

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ТЯНЬ МИНГАН

АНТИТРОМБОГЕННЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

Кучерявенко Аида Фатиховна

ВОЛГОГРАД – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
 ГЛАВА 1. НАПРАВЛЕНИЕ ПОИСКА СРЕДСТВ, ОКАЗЫВАЮЩИХ ВЛИЯНИЕ НА ТРОМБОЦИТАРНО-СОСУДИСТЫЙ ГЕМОСТАЗ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Физиологические и патофизиологические свойства тромбоцитов.	13
1.2. Фармакологическая регуляция процессов агрегации тромбоцитов.....	22
1.3. Производные индола как потенциально активные вещества в процессе регуляции функциональной активности тромбоцитов.	27
 ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	30
2.1. Материалы	30
2.2. Методы исследований	39
 ГЛАВА 3. ПОИСК ВЕЩЕСТВ С АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА.....	59
3.1. Поиск веществ, проявляющих способность ингибировать процессы агрегации тромбоцитов	60
3.2. Зависимость антиагрегантной активности производных индола от их структуры и физико-химических свойств.	65
3.3. Влияние новых производных индола на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов.	75
3.4. Заключение	77
 ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА НА СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ.....	79
4.1. Изучение антитромботической активности соединения Sbt-828 на модели артериального тромбоза, вызванного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс	79

4.2. Исследование антитромботического действия вещества Sbt-828 на модели артериального тромбоза, индуцированного анодным током.	81
4.3. Действие соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на выживаемость мышей в условиях системного тромбоза.	83
4.4. Влияние соединения Sbt-828 на время кровотечения.....	85
4.5. Заключение.....	88

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ Sbt-828 НА ТРОМБОЦИТАРНО-СОСУДИСТЫЙ ГЕМОСТАЗ И РЕОЛОГИЮ КРОВИ НА МОДЕЛИ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА У КРЫС..... 89

5.1. Влияния соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов крыс ex vivo. ..	90
5.2. Действие соединения Sbt-828 на реологические свойства крови крыс. ..	92
5.3. Исследование антитромботической активности вещества Sbt-828 на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током	94
5.4. Заключение.....	95

ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА Sbt-828..... 97

6.1. Влияние соединения Sbt-828 на рецепторные механизмы активации тромбоцитов.	98
6.1.1. Действие вещества Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ.....	98
6.1.2. Влияние соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную адреналином.	99
6.1.3. Оценка эффективности влияния вещества Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой.	100
6.1.4. Действие соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином.....	101
6.1.5. Влияние соединения Sbt-828 на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов.	102

6.1.6. Действие вещества Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванное агонистом тромбоксановых рецепторов U 46619.	103
6.1.7. Влияние соединения Sbt-828 на пуриновые P2Y ₁ и P2Y ₁₂ -рецепторы тромбоцитов.	104
6.2. Действие производного индола Sbt-828 на баланс простаглицлина и тромбоксана в организме крыс.....	106
6.2.1. Влияние вещества Sbt-828 на продукцию тромбоксана A ₂ в тромбоцитах интактных крыс	106
6.2.2. Изучение влияния соединения на простаглицлин-генерирующую активность сосулистой стенки интактных животных	107
6.3. Влияние нового производного индола на уровень кальция в тромбоцитах животных	110
6.3.1. Действие соединения Sbt-828 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах	110
6.3.2. Влияние вещества Sbt-828 на концентрацию мембранносвязанного кальция в тромбоцитах.....	114
6.4. Влияние соединения Sbt-828 на показатели коагулограммы плазмы интактных животных и фибринолитическую активность.....	115
6.4.1. Действие вещества на показатели коагулограммы	115
6.4.2. Влияние соединения Sbt-828 на фибринолитическую активность плазмы крови крыс	116
6.5. Заключение	117

ГЛАВА 7. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ Sbt-828

..... **119**

7.1. Влияние соединения Sbt-828 на эмоциональный статус, рефлексy и нервно-мышечную возбудимость	119
7.2. Действие вещества Sbt-828 на двигательную и мышечную координацию, реактивность.....	123

7.3.Изучение поведенческой реакции мышей (тест «открытое поле») при введении соединения Sbt-828.	129
7.4 Действие соединения Sbt-828 на функции вегетативной нервной системы мышей.	134
7.5. Заключение.....	137
ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	138
ВЫВОДЫ.....	159
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	161
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	162

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Тромбообразованию принадлежит ключевая роль в патогенезе ишемической болезни сердца, инсульта, осложнений сахарного диабета и других нарушений кровоснабжения органов и тканей [Чазов, Е.И., 2008; Мирзоян, Р.С., 2009; Тюренков, И.Н., 2013; Спасов, А.А., 2013; Дедов, И.И., 2013]. Уменьшить риск таких нарушений можно, используя препараты, снижающие повышенную функциональную активность тромбоцитов, так как именно агрегация последних выполняет первостепенную роль в начальных, пусковых механизмах свертывания крови [Кубатиев, А.А., 2004; Мельникова, Е., 2011; Рока-Мойя, Я.М., 2014]. Антиагрегантная терапия проводится с использованием препаратов, которые показали в многоцентровых исследованиях способность уменьшать риск развития тромбозов и предотвращать острую коронарную смерть [Geraldo, R.B., 2010; Петров, В.И., 2010; Суслина, З.А., 2011; Гиляревский, С.Р., 2012; Кадыков, А.С., 2013]. Современная антиагрегантная терапия представлена ингибитором циклооксигеназы (ЦОГ) тромбоцитов - ацетилсалициловой кислотой, блокаторами $P2Y_{12}$ рецепторов тромбоцитов - тенонопиридинами (клопидогрел, тиклопидин, прасугрел), блокаторами гликопротеиновых рецепторов $IIb/IIIa$ тромбоцитов для внутривенного применения (абциксимаб, тирофибан, эптифибатид, фрамон), а также комбинацией ацетилсалициловой кислоты с клопидогрелем [Чарная, М.А., 2009; Мишалов, В.Г., 2012; Голухова, Е.З., 2013]. Однако у этих препаратов существует много недостатков и побочных эффектов. Среди них желудочно-кишечные кровотечения, гастропатии, тромбоцитопеническая пурпура, также описано наличие резистентности к ацетилсалициловой кислоте и клопидогрелю [Сулимов В.А., 2012]. Несмотря на высокую эффективность вышеперечисленных лекарственных средств, число инфарктов и инсультов, к сожалению, с каждым годом продолжает расти.

Трудность фармакологической коррекции повышения тромбогенного потенциала крови заключается в том, что на тромбоците находится большое количество мишеней патогенеза агрегации, а вышеперечисленные препараты блокируют только один из путей активации. Поэтому поиск, изучение и создание новых препаратов с антиагрегантной активностью является краеугольной проблемой современной кардиологии в предупреждении тромбозов.

