021.
12. 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.-26(12).-С. 154-162.
13. 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. 98 (9) : 596–603. 2020.
14. Abraham N.S., Barkun A.N., Sauer B.G., Douketis J., Laine L., Noseworthy P.A., Telford J.J., Leontiadis G.I. American College of Gastroenterology-Canadian Association of Gastroenterology Clinical Practice Guideline: Management of Anticoagulants and Antiplatelets During Acute Gastrointestinal Bleeding and the Periendoscopic Period. Am J Gastroenterol. 117 (4) : 542–558. 2022.
15. Agita A., Alsagaff M.T. Inflammation, Immunity, and Hypertension. Acta Med Indones. 49 (2) : 158–165. 2017.
16. 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? *European Heart Journal*. 42 (23) : 2235–2259. 2021.

17. 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.* 7 (S3) : S197–S206. 2017.

18. Alkarithi G., Duval C., Shi Y., Macrae F.L., Ariëns R.A.S. Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease. *ATVB*. 41 (9) : 2370–2383. 2021.

19. Allahham M., Lerman A., Atar D., Birnbaum Y. Why Not Dipyridamole: a Review of Current Guidelines and Re-evaluation of Utility in the Modern Era. *Cardiovasc Drugs Ther.* 36 (3) : 525–532. 2022.

20. Amelirad A., Shamsasenjan K., Akbarzadehlaleh P., Pashoutan Sarvar D. Signaling Pathways of Receptors Involved in Platelet Activation and Shedding of These Receptors in Stored Platelets. *Adv Pharm Bull.* 9 (1) : 38–47. 2019.

21. Amofo E.B., Entsie P., Albayati S., Dorsam G.P., Kunapuli S.P., Kilpatrick L.E., Liverani E. Sex-related differences in the response of anti-platelet drug therapies targeting purinergic signaling pathways in sepsis. *Front. Immunol.* 13 : 1015577. 2022.

22. Anghel L., Sascău R., Radu R., Stătescu C. From Classical Laboratory Parameters to Novel Biomarkers for the Diagnosis of Venous Thrombosis. *IJMS*. 21 (6) : 1920. 2020.

23. Angiolillo D.J., Bhatt D.L., Cannon C.P., Eikelboom J.W., Gibson C.M., Goodman S.G., Granger C.B., Holmes D.R., Lopes R.D., Mehran R., Moliterno D.J., Price M.J., Saw J., Tanguay J.-F., Faxon D.P. Antithrombotic Therapy in Patients With Atrial Fibrillation Treated With Oral Anticoagulation Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: A North American Perspective: 2021 Update. *Circulation*. 143 (6) : 583–596. 2021.

24. Armstrong P.C.J., Leadbeater P.D., Chan M.V., Kirkby N.S., Jakubowski J.A., Mitchell J.A., Warner T.D. In the presence of strong P2Y₁₂ receptor blockade, aspirin provides little additional inhibition of platelet aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 9 (3) : 552–561. 2011.

25. Aviña-Zubieta J.A., Jansz M., Sayre E.C., Choi H.K. The Risk of Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Primary Sjögren Syndrome: A General

Population-based Study. *J Rheumatol.* 44 (8) : 1184–1189. 2017

26. 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 of Systematic Reviews* / подред. Cochrane Stroke Group. 2020 (10). 2020.
27. Bennett J.S., Berger B.W., Billings P.C. The structure and function of platelet integrins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 7 : 200–205. 2009.
28. Berger M., Lutz D., Lutz J., Khalil J., Aburima A., Naseem K., Rivero F. Alterations in Platelet Alpha-Granule Secretion and Adhesion on Collagen under Flow in Mice Lacking the Atypical Rho GTPase RhoBTB3. *Cells.* 8 (2) : 149. 2019.
29. Boncler M., Bartczak K., Rozalski M. Potential for modulation of platelet function via adenosine receptors during inflammation. *British J Pharmacology.* bph.16146. 2023.
30. Buyukyilmaz G., Soyer O.U., Buyuktiryaki B., Alioglu B., Dallar Y. Platelet aggregation, secretion, and coagulation changes in children with asthma. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 25 (7) : 738–744. 2014.
31. Bester J., Pretorius E. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. *Sci Rep.* 6 (1) : 32188. 2016.
32. Bhatt D.L., Eikelboom J.W., Connolly S.J., Steg P.G., Anand S.S., Verma S., Branch K.R.H., Probstfield J., Bosch J., Shestakovska O., Szarek M., Maggioni A.P., Widimský P., Avezum A., Diaz R., Lewis B.S., Berkowitz S.D., Fox K.A.A., Ryden L., Yusuf S., Aboyans V., Alings M., Commerford P., Cook-Bruns N., Dagenais G., Dans A., Ertl G., Felix C., Guzik T., Hart R., Hori M., Kakkar A., Keltai K., Keltai M., Kim J., Lamy A., Lanus F., Liang Y., Liu L., Lonn E., Lopez-Jaramillo P., Metsarinne K., Moayyedi P., O'Donnell M., Parkhomenko A., Piegas L., Pogossova N., Sharma M., Stoerk S., Tonkin A., Torp-Pedersen C., Varigos J., Verhamme P., Vinereanu D., Yusoff K., Zhu J. Role of Combination Antiplatelet and Anticoagulation Therapy in Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Insights From the COMPASS Trial. *Circulation.* 141 (23) : 1841–1854. 2020.
33. Burke J.E., Dennis E.A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and

signaling. *Journal of Lipid Research*. 50 : S237–S242. 2009.