Химический класс производных индола может проявлять различные виды биологической активности и является перспективным для разработки высокоэффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов [Mashayekhi, V., 2013]. В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета была выявлена способность гетероциклических азотосодержащих систем, уменьшать, агрегацию тромбоцитов [Спасов, А.А., 2006, 2014; Анисимова, В.А., 2013; Кучерявенко, А.Ф., 2013]. Исходя из этого, поиск соединений с высокой антиагрегантной активностью среди новых производных индола является актуальным.

Тема утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (протокол № 8 от 11.04.2012 г.) и включена в план НИР.

Степень разработанности. Актуальной проблемой современной клинической практики является потребность в высокоэффективных антиагрегантных средствах с наименьшими побочными эффектами [Макаров, В.А., 2006]. В последние годы достигнут прогресс в изучении известных и новых механизмов нарушения функциональной активности тромбоцитов, однако количество средств фармакологической коррекции данной патологии весьма ограничено [Postula, M, 2010; Cattaneo, M. 2011]. В настоящее время в основе применения антитромбоцитарных препаратов лежат принципы доказательной медицины, которые в полной мере учитывают эффективность и

наличие побочных действий. Однако основными недостатками антиагрегантных средств являются кровотечения и гастропатии. Поэтому, лечение повышенного тромбогенного потенциала крови требует пристального внимания в отношении предотвращения новых тромботических случаев и возникновения данных осложнений. Немаловажным является то, что практически все препараты, за исключением ацетилсалициловой кислоты, импортируются из-за рубежа. Поэтому стоимость данных лекарственных средств достаточно высока.

Цель исследования. Поиск ингибиторов агрегации тромбоцитов среди новых производных индола в ряду замещенных амидов и аминоспиртов и изучение их антитромбогенной активности.

Задачи исследования.

1. Выполнить поиск антиагрегантных веществ *in vitro* среди новых производных индола.
2. Провести анализ влияния заместителей на уровень антиагрегантной активности замещенных амидов и аминоспиртов в ряду индола.
3. Исследовать острую токсичность соединений, проявляющих наибольшую активность, рассчитать их терапевтический индекс и выбрать наиболее эффективное вещество для доклинического изучения специфической фармакологической активности.
4. Изучить влияние наиболее активного соединения на тромбогенный потенциал крови крыс в норме и при экспериментальном сахарном диабете.
5. Оценить влияние выбранного вещества на вязкостные параметры крови в норме и в условиях экспериментального диабета.
6. Провести углубленное изучение влияния наиболее активного соединения на рецепторные и пострецепторные механизмы активации тромбоцитов.

7. Провести оценку общетоксикологических свойств наиболее активного соединения.

Научная новизна исследования. Впервые было изучено влияние новых производных ряда индола – N-[(1-R¹-амино) карбонил-2-(1-R²-1H-индол-3-ил) винил]-R³-амидов и 1-R¹-амино-3-(3-R²-1H-индол-1-ил)-2-пропанолов – на процессы агрегации тромбоцитов. Впервые установлена взаимосвязь между структурой новых соединений, и их способностью угнетать функциональную активность тромбоцитов. Показано, что данный вид активности у замещённых амидов ряда индола определяется строением заместителей и их нахождением у атома углерода в положении 7, а у аминоспиртов ряда индола – радикалами в положении N⁹.

Выявлено новое оригинальное вещество Sbt-828, проявляющее выраженные антиагрегантные свойства и получены данные о его влиянии на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, коагуляцию и фибринолиз *in vitro* и *in vivo*. Впервые показано, что соединение Sbt-828 оказывает антитромботическое действие на моделях тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и электрическим током, а также на модели системного клеточного тромбоза на мышах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты выявленных закономерностей между антиагрегантной активностью новых производных индола и их химической структурой могут быть основой для направленного поиска новых соединений, ингибирующих процессы агрегации тромбоцитов. Получены данные о наличии антитромботической активности у соединения Sbt-828 на моделях экспериментальных тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и электрическим током в норме и при экспериментальном сахарном диабете. Соединение Sbt-828 менее выражено влияет на время кровотечения по сравнению с ацетилсалициловой кислотой.

Методология и методы исследования. В связи с поставленными задачами выбраны современные высокоинформативные методические подходы, имеющиеся в Волгоградском государственном медицинском университете. В качестве объектов исследования использованы кролики-самцы породы «Шиншилла», а также половозрелые самки и самцы мышей и крыс. Исследование антитромбогенных свойств соединения Sbt-828 проведено согласно методическим рекомендациям по изучению антиагрегантной и антитромботической активности лекарственных средств [Макаров В.А., 2012] с использованием методов статистической обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. N-[(1-R¹-амино) карбонил-2-(1-R²-1H-индол-3-ил) винил]-R³-амиды и 1-R¹-амино-3-(3-R²-1H-индол-1-ил)-2-пропанола – перспективные классы соединений для поиска новых высокоэффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов.
2. Соединение Sbt-828 оказывает выраженную антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo* на интактных животных и животных с экспериментальной патологией.
3. Вещество Sbt-828 оказывает антитромботическое действие *in vivo* при моделировании артериальных тромбозов сонной артерии крыс (индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III), электрическим током) и системного адреналин-коллагенового тромбоза на мышцах.
4. Соединение Sbt-828 при введении в дозах до 100 мг/кг не вызывает изменений функционального состояния вегетативной нервной системы и эмоционального статуса экспериментальных животных, не влияет на двигательную координацию, поведенческие реакции, частоту дыхания, ректальную температуру и болевую чувствительность.

Внедрение результатов исследования. Полученные данные о способности новых соединений ингибировать процессы агрегации тромбоцитов, а также анализ влияния заместителей на уровень антиагрегантной активности в перспективных рядах замещенных амидов и аминоспиртов ряда индола используется при синтезе новых веществ на кафедре химии природных и высокомолекулярных соединений химического факультета Южного Федерального университета (г. Ростов на Дону). В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, ГБУ Волгоградского медицинского научного центра, кафедры фармакологии ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к изучению антиагрегантной активности веществ. Результаты работы включены в лекционные курсы на кафедрах фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, на кафедрах фармакологии Ростовского государственного медицинского университета и Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом выполненных экспериментальных исследований, проведенных на кроликах, мышах и крысах обоего пола; использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с антитромбогенной активностью, а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2012 г.; на IV Съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» Казань, 2012 г.; 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2012 г.; на первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» Москва, 2013.

По теме диссертации опубликовано 12 работ (из них 2 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ).

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследованной проблеме. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологической активности и механизма антиагрегантного действия нового производного индола – соединения Sbt-828: решения поставленных задач и обсуждения результатов. Автору принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и оформление рукописи.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 36 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2 – 7), обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 51 отечественных и 123 зарубежных источника.

ГЛАВА 1. НАПРАВЛЕНИЕ ПОИСКА СРЕДСТВ, ОКАЗЫВАЮЩИХ ВЛИЯНИЕ НА ТРОМБОЦИТАРНО-СОСУДИСТЫЙ ГЕМОСТАЗ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

1.1. Физиологические и патофизиологические свойства тромбоцитов.

Важным направлением современной кардиологии является профилактика сердечно-сосудистых заболеваний и снижение риска развития их осложнений. Однако для выполнения этих задач необходимо четко представлять механизмы тромбообразования. Хорошо известно, что тромбоциты являются ключевыми медиаторами тромбообразования [Jennings, 2009; Caen J, 2014]. Поэтому необходимо тщательно изучать механизмы повышения агрегации тромбоцитов лежащие в основе развития и прогрессирования многих сердечно-сосудистых заболеваний, связанные с адгезией, агрегацией, реакцией высвобождения, способностью сорбировать и высвобождать коагуляционные факторы. В связи с этим важно иметь представления о физиологии и патологии тромбоцитов.

Структура тромбоцитов. Тромбоциты (кровяные пластинки) являются самыми малыми по размеру элементами крови: диаметр покоящихся (интактных) тромбоцитов составляет 2-4 мкм. Плазматическая мембрана этих клеток содержит специализированные компоненты (комплексы), участвующие в межклеточных контактах и взаимодействиях, в трансдукции сигнала по системе внутриклеточной сигнализации и в транспорте молекул из клетки и внутрь её.

Тромбоциты ввиду отсутствия в них ядра не относятся к клеткам. Они являются фрагментами больших мегакариоцитов костного мозга и обнаруживаются в циркулирующей крови, а не в тканях (за исключением патологических состояний). Однако, несмотря на отсутствие ядра, цитоплазма содержит некоторое количество РНК, поэтому тромбоциты способны к ограниченному белковому синтезу [Tobelem G, 1980].

Тромбоцит - безъядерная сферическая клетка диаметром 2-4 мкм, средний объем $7,5 \text{ мкм}^3$ (от 3 до 10 мкм^3). Микроформы тромбоцитов имеют диаметр менее 1,5 мкм, макроформы могут достигать 6-10 мкм. Интактные тромбоциты имеют форму диска или пластины диаметром 2,8-3,4 мкм, толщиной 0,8-1,2 мкм и объемом от 5,7 до $8,9 \text{ мкм}^3$ (рис. 1).

Цитоплазму окружает мембрана, состоящая из двух слоев фосфолипидов, между которыми располагаются белки. В результате инвагинации поверхностной мембраны в цитоплазме образуется сложная система канальцев, которые сообщаются с поверхностью тромбоцита. С системой канальцев, сообщающихся с поверхностью, тесно связана плотная тубулярная система. Подобно саркоплазматическому ретикулуму мышц, плотная тубулярная система может участвовать в секвестрации и хранении кальция в тромбоцитах.

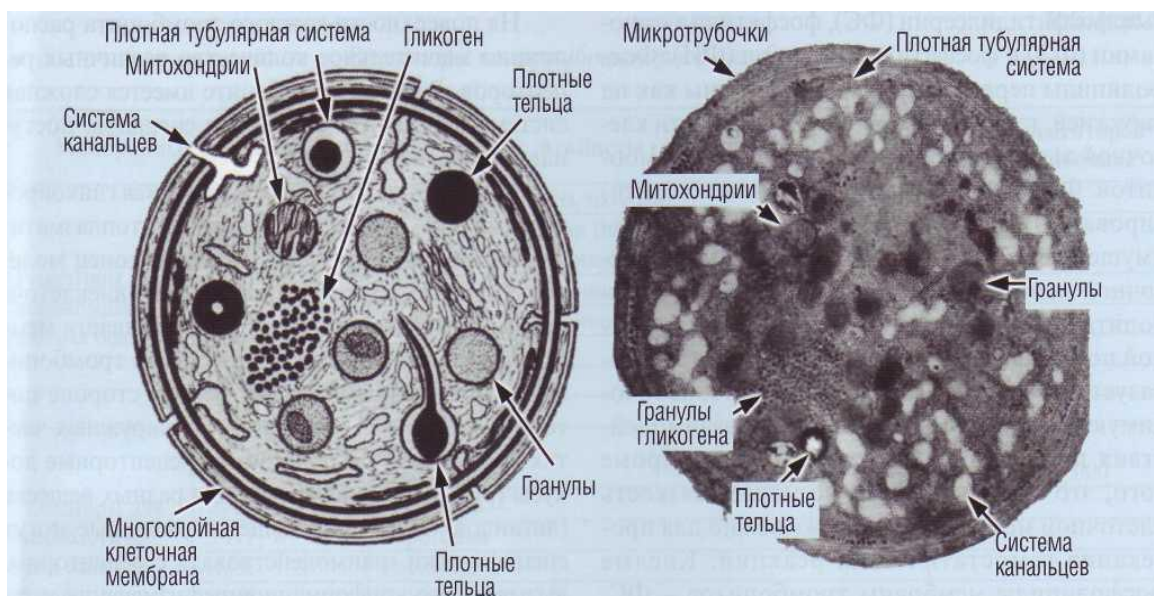


Рисунок 1. Тромбоцит (рисунок и микрофотография).

Значительная часть цитоплазмы тромбоцита заполнена гранулами, которые разделяют на три основных типа: плотные гранулы, α -гранулы и гранулы, содержащие кислые гидролазы. Кроме того, цитоплазма содержит некоторое количество гранул гликогена и немного митохондрий. Плотные

гранулы содержат аденозинтриосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), серотонин, гистамин, кальций (Ca^{2+}), пиродифосфат [McNicol A., 1999].

α -гранулы - это самая крупная по размерам гетерогенная группа гранул, содержащих факторы свертывания крови, фибриноген, фактор 4 (фактор тромбоцитов 4) и его предшественник, набор 30 основных белков с разными формами активности хемотаксической, усиливающей рост, повышающей проницаемость), а также различные гликопротеины, в том числе фибронектин и тромбоспондин. Исследование состава α -гранул показало, что часть их содержимого является результатом экзоцитоза из окружающей среды [Harrison P., 1993; Rendu F., 2001].

γ -гранулы, содержащие кислую гидролазу, морфологически неотличимы от α -гранул, но, вероятно, они не выделяются из тромбоцитов в результате секреции. В этих гранулах находятся различные ферменты – пероксидаза, глюкозидаза и др. [McNicol A., 1999].