34. Bye A.P., Unsworth A.J., Gibbins J.M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 14 (5) : 918–930. 2016.

35. Cameron-Vendrig A., Rehemian A., Siraj M.A., Xu X.R., Wang Y., Lei X., Afroze T., Shikatani E., El-Mounayri O., Noyan H., Weissleder R., Ni H., Husain M. Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Activation Attenuates Platelet Aggregation and Thrombosis. *Diabetes*. 65 (6) : 1714–1723. 2016.

36. 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*. 89 (5) : 926–931. 2020.

37. Cattaneo M., Lecchi A. Inhibition of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate potentiates the antiplatelet effect of prostacyclin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5 (3) : 577–582. 2007.

38. Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 117 (7) : 2102–2112. 2011.

39. Chan M.V., Knowles R.B.M., Lundberg M.H., Tucker A.T., Mohamed N.A., Kirkby N.S., Armstrong P.C.J., Mitchell J.A., Warner T.D. P2Y₁₂ receptor blockade synergizes strongly with nitric oxide and prostacyclin to inhibit platelet activation: NO and PGI₂ synergize with P2Y₁₂ receptor blockade. *Br J Clin Pharmacol*. 81 (4) : 621–633. 2016.

40. Chandrabalan A., Ramachandran R. Molecular mechanisms regulating Proteinase- Activated Receptors (PARs). *FEBS J*. 288 (8) : 2697–2726. 2021.

41. Chauhan A.K., Kisucka J., Brill A., Walsh M.T., Scheifflinger F., Wagner D.D. ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 205 (9) : 2065–2074. 2008.

42. Chen C.X., Jin R.M., Li Y.K., Zhong J., Yue L., Chen S.C., Zhou J.Y. Inhibitory effect of rhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 13 (2) : 126–130. 1992.

43. 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.* 22 (1) : 75. 2022.

44. Chen J., López J.A. Interactions of Platelets with Subendothelium and Endothelium. *Microcirculation.* 12 (3) : 235–246. 2005.

45. Chen X., Jiang W., Liu Y., Ma Z., Dai J. Anti-inflammatory action of geniposide promotes wound healing in diabetic rats. *Pharmaceutical Biology.* 60 (1) : 294–299. 2022.

46. Chen Z., Li T., Kareem K., Tran D., Griffith B.P., Wu Z.J. The role of PI3K/Akt signaling pathway in non- physiological shear stress- induced platelet activation. *Artif Organs.* 43 (9) : 897–908. 2019.

47. 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.* 12 : 688802. 2021.

48. Collier B.S. Historical perspective and future directions in platelet research. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 9 : 374–395. 2011.

49. Cooper D., Russell J., Chitman K.D., Williams M.C., Wolf R.E., Granger D.N. Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 286 (5) : H1895–H1900. 2004.

50. Costa F., Montalto C., Branca M., Hong S.-J., Watanabe H., Franzone A., Vranckx P., Hahn J.-Y., Gwon H.-C., Feres F., Jang Y., De Luca G., Kedhi E., Cao D., Steg P.G., Bhatt D.L., Stone G.W., Micari A., Windecker S., Kimura T., Hong M.-K., Mehran R., Valgimigli M. Dual antiplatelet therapy duration after percutaneous coronary intervention in high bleeding risk: a meta-analysis of randomized trials. *European Heart Journal.* 44 (11) : 954–968. 2023.

51. Czeleń P., Szeffler B. The Oxindole Derivatives, New Promising GSK-3 β Inhibitors as One of the Potential Treatments for Alzheimer's Disease—A Molecular Dynamics Approach. *Biology.* 10 (4) : 332. 2021.

52. Dawson J., Béjot Y., Christensen L.M., De Marchis G.M., Dichgans M., Hagberg G., Heldner M.R., Millionis H., Li L., Pezzella F.R., Taylor Rowan M., Tiu C., Webb A.

European Stroke Organisation (ESO) guideline on pharmacological interventions for long-term secondary prevention after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *European Stroke Journal*. 7 (3) : I–XLI. 2022.

53. DeHelian D., Gupta S., Wu J., Thorsheim C., Estevez B., Cooper M., Litts K., Lee-Sundlov M.M., Hoffmeister K.M., Poncz M., Ma P., Brass L.F. RGS10 and RGS18 differentially limit platelet activation, promote platelet production, and prolong platelet survival. *Blood*. 136 (15) : 1773–1782. 2020.

54. Dey P., Kundu A., Han S.H., Kim K.-S., Park J.H., Yoon S., Kim I.S., Kim H.S. Biological Evaluation of Oxindole Derivative as a Novel Anticancer Agent against Human Kidney Carcinoma Cells. *Biomolecules*. 10 (9) : 1260. 2020.

55. Dong J. - F. Cleavage of ultra- large von Willebrand factor by ADAMTS- 13 under flow conditions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3 (8) : 1710–1716. 2005.