Тромбоциты способны изменять свою форму благодаря наличию микрофиламентов и микротрубочек в цитоплазме. Микротрубочки располагаются по периферии цитоплазмы и поддерживают форму диска у интактных тромбоцитов. Микрофиламенты содержат kontraktilные белки и принимают участие в агрегации. Помимо различных форм актина и миозина, в тромбоцитах содержатся регуляторные белки. Продолжительность жизни тромбоцитов в циркуляции составляет 8-14 дней.

Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов. В соответствии с имеющимися представлениями тромбоциты циркулируют в крови в относительно неактивном состоянии, имея форму диска, и не взаимодействуют друг с другом и с интактным эндотелием, выстилающим кровеносные сосуды. При повреждении стенки сосуда запускается каскад процессов, ведущих к образованию тромба из тромбоцитов и фибрина, для остановки кровотечения из поврежденного сосуда (рис. 2). Процесс агрегации тромбоцитов и образования тромба включает две основные стадии. Первой стадией является **адгезия**

(прилипание) тромбоцитов к субэндотелиальному матриксу или активированному эндотелию. При этом из эндотелиальных клеток в кровь высвобождается содержимое телец Вейбла-Палада, которые представляют собой мультимеры фактора фон Виллибранда (ФВ) и Р-селектина [Michelson A.D., 2004]. ФВ обеспечивает связь между тромбоцитами и сосудистой стенкой (адгезия тромбоцитов) и тромбоцитами (агрегация тромбоцитов). Р-селектин обеспечивает агрегацию лейкоцитов к месту повреждения кровеносного сосуда. ФВ служит мостиком между коллагеном и тромбоцитами и необходим для адгезии тромбоцитов к коллагену при высокой скорости тока крови [Cossemans M. E, 2011]. Данная связь является достаточно слабой, однако приводит к замедлению движения тромбоцита через тромбогенную поверхность, богатую коллагеном, что делает возможным взаимодействие с ним других рецепторов тромбоцитов [Baruch D., 2006; Krotz F., 2008].

Также в процессе адгезии тромбоцитов принимают участие различные рецепторы и адгезивные молекулы. К ним относятся рецепторы коллагена (GPIa/IIa (интегрин $\alpha_2\beta_1$)) и GPVI. Комплекс GPIa/IIa главным образом поддерживает связь тромбоцита с коллагеном, а рецептор GPVI проводит сигнал через мембрану внутрь клетки с целью дальнейшей активации тромбоцита [Tucker K.L., 2008; Margarucci L., 2011]. Данный сигнал служит началом следующей стадии процесса тромбообразования, а именно агрегации тромбоцитов. При этом множество тромбоцитов связываются между собой с помощью фибриногена или ФВ через активированные рецепторы тромбоцитов GPIIb-IIIa. Эта стадия является общей для большинства путей активации тромбоцитов. Следовательно, независимо от начального сигнала процесс агрегации завершается конформационным изменением, испытываемым комплексом поверхностного гликопротеина GPIIb-IIIa, который преобразует его в рецептор для фибриногена. После этого фибриноген играет роль мостика между прилегающими тромбоцитами (рис.2).

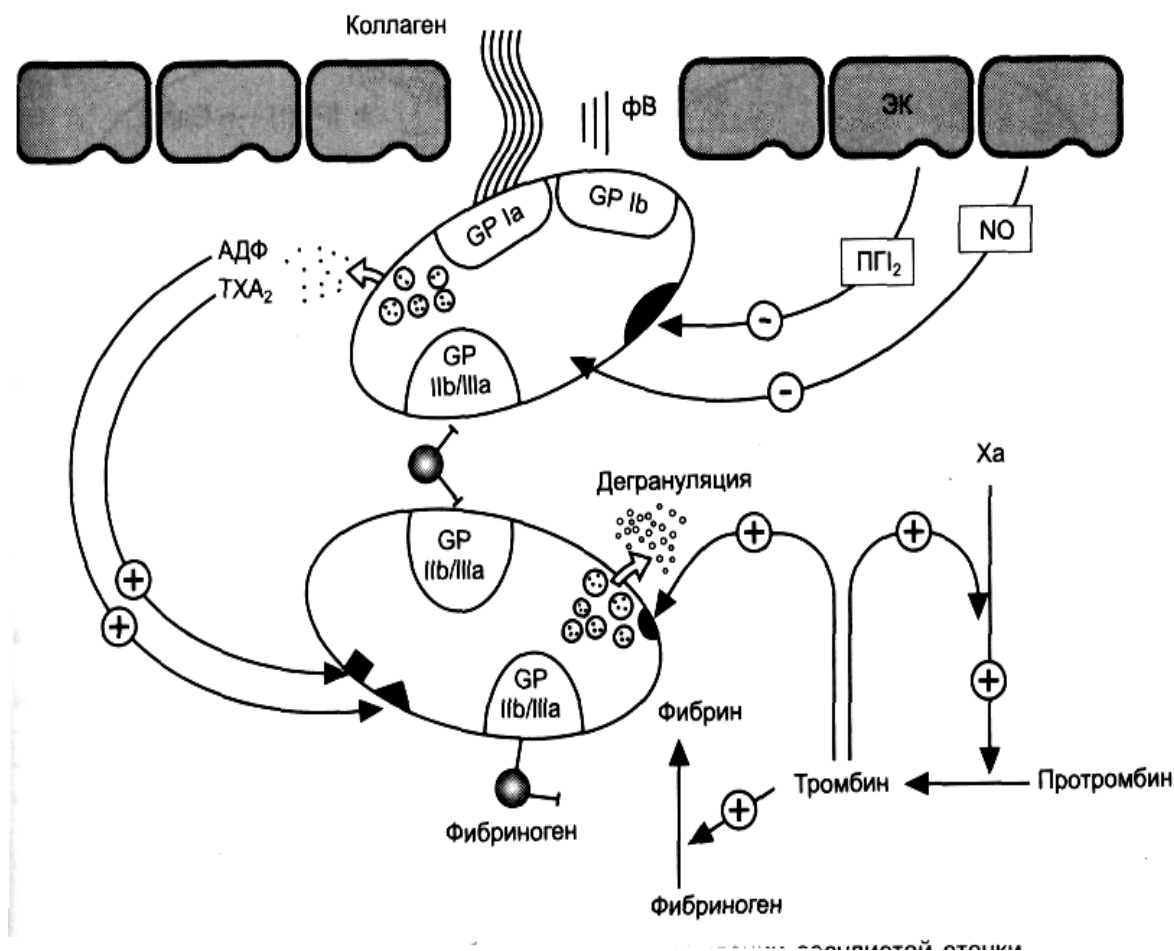


Рис. 2. Адгезия и агрегация тромбоцитов при повреждении сосудистой стенки

При активации тромбоцитов происходит изменение их структуры – появляется большое количество выростов, благодаря которым площадь поверхности мембраны тромбоцита увеличивается в несколько раз.

Рецепторы мембраны тромбоцитов. На мембране тромбоцита экспрессируется большое количество рецепторов. Они, в основном, относятся к семейству интегринов. Интегрины – это гетеродимерные молекулы, образованные α - и β -субъединицами, различные комбинации которых формируют рецепторы, специфичные для разных типов лигандов. Основные мембранные рецепторы тромбоцитов представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Мембранные рецепторы тромбоцитов

Рецептор	Лиганд
Гликопротеид Ib-V-IX	ФВ, тромбин
Гликопротеид IIb-IIIa	Фибриноген, ФВ, фибрин, фибронектин, витронектин, тромбоспондин
Гликопротеид Ic-IIa	Фибронектин, лиминин
Альфа ₅ β ₃ -интегрин	Витронектин
Гликопротеид Ia-IIa	Коллаген
Гликопротеид IV	Тромбоспондин, коллаген
Гликопротеид VI	Коллаген
Пуриновые рецепторы типа 2 (P2Y ₁ , P2Y ₁₂)	АТФ
Альфа-адренорецепторы	Адреналин
Серотониновый рецептор типа 2 (5-HT ₂)	Серотонин
PAR-1, PAR-3, PAR-4	Тромбин
Рецептор тромбоксана A ₂	Тромбоксан A ₂

Гликопротеид (GP) IIb/IIIa является основным рецептором, связывающимся с большим числом лигандов, и осуществляет связь тромбоцитов друг с другом через фибриногеновые мостики. Также гликопротеид IIb/IIIa вступает во взаимодействие с ФВ, витронектином и фибронектином, которые представляют семейство интегринов. При стимуляции красных кровяных пластинок активируется от 60 000 до 80 000 GPIIb-IIIa рецепторов на одну клетку [Brass L. F., 2008].

Гликопротеидный комплекс Ib/V/IX. Его главная функция—это адгезия и активация тромбоцитов. В интактных тромбоцитах связывание этого комплекса с ФВ незначительно. При повреждении эндотелия происходит контакт ФВ с базальной мембраной субэндотелия. При высокой скорости

кровотока это может привести к конформационным изменениям в молекуле ФВ и увеличению его сродства к данному гликопротеиду [Baruch D., 2006].

Рецепторы тромбина. Тромбин является представителем семейства протеиназ трипсина и гликопротеидом, который катализирует расщепление пептидных связей аминокислот [Lenosi L., 2011]. В молекуле тромбина имеется помимо активного центра связывания с рецептором – дополнительный, что обуславливает его высокую специфичность в отборе расщепляемых субстратов. Этот дополнительный центр играет важную роль в связывании тромбина с фибриногеном и мембранными рецепторами, активируемыми протеиназами [Holinstat M., 2007]. Тромбин активирует тромбоциты, взаимодействуя с двумя типами трансмембранных рецепторов PAR-1 и PAR-4 (от англ. «Protease Activated Receptors»). При этом PAR-1 является основным рецептором, так как обладает большим сродством к тромбину. Активация этого рецептора приводит к высвобождению биологически активных веществ из α - и β -гранул. В случае блокады рецептора PAR-1 сохраняется реакция тромбоцитов на высокие дозы тромбина за счет способности связывания с рецептором PAR-4. Активация последнего вызывает высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума и дегрануляцию β -гранул. Угнетение тромбоцитарных рецепторов PAR-1 является перспективным направлением для создания новых антитромботических препаратов. Также, необходимо отметить, что агрегация тромбоцитов, индуцированная тромбином возникает только при патологическом тромбозе, в отличие от активации тромбоцитов под действием АДФ или тромбоксана A_2 (TXA_2), происходящей и в физиологических условиях, и при развитии патологического тромбоза.

Рецепторы АДФ, адреналина, серотонина. Данные физиологические индукторы относятся к слабым стимуляторам агрегации тромбоцитов, в отличие от коллагена и тромбина. Все эти рецепторы являются трансмембранными пептидными структурами и связаны с G – белками, которые через систему вторичных посредников приводят к изменению уровня кальция в тромбоцитах.

Из семейства пуриновых рецепторов наиболее хорошо изученными являются $P2X_1$, $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ [Mahaut-Smith M.P., 2011]. $P2X_1$ - это ионные каналы, являющиеся медиаторами быстрого захвата кальция, что приводит к изменению формы тромбоцитов и агрегации [Gachet C., 2006]. $P2Y_1$ - это рецептор, сопряженный с G_q -протеином. Посредством этой связи происходит активация фосфолипазы C, что приводит к образованию инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃) и вызывает последующую мобилизацию внутриклеточного кальция [Guidetti G.F., 2008].

$P2Y_{12}$ рецептор имеется только на мембране тромбоцитов и играет ключевую роль в агрегации тромбоцитов и высвобождении тромбоксана A_2 [Nagy B. Jr., 2011; Nawarskas J.J., 2011]. При его стимуляции активируется фосфоинозитид-3-киназа, которая усиливает проагрегационные сигналы, что ведет к угнетению аденилатциклазы и уменьшению уровня цАМФ. Последний вызывает секрецию тромбоцитами медиаторов агрегации тромбоцитов [Garcia A., 2010]. Одновременно происходит активация фосфолипазы A_2 , под действием которой высвобождается арахидоновая кислота и образуется ТХА₂. Связавшись со специфическими рецепторами на мембране тромбоцита, АДФ создает благоприятные условия для рецепции фибриногена на поверхности тромбоцитов, что приводит к активации гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa [Kim S., 2011].

Адреналин активирует процесс агрегации тромбоцитов, вызывая стимуляцию α_2 -адренорецепторов. При этом происходит угнетение аденилатциклазы, уменьшение уровня цАМФ и изменение содержания внутриклеточного Ca^{2+} . Также адреналин способствует активации других агонистов, в результате чего, может приводить к внутрисосудистой агрегации тромбоцитов [Moscardó A., 2011].

На поверхности тромбоцитов расположены два рецептора для серотонина, относящиеся к подтипу 5-НТ_{2A} рецепторов, сопряженные с G – белком. Механизм агрегации тромбоцитов индуцированный серотонином связан с регуляцией цАМФ-зависимых путей. Данный агонист стимулирует

поступление ионов Ca^{2+} из плазмы в тромбоциты, активируя фосфатидилинозитоловый цикл с образованием фосфатидной кислоты, которая в свою очередь является кальциевым ионофором [Holinstat M., 2007]. Через активацию G-белков, серотонин активирует фосфолипазу C, в результате чего образуется фосфатидная кислота, являющаяся кальциевым ионофором. Она высвобождает кальций из внутриклеточных депо, и присоединяет его к своим фосфатным группам. Ионы Ca^{2+} активируют работу белков актина и миозина микрофиламентов и в результате гранулы тромбоцитов подходят к системе открытых каналцев, происходит реакция высвобождения и усиливается собственный ответ клетки, что ведет к активации других тромбоцитов [Duerschmied D., 2010].