56. Eremeev R.O., Beznos O.V., Efremov A.M., Chesnokova N.B., Lozinskaya N.A. The rational design of novel 5-amino-2-oxindole derivatives with antiglaucomic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 90 : 129334. 2023.

57. Farndale R.W. Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 36 (2) : 162–165. 2006.

58. Farndale R.W., Siljander P.R., Onley D.J., Sundaresan P., Knight C.G., Barnes M.J. Collagen-platelet interactions: recognition and signalling. *Biochem Soc Symp.* (70) : 81–94. 2003.

59. Flaumenhaft R., Furie B., Zwicker J.I. Therapeutic Implications of Protein Disulfide Isomerase Inhibition in Thrombotic Disease. *ATVB*. 35 (1) : 16–23. 2015.

60. Fuentes R.E., Zaitsev S., Ahn H.S., Hayes V., Kowalska M.A., Lambert M.P., Wang Y., Siegel D.L., Bougie D.W., Aster R.H., Myers D.D., Stepanova V., Cines D.B., Muzykantov V.R., Poncz M. A chimeric platelet-targeted urokinase prodrug selectively blocks new thrombus formation. *Journal of Clinical Investigation*. 126 (2) : 483–494. 2015.

61. Furie B., Flaumenhaft R. Thiol Isomerases in Thrombus Formation. *Circ Res*. 114 (7) : 1162–1173. 2014.

62. Galli M., Benenati S., Franchi F., Rollini F., Capodanno D., Biondi-Zoccai G., Vescovo G.M., Cavallari L.H., Bikdeli B., ten Berg J., Mehran R., Gibson C.M., Crea F., Pereira N.L., Sibbing D., Angiolillo D.J. Comparative effects of guided vs. potent P2Y₁₂ inhibitor therapy in acute coronary syndrome: a network meta-analysis of 61 898 patients from 15 randomized trials. *European Heart Journal*. 43 (10) : 959–967. 2022.
63. Gao W., Wang K., Zhang L., Li J., Liu J., Chen X., Luo X. Pharmacological inhibition of S6K1 facilitates platelet activation by enhancing Akt phosphorylation. *Platelets*. 30 (2) : 241–250. 2019.
64. Garcia C.A., Wang H., Benakanakere M.R., Barrett E., Kinane D.F., Martin M. c-Jun Controls the Ability of IL-12 to Induce IL-10 Production from Human Memory CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 183 (7) : 4475–4482. 2009.
65. Golebiewska E.M., Poole A.W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*. 29 (3) : 153–162. 2015.
66. Goto S., Ikeda Y., Saldívar E., Ruggeri Z.M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J. Clin. Invest*. 101 (2) : 479–486. 1998.
67. Goto S. Cilostazol: Potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atherosclerosis Supplements*. 6 (4) : 3–11. 2005.
68. Greene T.K., Schiviz A., Hoellriegl W., Poncz M., Muchitsch E.-M., Animal Models Subcommittee of the Scientific And Standardization Committee Of The Isth. Towards a standardization of the murine tail bleeding model. *J Thromb Haemost*. 8 (12) : 2820–2822. 2010.
69. Gremmel T., Yanachkov I.B., Yanachkova M.I., Wright G.E., Wider J., Undyala V.V.R., Michelson A.D., Frelinger A.L., Przyklenk K. Synergistic Inhibition of Both P2Y₁ and P2Y₁₂ Adenosine Diphosphate Receptors As Novel Approach to Rapidly Attenuate Platelet-Mediated Thrombosis. *ATVB*. 36 (3) : 501–509. 2016.
70. Gryglewski R.J. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep*. 60 (1) : 3–11. 2008.

71. Guglielmi G., Viñuela F., Dion J., Duckwiler G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience. *J Neurosurg.* 75 (1) : 8–14. 1991.
72. 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.* 13 (4) : 192–197. 2008.
73. Hoffmeister L., Diekmann M., Brand K., Huber R. GSK3: A Kinase Balancing Promotion and Resolution of Inflammation. *Cells.* 9 (4) : 820. 2020.
74. 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.* 12 (1) : 549. 2021.
75. Iqbal A.M., Lopez R.A., Hai O. Antiplatelet Medications. StatPearls. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing. 2022.
76. Jensen M.S., Larsen O.H., Christiansen K., Fenger- Eriksen C., Ingerslev J., Sørensen B. Platelet activation and aggregation: the importance of thrombin activity—A laboratory model. *Haemophilia.* 19 (3) : 403–408. 2013.
77. Jin B., Chen J., Sheng Z., Sun M., Yang H. Synthesis, Antibacterial and Anthelmintic Activity of Novel 3-(3-Pyridyl)-oxazolidinone-5-methyl Ester Derivatives. *Molecules.* 27 (3) : 1103. 2022.
78. 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. *International Journal of Molecular Medicine.* 40 (4) : 1019–1028. 2017.
79. Kamarova M., Baig S., Patel H., Monks K., Wasay M., Ali A., Redgrave J., Majid A., Bell S.M. Antiplatelet Use in Ischemic Stroke. *Ann Pharmacother.* 56 (10) : 1159–1173. 2022.
80. Kamel S., Horton L., Ysebaert L., Levade M., Burbury K., Tan S., Cole-Sinclair M., Reynolds J., Filshie R., Schischka S., Khot A., Sandhu S., Keating M.J., Nandurkar H., Tam C.S. Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia.* 29 (4) : 783–787. 2015.