При активации тромбоцитов также повышается активность фосфолипазы A_2 тромбоцитарных мембран, что начало реакциям арахидонового каскада, приводящих к образованию мощного проагреганта тромбоксана A_2 (TxA_2). После его попадания в кровоток происходит стимуляция тромбоксановых рецепторов, в результате чего высвобождаются ионы Ca^{2+} из кальциевых депо тромбоцитов. Кроме того, TxA_2 вызывает увеличение концентрации Ca^{2+} в эндотелиальных клетках, что ведет к вазоконстрикции. Повышение уровня цитоплазматического Ca^{2+} вызывает изменение конформации гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa в мембране тромбоцитов и они приобретают способность связывать фибриноген. Нарушения равновесия в тромбоксан-простациклиновой системе также приводит к снижению продукции простациклина и уменьшает биодоступность окиси азота (NO) и, как следствие, ухудшению эндотелий-зависимой гиперполяризации, что способствует дисфункции эндотелия [Тюренков И.Н., 2011].

При повышении тромбогенного потенциала крови происходит взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами. В данном взаимодействии принимает участие молекула CD40L [Emomoto Y., 2010]. Эта молекула является трансмембранным белком, который относится к семейству туморнекротических факторов, экспрессируемых Т-, В-лимфоцитами,

мастоцитами, эозинофилами, базофилами, эндотелием и активированными тромбоцитами [May A.E., 2008]. CD40L стимулирует эндотелиальные клетки к секреции различных хемокинов, которые и притягивают лейкоциты. Возрастание уровня этого белка в плазме крови связано с повышенным риском сердечно-сосудистых случаев.

Таким образом, исходя из выше изложенного, можно заключить, что в настоящее время известны и хорошо изучены различные патогенетические звенья, приводящие к повышению функциональной активности тромбоцитов, которые могут являться потенциальными мишенями для создания новых антиагрегантных препаратов.

1.2. Фармакологическая регуляция процессов агрегации тромбоцитов.

В виду того, что активация тромбоцитов играет важную роль в патогенезе осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, антиагрегационная терапия является патогенетически обоснованной [Adewall S., 2011]. Однако арсенал препаратов блокирующих агрегацию тромбоцитов является весьма ограниченным.

В настоящее время выделяют две группы антитромбоцитарных препаратов, в основе разделения которых лежат принципы доказательной медицины, включающие эффективность и наличие побочных эффектов. Первая группа антитромбоцитарных препаратов – это лекарственные средства применение которых не рекомендуется для практической кардиологии, так как для них отсутствуют доказательные основы преимуществ перед ацетилсалициловой кислотой (АСК), неэффективности и потенциальной опасности: блокаторы синтетазы тромбоксана A_2 , антагонисты рецепторов тромбоксана A_2 , сульфинпиразон, дипиридамо́л, простаглицлин, ингибиторы $IIIa/IIIb$ рецепторов тромбоцитов для приема внутрь. Вторая группа препаратов составляет основу современной антитромбоцитарной терапии. К ней относятся: АСК, тиенопиридины (клопидогрел, тиклопидин) и блокаторы

гликопротеиновых (ГП) рецепторов IIIa/IIIb для внутривенного применения (абсиксимаб, эптифибатид и тирофибан).

АСК в настоящее время признана стандартом антитромботической терапии и является самым известным и наиболее востребованным антиагрегантным средством [Недогода С.В., 2010; Толпыгина С.Н., 2011]. Механизм антиагрегантного действия АСК состоит в необратимом ингибировании ЦОГ тромбоцитов, ацетилировании гидроксильной группы остатка серина в положении 529 молекулы фермента. Это приводит к неспецифическому стерическому угнетению его взаимодействия с субстратом – арахидоновой кислотой и блокированию синтеза TXA_2 [Бубнова М.Г., 2010]. Однако угнетение ацетилсалициловой кислотой ЦОГ 1 приводит к снижению образования простагличина - вещества с вазодилатирующим и дезагрегационным действием, что является нежелательным эффектом. В результате этого одним из побочных эффектов АСК являются гастропатии, т.е. желудочно-кишечные осложнения – эрозии слизистой оболочки, боли в эпигастральной области, изжога и кровотечения [Morini S., 2010].

В настоящее время созданы формы АСК, которые имеют защитную кишечнорастворимую оболочку (Тромбо-АСС, Аспинат-Кардио, Аспифат) [Козловский В.И., 2012]. Другим способом, который может уменьшить гастротоксичность, является комбинирование АСК с антацидным средством [Lanas A., 2006; Скотников А.С., 2011]. Перспективным представителем данной комбинации является препарат кардиомагнил.

Также ограничивает применение АСК наличие у некоторых больных аспиринорезистентности и снижение антитромботического эффекта [Postula M., 2010; Фролова Н.С., 2011; Грицан Г.В., 2013]. Согласно данным литературы от 10 до 15% больных с клиническими формами атеросклероза полностью не чувствительны к АСК [Patrono C., 2003]. Кроме того, описаны случаи вторичной аспиринорезистентности, развитие которой сложно вовремя диагностировать. В целях избежания последствий устойчивости больных к

аспирину необходим регулярный контроль уровня агрегационной активности тромбоцитов.

АСК имеет хороший фармакоэкономический показатель и доказательство преобладания пользы над возможным риском. [Dragani A., 2010]. Поэтому, учитывая применение АСК для продолжительного лечения и профилактики осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, вопросы о безопасности терапии этим препаратом очень актуальны.

Важной группой антиагрегантных средств являются производные тиенопиридина, представленные тиклопидином, клопидогрелем и празугрелем (препарат третьей генерации), а также нетиенопиридиновые производные - тикагрелор и кангрелор [Bernlochner I., 2012].

Препарат первой генерации - тиклопидин аналогичен по эффекту АСК, [Hass W.K., 1989]. Однако для этого препарата характерны выраженные побочные эффекты в виде диспепсии, кровотечения, нейтропении, агранулоцитоза и повышения содержания липопротеидов низкой и очень низкой плотности [Парфенов В.А., 2006] .

Наиболее перспективным препаратом из этого класса является клопидогрел [Fiedler K.A., 2014]. Механизм действия клопидогреля заключается в селективном ингибировании связывания АДФ с рецепторами на тромбоците и стимуляции гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa под действием АДФ [Добровольский А.В., 2009]. Таким образом, клопидогрел действует на конечный этап, который является общим для всех путей агрегации, блокируя образование фибриновых мостиков между тромбоцитами [Парфенов В.А., 2006].