81. Kauskot A., Adam F., Mazharian A., Ajzenberg N., Berrou E., Bonnefoy A., Rosa J.-P., Hoylaerts M.F., Bryckaert M. Involvement of the Mitogen-activated Protein Kinase c-Jun NH2-terminal Kinase 1 in Thrombus Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 282 (44) : 31990–31999. 2007.
82. Khandoga A., Biberthaler P., Enders G., Axmann S., Hutter J., Messmer K., Krombach F. Platelet adhesion mediated by fibrinogen- α IIb β 3 intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo: Transplantation. 74 (5) : 681–688. 2002.
83. Khetmalis Y.M., Shivani M., Murugesan S., Chandra Sekhar K.V.G. Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 141 : 111842. 2021.
84. Khodadi E. Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules. *Cardiovasc Toxicol*. 20 (1) : 1–10. 2020.
85. Kirkby N.S., Lundberg M.H., Chan M.V., Vojnovic I., Solomon A.B., Emerson M., Mitchell J.A., Warner T.D. Blockade of the purinergic P2Y₁₂ receptor greatly increases the platelet inhibitory actions of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (39) : 15782–15787. 2013.
86. Klammer G., Song E., Ko K.-H., O'Brien T.A., Dolnikov A. Using Small Molecule GSK3 β Inhibitors to Treat Inflammation. *CMC*. 17 (26) : 2873–2881. 2010.
87. Ko R., Lee S.Y. Glycogen synthase kinase 3 β in Toll-like receptor signaling. *BMB Reports*. 49 (6) : 305–310. 2016.
88. Koltai K., Kesmarky G., Feher G., Tibold A., Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *IJMS*. 18 (8) : 1803. 2017.
89. Konstantinides S., Ware J., Marchese P., Almus-Jacobs F., Loskutoff D.J., Ruggeri Z.M. Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ib α and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4 (9) : 2014–2021. 2006.
90. Kreutz R.P., Breall J.A., Kreutz Y., Owens J., Lu D., Bolad I., von der Lohe E., Sinha A., Flockhart D.A. Protease activated receptor-1 (PAR-1) mediated platelet

aggregation is dependant on clopidogrel response. *Thrombosis Research*. 130 (2) : 198–202. 2012.

91. Kubica J., Kozinski M., Navarese E.P., Tantry U., Kubica A., Siller-Matula J.M., Jeong Y.-H., Fabiszak T., Andruszkiewicz A., Gurbel P.A. Cangrelor: an emerging therapeutic option for patients with coronary artery disease. *Current Medical Research and Opinion*. 30 (5) : 813–828. 2014.

92. Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 60 (4) : 269–280. 1990.

93. Kwon H.-W., Shin J.-H., Lim D.H., Ok W.J., Nam G.S., Kim M.J., Kwon H.-K., Noh J.-H., Lee J.-Y., Kim H.-H., Kim J.-L., Park H.-J. Antiplatelet and antithrombotic effects of cordycepin-enriched WIB-801CE from *Cordyceps militaris* ex vivo, in vivo, and in vitro. *BMC Complement Altern Med*. 16 (1) : 508. 2016.

94. Laffan M., Brown S.A., Collins P.W., Cumming A.M., Hill F.G.H., Keeling D., Peake I.R., Pasi K.J. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 10 (3) : 199–217. 2004.

95. Laurent P.-A., Severin S., Gratacap M.-P., Payrastre B. Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1. *Advances in Biological Regulation*. 54 : 162–174. 2014.

96. Laurent P.-A., Séverin S., Hechler B., Vanhaesebroeck B., Payrastre B., Gratacap M.-P. Platelet PI3K β and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate. *Blood*. 125 (5) : 881–888. 2015.

97. Li D., August S., Woulfe D.S. GSK3 β is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood*. 111 (7) : 3522–3530. 2008.

98. Li J., Vootukuri S., Shang Y., Negri A., Jiang J., Nedelman M., Diacovo T.G., Filizola M., Thomas C.J., Collier B.S. RUC-4: A Novel α IIb β 3 Antagonist for Prehospital Therapy of Myocardial Infarction. *ATVB*. 34 (10) : 2321–2329. 2014.

99. Li K.-L., Lin Y.-C. PM2.5 induced cardiac hypertrophy via CREB/GSK3 β /SOS1 pathway and metabolomics alterations. *Oncotarget*. 9 (56) : 30748–30760. 2018.

100. Liao S., Wu E.L., Neidlin M., Li Z., Simpson B., Gregory S.D. The Influence of Rotary Blood Pump Speed Modulation on the Risk of Intraventricular Thrombosis.

Artificial Organs. 42 (10) : 943–953. 2018.

101. Liu D., Zhuang M., Zhang J., Chen J., Sun B. [Study of exogenous carbon monoxide-releasing molecules 2 on endotoxin/lipopolysaccharide-induced abnormal activation of platelets of healthy human donors]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 31 (5) : 354–360. 2015.

102. Lopes Pires M.E., Clarke S.R., Marcondes S., Gibbins J.M. Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling. *PLoS ONE* / под ред. Ahrens I. 12 (11) : e0186981. 2017.