Следовательно, клопидогрел отличается по механизму действия от ацетилсалициловой кислоты, которая ингибирует только вторую фазу агрегации тромбоцитов, индуцированную АДФ, а тиенопиридины угнетают обе фазы – агрегацию и адгезию, не затрагивая метаболизм арахидоновой кислоты.

Всасываясь в желудочно-кишечном тракте, клопидогрел полностью метаболизируется в печени с участием цитохрома Р-450 и его изоферментов,

превращаясь в активный метаболит - SR26443 [Ma T.K., 2010]. Антиагрегатный эффект препарата максимально проявляется через 3-7 дней. Однако у клопидогреля также наблюдаются побочные эффекты [Sikka P., 2010]. К ним относятся изъязвления в желудочно-кишечном тракте, кровотечения из верхних отделов ЖКТ, развитие тромбоцитопенической пурпуры, которая проявляется механическим повреждением эритроцитов, и неврологическими расстройствами [Zakarija A., 2009]. На сегодняшний день также описаны механизмы резистентности к клопидогрелю [Фролова Н.С., 2010; Cattaneo M., 2011].

Необходимо отметить, что клопидогрел имеет менее благоприятный фармакоэкономический показатель в сравнении с АСК.

Другой препарат из группы блокаторов пуриновых рецепторов тромбоцитов-прасугрель также является производным тиенопиридинов. Для него характерна более выраженная антитромбоцитарная активность, в сравнении с клопидогрелем и он метаболизируется в печени без участия цитохрома P-450 [Nishiya Y., 2009]. Однако его механизм действия, также носит необратимый характер блокирования функциональной активности тромбоцитов, что может приводить к кровотечениям [Udell J.A., 2014]. В настоящее время созданы и внедрены в клиническую практику ингибиторы $P2Y_{12}$ рецепторов с обратимым действием. К ним относятся препараты - тикагрелор и кангрелор, которые являются нетиенопиридиновыми производными [Lombo B., 2011; Marino M., 2014].

Новой перспективной группой соединений, находящихся в стадии экспериментальных исследований, являются вещества, блокирующие активацию тромбоцитов, вызванную $P2Y_1$ рецепторами. Механизм их действия связан с ингибированием взаимодействия АДФ с ионным каналом, влиянием на фосфолипазу C, в результате чего, возникает препятствие активации и изменению формы тромбоцитов [Maloney S.F., 2010].

На сегодняшний день привлекает внимание двойная антитромбоцитарная терапия, которая представлена комбинацией клопидогреля и

ацетилсалициловой кислоты. Интерес к такой терапии состоит в том, что комбинируемые препараты ингибируют различные пути, вызывающие агрегацию тромбоцитов, позволяя таким образом достичь более выраженного антиагрегантного эффекта. Были проведены крупные клинические исследования CURE (1999-2001), CLARITY (2003-2004), COMMIT (1999-2005), CHARISMA (2002-2005), которые подтвердили целесообразность одновременного назначения аспирина и клопидогреля.

Самой молодой группой антиагрегантных средств являются ингибиторы IIb/IIIa-гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов [Arora R.R., 2009] для внутривенного введения. Механизм действия препаратов этой группы заключается в блокировании последнего этапа агрегации тромбоцитов, а именно процесса образования тромбоцитарного тромба при помощи образования мостиков между активированными тромбоцитами из молекул фибриногена [De Luca G., 2009].

Представитель группы - препарат абциксимаб является моноклональным антителом и обладает высоким сродством к IIb/IIIa гликопротеиновым рецепторам тромбоцитов [Kastrati A., 2007].

Другие представители данной группы эптифибатид и тирофибан, в отличие от абциксимаба, относятся к конкурентным ингибиторам связывания фибриногена [Valgimigli M., 2008]. Для того чтобы эффективно подавить активность GP IIb/IIIa на поверхности циркулирующих тромбоцитов, необходимо постоянное присутствие в крови этих препаратов в высоких концентрациях.

У ингибиторов гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa имеются выраженные побочные эффекты в виде кровотечений, АВ-блокады, гипотензии, брадикардии, диспепсии, спутанности сознания, тромбоцитопении, анафилактического шока и лейкоцитоза [De Luca G., 2009].

Также представителем антиагреганых средств является дипиридамола (курантил, персантин) - производное пиримидопиримидинов. Механизм антитромбоцитарного действия дипиридамола связан с повышением уровня

цАМФ и цГМФ в тромбоцитах путем обратимого блокирования фосфодиэстеразы цАМФ, а также за счет ингибирования входа аденозина [Jensen B.O., 2011].

Другие антиагрегантные средства, к которым относятся ингибиторы тромбоксансинтетазы (дазоксiben) и рецепторов ТХА₂ (сулотробан), аналоги простациклина (эпопростенол), стимуляторы аденилатциклазы (илопрост) продемонстрировали хорошие результаты в эксперименте. Однако эти препараты не имеют доказательную основу эффективности и поэтому не внедрены широко в клиническую практику [Kuo H.L., 2010].

Также в настоящее время разработан новый обратимый ингибитор тромбина – дабигатран [Bassand J.P., 2014]. Другие антагонисты PARs проходят клинические испытания с целью применения для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, осложненных тромбозами [Coccheri S., 2010].

Следовательно, ингибирование агрегации тромбоцитов является важным звеном для предотвращения тромботических состояний. Однако опасным побочным эффектом всех антиагрегатных средств являются кровотечения [Kilickiran, 2008]. К сожалению, на сегодняшний день не существует антиагрегантного препарата, который бы селективно блокировал тромбоциты, участвующие в образовании тромба и не затрагивал нормально функционирующие тромбоциты. Поэтому поиск, изучение и создание новых антиагрегантных средств с наименьшими побочными эффектами является важной задачей в решении проблемы предотвращения состояний, связанных с повышением тромбогенного потенциала крови.

1.3. Производные индола как потенциально активные вещества в процессе регуляции функциональной активности тромбоцитов.

Химические соединения, имеющие в своей основе гетероциклические азотосодержащие структуры, обладают широким спектром биологической активности [Спасов А.А., 2006; Sawy-El R.E., 2010; Nofal Z.M., 2011]. Среди

них вызывают интерес производные индола, являющиеся чрезвычайно активными веществами, находящие широкое применение в медицинской практике как эффективные препараты с разнообразной фармакологической активностью. В настоящее время описано несколько тысяч представителей этого класса, оказывающих различное биологическое действие [Mehta D.S., 2005; Dubey P.K., 2006; Gudipati R., 2011; Biswal S., 2012]. Лекарственные средства и соединения, относящиеся к данному классу проявляют противовоспалительную, анальгетическую, противосудорожную, антибактериальную, противомаларийную, противогрибковую, противовирусную, антигипертензивную, антиоксидантную и противоопухолевую активности [Bell M.R., 1967; Hiari-Al Y., 2006; Frederich M., 2008; Sharma P.P., 2009; Prakasam T., 2010; Gupta A.K., 2012; Tunbridge G. A., 2013]. К ним относятся такие препараты, как индометацин, резерпин, ондансетрон, арбидол, карбидин, серотонина адипинат и др.