103. Lozinskaya N.A., Babkov D.A., Zaryanova E.V., Bezsonova E.N., Efremov A.M., Tsymlyakov M.D., Anikina L.V., Zakharyasheva O.Yu., Borisov A.V., Perfilova V.N., Tyurenkov I.N., Proskurnina M.V., Spasov A.A. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 27 (9) : 1804–1817. 2019.

104. Lucotti S., Cerutti C., Soyer M., Gil-Bernabé A.M., Gomes A.L., Allen P.D., Smart S., Markelc B., Watson K., Armstrong P.C., Mitchell J.A., Warner T.D., Ridley A.J., Muschel R.J. Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived COX-1/thromboxane A₂. *Journal of Clinical Investigation*. 129 (5) : 1845–1862. 2019.

105. Ma Q., Zhang W., Zhu C., Liu J., Chen Q. FUNDC2 regulates platelet activation through AKT/GSK-3 β /cGMP axis. *Cardiovascular Research*. 115 (11) : 1672–1679. 2019.

106. Ma Y. - Q., Qin J., Plow E.F. Platelet integrin α IIb β 3: activation mechanisms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5 (7) : 1345–1352. 2007.

107. Majithia A., Bhatt D.L. Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases. *ATVB*. 39 (4) : 546–557. 2019.

108. McFadyen J.D., Schaff M., Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nat Rev Cardiol*. 15 (3) : 181–191. 2018.

109. Mega J., Braunwald E., Mohanavelu S., Burton P., Poulter R., Misselwitz F., Hricak V., Barnathan E., Bordes P., Witkowski A., Markov V., Oppenheimer L., Gibson C. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes

- (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, double-blind, phase II trial. *The Lancet*. 374 (9683) : 29–38. 2009.
110. Menegatti M., Palla R. Clinical and laboratory diagnosis of rare coagulation disorders (RCDs). *Thrombosis Research*. 196 : 603–608. 2020.
111. Midoh N., Tanaka A., Nagayasu M., Furuta C., Suzuki K., Ichikawa T., Isomura T., Nomura K. Antioxidative Activities of Oxindole-3-acetic Acid Derivatives from Supersweet Corn Powder. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74 (9) : 1794–1801. 2010.
112. Mirfazli S.S., Kobarfard F., Firoozpour L., Asadipour A., Esfahanizadeh M., Tabib K., Shafiee A., Foroumadi A. N-Substituted indole carbohydrazide derivatives: synthesis and evaluation of their antiplatelet aggregation activity. *DARU J Pharm Sci*. 22 (1) : 65. 2014.
113. Moake J.L. Thrombotic Microangiopathies. *N Engl J Med*. 347 (8) : 589–600. 2002.
114. Mohamed A.R., El-Hadidy W.F., Mannaa H.F. Assessment of the prophylactic role of aspirin and/or clopidogrel on experimentally induced acute myocardial infarction in hypercholesterolemic rats. *Drugs R D*. 14 (4) : 233–239. 2014.
115. Moore S.F., Agbani E.O., Wersäll A., Poole A.W., Williams C.M., Zhao X., Li Y., Hutchinson J.L., Hunter R.W., Hers I. Opposing Roles of GSK3 α and GSK3 β Phosphorylation in Platelet Function and Thrombosis. *IJMS*. 22 (19) : 10656. 2021.
116. Moore S.F., van den Bosch M.T.J., Hunter R.W., Sakamoto K., Poole A.W., Hers I. Dual Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) α/β by Protein Kinase C (PKC) α and Akt Promotes Thrombin-mediated Integrin α IIb β 3 Activation and Granule Secretion in Platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 288 (6) : 3918–3928. 2013.
117. Morales Vidal S.G., Ruland S. Platelet antiaggregants in stroke prevention. *Neurol Clin*. 31 (3) : 633–657. 2013.
118. Moroi A.J., Watson S.P. Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: Haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. *Biochemical Pharmacology*. 94 (3) : 186–194. 2015.

119. Morrison J.T., Govsyeyev N., Hess C.N., Bonaca M.P. Vorapaxar for Prevention of Major Adverse Cardiovascular and Limb Events in Peripheral Artery Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 27 : 107424842110561. 2022.
120. Murugappan S., Shankar H., Kunapuli S.P. Platelet Receptors for Adenine Nucleotides and Thromboxane A₂. *Semin Thromb Hemost.* 30 (4) : 411–418. 2004.
121. Navarrete S., Solar C., Tapia R., Pereira J., Fuentes E., Palomo I. Pathophysiology of deep vein thrombosis. *Clin Exp Med.* 23 (3) : 645–654. 2022.
122. Nehaj F., Sokol J., Mukan M., Ivankova J., Mukan M. Thrombin Receptor Agonist Peptide-Induced Platelet Aggregation Is Reduced in Patients Receiving Dabigatran. *Clin Appl Thromb Hemost.* 24 (2) : 268–272. 2018.
123. Nieswandt B., Varga-Szabo D., Elvers M. Integrins in platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 7 : 206–209. 2009.
124. O'Brien K.A., Gartner T.K., Hay N., Du X. ADP-Stimulated Activation of Akt During Integrin Outside-In Signaling Promotes Platelet Spreading by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 β . *ATVB.* 32 (9) : 2232–2240. 2012.
125. O'Brien K.A., Stojanovic-Terpo A., Hay N., Du X. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood.* 118 (15) : 4215–4223. 2011.
126. Ono T., Mimuro J., Madoiwa S., Soejima K., Kashiwakura Y., Ishiwata A., Takano K., Ohmori T., Sakata Y. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood.* 107 (2) : 528–534. 2006.
127. Østergaard K., Hallas J., Bak S., Christensen R. dePont, Gaist D. Long-term use of antiplatelet drugs by stroke patients: a follow-up study based on prescription register data. *Eur J Clin Pharmacol.* 68 (12) : 1631–1637. 2012.
128. Padilla A., Moake J.L., Bernardo A., Ball C., Wang Y., Arya M., Nolasco L., Turner N., Berndt M.C., Anvari B., López J.A., Dong J.-F. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood.* 103 (6) : 2150–2156. 2004.

129. Palatinus A.A., Ahuja K.D.K., Adams M.J. Effects of Antiphospholipid Antibodies on In Vitro Platelet Aggregation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 18 (1) : 59–65. 2012.
130. Perrella G., Nagy M., Watson S.P., Heemskerk J.W.M. Platelet GPVI (Glycoprotein VI) and Thrombotic Complications in the Venous System. *ATVB.* 41 (11) : 2681–2692. 2021.
131. Piechota-Polańczyk A., Gorąca A. Influence of specific endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and antioxidant status of plasma in LPS-induced endotoxemia. *Pharmacological Reports.* 64 (6) : 1434–1441. 2012.
132. Previtera A.M., Pagani R. Agranulocytosis and hepatic toxicity with ticlopidine therapy: a case report. *J Med Case Reports.* 4 (1) : 269. 2010.
133. Qiao J., Arthur J.F., Gardiner E.E., Andrews R.K., Zeng L., Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biology.* 14 : 126–130. 2018.
134. Quillard T., Franck G., Mawson T., Folco E., Libby P. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques: Current Opinion in Lipidology. 28 (5) : 434–441. 2017.
135. Rao M.-L., Tang M., He J.-Y., Dong Z. [Effects of paeoniflorin on cerebral blood flow and the balance of PGI₂/TXA₂ of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury]. *Yao Xue Xue Bao.* 49 (1) : 55–60. 2014.
136. Raskob G.E., Angchaisuksiri P., Blanco A.N., Buller H., Gallus A., Hunt B.J., Hylek E.M., Kakkar A., Konstantinides S.V., McCumber M., Ozaki Y., Wendelboe A., Weitz J.I., ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to global disease burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34 (11) : 2363–2371. 2014.
137. Reheman A., Gross P., Yang H., Chen P., Allen D., Leytin V., Freedman J., Ni H. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 3 (5) : 875–883. 2005.
138. Rossaint J., Thomas K., Mersmann S., Skupski J., Margraf A., Tekath T., Jouvencé C.C., Dalli J., Hidalgo A., Meuth S.G., Soehnlein O., Zarbock A. Platelets orchestrate the resolution of pulmonary inflammation in mice by T reg cell repositioning and

- macrophage education. *Journal of Experimental Medicine*. 218 (7) : e20201353. 2021.
139. Rucker D., Dhamoon A.S. *Physiology, Thromboxane A2*. StatPearls. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing. 2022.
 140. Ruggeri Z.M., Orje J.N., Habermann R., Federici A.B., Reininger A.J. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood*. 108 (6) : 1903–1910. 2006.
 141. Rumbaut R.E., Randhawa J.K., Smith C.W., Burns A.R. Mouse Cremaster Venules are Predisposed to Light/Dye-Induced Thrombosis Independent of Wall Shear Rate, CD18, ICAM-1, or P-Selectin. *Microcirculation*. 11 (3) : 239–247. 2004.
 142. Rumbaut R.E., Thiagarajan P. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA). Morgan & Claypool Life Sciences. 2010.
 143. Ryu S.-K., Ahn D.S., Cho Y.-E., Choi S.-K., Kim Y.-H., Morgan K.G., Lee Y.-H. Augmented sphingosylphosphorylcholine-induced Ca^{2+} -sensitization of mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 373 (1) : 30–36. 2006.
 144. Sarratt K.L., Chen H., Zutter M.M., Santoro S.A., Hammer D.A., Kahn M.L. GPVI and $\alpha 2\beta 1$ play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*. 106 (4) : 1268–1277. 2005.
 145. Savage B., Saldívar E., Ruggeri Z.M. Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell*. 84 (2) : 289–297. 1996.
 146. Schaff M., Tang C., Maurer E., Bourdon C., Receveur N., Eckly A., Hechler B., Arnold C., de Arcangelis A., Nieswandt B., Denis C.V., Lefebvre O., Georges-Labouesse E., Gachet C., Lanza F., Mangin P.H. Integrin $\alpha_6 \beta_1$ Is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation, and Arterial Thrombosis. *Circulation*. 128 (5) : 541–552. 2013.
 147. Setiabakti N.M., Larsson P., Hamilton J.R. Phosphoinositide 3-Kinases as Potential Targets for Thrombosis Prevention. *IJMS*. 23 (9) : 4840. 2022.
 148. Shattil S.J., Newman P.J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling

in platelets. *Blood*. 104 (6) : 1606–1615. 2004.

149. 164. Simon D.I., Chen Z., Xu H., Li C.Q., Dong J., McIntire L.V., Ballantyne C.M., Zhang L., Furman M.I., Berndt M.C., López J.A. Platelet Glycoprotein Ib α Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (Cd11b/Cd18). *Journal of Experimental Medicine*. 192 (2) : 193–204. 2000.

150. Smits P.C., Frigoli E., Vranckx P., Ozaki Y., Morice M.-C., Chevalier B., Onuma Y., Windecker S., Tonino P.A.L., Roffi M., Lesiak M., Mahfoud F., Bartunek J., Hildick-Smith D., Colombo A., Stankovic G., Iñiguez A., Schultz C., Kornowski R., Ong P.J.L., Alasnag M., Rodriguez A.E., Paradies V., Kala P., Kedev S., Al Mafragi A., Dewilde W., Heg D., Valgimigli M. Abbreviated Antiplatelet Therapy After Coronary Stenting in Patients With Myocardial Infarction at High Bleeding Risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 80 (13) : 1220–1237. 2022.

151. Soriano Jerez E.M., Gibbins J.M., Hughes C.E. Targeting platelet inhibition receptors for novel therapies: PECAM-1 and G6b-B. *Platelets*. 32 (6) : 761–769. 2021.

152. Stalker T.J., Traxler E.A., Wu J., Wannemacher K.M., Cermignano S.L., Voronov R., Diamond S.L., Brass L.F. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*. 121 (10) : 1875–1885. 2013.

153. Stegner D., Haining E.J., Nieswandt B. Targeting Glycoprotein VI and the Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif Signaling Pathway. *ATVB*. 34 (8) : 1615–1620. 2014.

154. Sun S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 17 (9) : 545–558. 2017.

155. Sun Y., Wang T., Lv Y., Li J., Jiang X., Jiang J., Zhang D., Bian W., Zhang C. MALAT1 promotes platelet activity and thrombus formation through PI3k/Akt/GSK-3 β signalling pathway. *Stroke Vasc Neurol*. 8 (3) : 181–192. 2023.

156. Suthar S.K., Bansal S., Narkhede N., Guleria M., Alex A.T., Joseph A. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Oxindole-Based Chalcones as Small-Molecule Inhibitors of Melanogenic Tyrosinase. *Chem. Pharm. Bull*. 65 (9) : 833–839. 2017.

157. Suzuki T. Hetero-oligomerization and Functional Interaction between Purinergic Receptors Expressed in Platelets to Regulate Platelet Shape Change. *YAKUGAKU*

ZASSHI. 135 (12) : 1335–1340. 2015.

158. Tailor A., Cooper D., Granger D.N. Platelet–Vessel Wall Interactions in the Microcirculation. *Microcirculation*. 12 (3) : 275–285. 2005.

159. Tamang H.K., Yang R., Song Z., Hsu S., Peng C., Tung Y., Tzeng B., Chen C. Cav3.2 T- type calcium channel regulates mouse platelet activation and arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 20 (8) : 1887–1899. 2022.

160. Tangelder G.J., Teirlinck H.C., Slaaf D.W., Reneman R.S. Distribution of blood platelets flowing in arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 248 (3) : H318–H323. 1985.

161. Taylor A., Rudd C.E. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) controls T-cell motility and interactions with antigen presenting cells. *BMC Res Notes*. 13 (1) : 163. 2020.

162. Timp J.F., Braekkan S.K., Lijfering W.M., Van Hylckama Vlieg A., Hansen J.-B., Rosendaal F.R., Le Cessie S., Cannegieter S.C. 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* / под ред. Rahimi K. 16 (10) : e1002883. 2019.

163. Ushiki T., Mochizuki T., Suzuki K., Kamimura M., Ishiguro H., Suwabe T., Kawase T. Modulation of ATP Production Influences Inorganic Polyphosphate Levels in Non-Athletes' Platelets at the Resting State. *IJMS*. 23 (19) : 11293. 2022.

164. Van Der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 16 (3) : 166–179. 2019.

165. Varga- Szabo D., Braun A., Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7 (7) : 1057–1066. 2009.

166. Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *ATVB*. 28 (3) : 403–412. 2008.

167. Vines A., Cahoon S., Goldberg I., Saxena U., Pillarisetti S. Novel Anti-inflammatory Role for Glycogen Synthase Kinase-3 β in the Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α - and Interleukin-1 β -induced Inflammatory Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (25) : 16985–16990. 2006.

168. Virani S.S., Newby L.K., Arnold S.V., Bittner V., Brewer L.C., Demeter S.H., Dixon D.L., Fearon W.F., Hess B., Johnson H.M., Kazi D.S., Kolte D., Kumbhani D.J., LoFaso J., Mahtta D., Mark D.B., Minissian M., Navar A.M., Patel A.R., Piano M.R., Rodriguez F., Talbot A.W., Taqueti V.R., Thomas R.J., Van Diepen S., Wiggins B., Williams M.S. 2023 AHA/ACC/ACCP/ASPC/NLA/PCNA Guideline for the Management of Patients With Chronic Coronary Disease: A Report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 148 (9). 2023.
169. Wallentin L., Becker R.C., Budaj A., Cannon C.P., Emanuelsson H., Held C., Horrow J., Husted S., James S., Katus H., Mahaffey K.W., Scirica B.M., Skene A., Steg P.G., Storey R.F., Harrington R.A. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 361 (11) : 1045–1057. 2009.
170. Wang J., Zou D. Tirofiban-induced thrombocytopenia. *Annals of Medicine*. 55 (1) : 2233425. 2023.
171. Wang X., Ziegler M., McFadyen J.D., Peter K. Molecular imaging of arterial and venous thrombosis. *British J Pharmacology*. 178 (21) : 4246–4269. 2021.
172. Warner T.D., Nylander S., Whatling C. Anti-platelet therapy: cyclo-oxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy: Anti-thrombotic aspirin and dual anti-platelet therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 72 (4) : 619–633. 2011.
173. Wei C., Yang X., Shi S., Bai L., Hu D., Song R., Song B. 3-Hydroxy-2-oxindole Derivatives Containing Sulfonamide Motif: Synthesis, Antiviral Activity, and Modes of Action. *J. Agric. Food Chem*. 71 (1) : 267–275. 2023.
174. Wei G., Xu X., Tong H., Wang X., Chen Y., Ding Y., Zhang S., Ju W., Fu C., Li Z., Zeng L., Xu K., Qiao J. Salidroside inhibits platelet function and thrombus formation through AKT/GSK3 β signaling pathway. *Aging*. 12 (9) : 8151–8166. 2020.
175. Wijeyeratne Y.D., Heptinstall S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists: Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 72 (4) : 647–657. 2011.
176. Wiviott S.D., Braunwald E., McCabe C.H., Montalescot G., Ruzyllo W., Gottlieb

- S., Neumann F.-J., Ardissino D., De Servi S., Murphy S.A., Riesmeyer J., Weerakkody G., Gibson C.M., Antman E.M. Prasugrel versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med.* 357 (20) : 2001–2015. 2007.
177. Wood K.C., Hebbel R.P., Granger D.N. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 286 (5) : H1608–H1614. 2004.
178. Xiang K., Liu G., Zhou Y.-J., Hao H.-Z., Yin Z., He A.-D., Da X.-W., Xiang J.-Z., Wang J.-L., Ming Z.-Y. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) attenuates human platelet aggregation, secretion and spreading in vitro. *Thrombosis Research.* 133 (2) : 211–217. 2014.
179. Xiong Y., Bath P.M. Antiplatelet Therapy for Transient Ischemic Attack and Minor Stroke. *Stroke.* 51 (11) : 3472–3474. 2020.
180. Xu W., Yang Z., Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adhesion & Migration.* 9 (4) : 317–324. 2015.
181. Ya F., Li K., Chen H., Tian Z., Fan D., Shi Y., Song F., Xu X., Ling W., Adili R., Yang Y. Protocatechuic Acid Protects Platelets from Apoptosis via Inhibiting Oxidative Stress-Mediated PI3K/Akt/GSK3 β Signaling. *Thromb Haemost.* 121 (07) : 931–943. 2021.
182. Yasmina A., 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: Pattern of antiplatelet drug use after myocardial infarction. *Br J Clin Pharmacol.* 83 (3) : 632–641. 2017.
183. Yang R.-P., Zhou Y.-J., Song W., Yin Z., He A.-D., Ming Z.-Y. Pharmacological actions of neferine in the modulation of human platelet function. *European Journal of Pharmacology.* 862 : 172626. 2019.
184. Ye N., Chen H., Wold E.A., Shi P.-Y., Zhou J. Therapeutic Potential of Spirooxindoles as Antiviral Agents. *ACS Infect. Dis.* 2 (6) : 382–392. 2016.
185. Zeck J., Schallheim J., Lew S.Q., DePalma L. Whole Blood Platelet Aggregation and Release Reaction Testing in Uremic Patients. *BioMed Research International.* 2013

: 1–6. 2013.

186. Zhang H., Zhang Y., Tang X., Su W., Yang C., Pan D., Zhao D., Qi B., Li X. Hemostatic Effect of 20(S)-Panaxadiol by Induced Platelet Aggregation Depending on Calcium Signaling Pathway. *BioMed Research International* / под ред. Silva A.R. 2022 : 1–18. 2022.

187. Zhang P., Katz J., Michalek S.M. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) inhibition suppresses the inflammatory response to *Francisella* infection and protects against tularemia in mice. *Molecular Immunology*. 46 (4) : 677–687. 2009.

188. Zhang Y., Li L., Zhao Y., Han H., Hu Y., Liang D., Yu B., Kou J. The Myosin II Inhibitor, Blebbistatin, Ameliorates FeCl₃-induced Arterial Thrombosis via the GSK3 β -NF- κ B Pathway. *Int. J. Biol. Sci.* 13 (5) : 630–639. 2017.

189. Zhao J., Xu Y., Xie J., Liu, Zhang R., Yan X. Roxadustat Does Not Affect Platelet Production, Activation, and Thrombosis Formation. *ATVB*. 41 (10) : 2523–2537. 2021.

190. 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*. *Thrombosis Research*. 144 : 46–52. 2016.

191. Zhou Q., Chen M., Zhu L., Yu L., Zeng S., Xiang M., Wang Z.-Y. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *TCRM*. 449. 2015.