Кроме того, среди производных индола имеются препараты и высокоактивные вещества, проявляющие антиагрегантную активность [Mashayekhi V., 2013; Laube M., 2013].

Антиагрегантная активность препарата индобуфен, содержащего в своей структуре индольное кольцо, связана со способностью подавлять активность циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы тромбоцитов, уменьшая, таким образом, их функциональную активность [Bhana N., 2001].

Также показана анитромботическая активность производных индола, и продемонстрирована способность ингибировать гликопротеиновые рецепторы IIb/IIIa и уменьшать синтез TXA_2 [Mashayekhi V., 2013].

Известны вещества с доказанной антиагрегантной активностью, также как и индолы, относящиеся к классу гетероциклических соединений. К таким соединениям относятся ингибитор тромбоксансинтетазы дазоксiben [Sincholle, 1986].

Эти данные говорят о том, что для проявления веществами высокой антиагрегантной активности необходимо, чтобы в их химической структуре

присутствовал ароматический, насыщенный и/или ненасыщенный гетероцикл с одним или несколькими атомами азота. Класс производных индола отвечает данному условию, что делает его перспективным для направленного поиска новых соединений с высокой антиагрегантной активностью.

Определением выбора химического класса производных индола, среди которых проводился поиск антиагрегантных соединений, явилось наличие отработанной схемы синтеза данной группы веществ [Sengpracha W., 2005] и возможность их достаточного получения для первичного скрининга (вещества были синтезированы на кафедре химии природных и высокомолекулярных соединений химического факультета Южного Федерального Университета (к.х.н. К.Ф. Суздалевым)). Кроме того, на основе рекомендаций, разработанных по результатам проводимых исследований, в перспективе появится возможность синтезировать новые соединения с желаемыми фармакологическими и фармакодинамическими свойствами.

Все вышеизложенное послужило причиной для начала изучения новых потенциальных антиагрегантных препаратов на основе производных индола.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы

Изучено 19 соединений под лабораторным шифром Sbt и 10 веществ под лабораторным шифром SS. Из них 24 относятся к гидрохлоридам N-[(1-RR¹-амино)карбонил-2-(1-R²+1H-индол-3-ил)винил]-R³-амидам и 5 - к 1-R¹-амино-3-(3-R²-1H-индол-1-ил)-2-пропанолам.

Данные соединения синтезированы на кафедре химии природных и высокомолекулярных соединений химического факультета Южного Федерального университета к.х.н. К.Ф.Суздаевым.¹ Структурные формулы изученных соединений представлены в таблице 2.1.

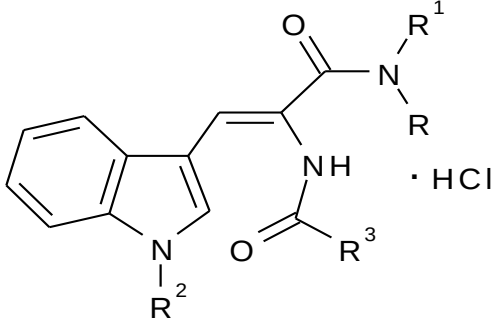
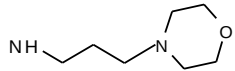
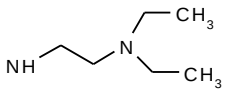
В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовались следующие вещества: динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Serva», Германия), арахидоновая кислота («Sigma», США), адреналин («Sigma», США), U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) («Sigma», США), тромбин («Sigma», США), коллаген (НПО «Ренам», Россия). Патологические состояния на животных воспроизводили при помощи динатриевой соли аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (Reanal, Венгрия), хлоралгидрата (Органика, Россия), хлорида железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия), аллоксана (*Merck*, США).

Для проведения экспериментальных исследований использовали следующие реактивы: цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия), натрия хлорид (х.ч.), натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) («ICN», США), трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид (х.ч.), кальция хлорид (ч.д.а.) производства «Мосреактив» (Россия), Hepes free acid («MP Biomedicals», Германия), формалин (Acros organics, США), ЭГТА (этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир тетрауксусной кислоты)) («Sigma», США), калия хлорид (х.ч.), гидрокарбонат натрия (х.ч.), магния хлорид (х.ч.),

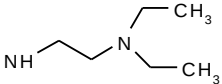
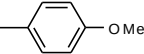
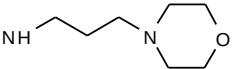
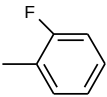
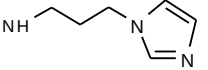
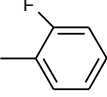
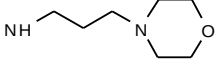
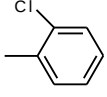
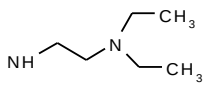
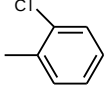
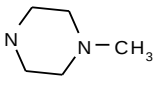
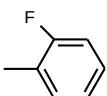
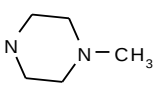
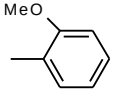
¹Выражаем искреннюю благодарность к.х.н., К.Ф.Суздаеву за любезно предоставленные субстанции веществ.

Таблица 2.1.

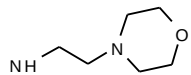
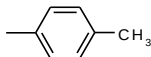
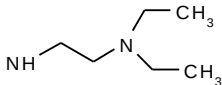
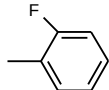
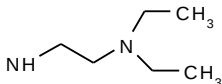
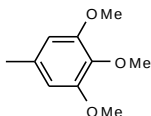
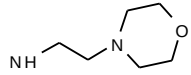
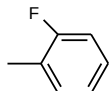
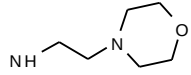
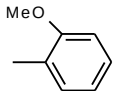
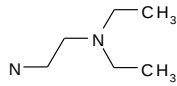
Химическое строение изученных производных индола

№ п/ п	Шифр соединения	NRR ¹	R ²	R ³	Брутто формула	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6	7
1. Гидрохлориды N-[(1-RR¹-амино)карбонил-2-(1-R²-1H-индол-3-ил)винил]-R³-амидов 						
1	SBT-68		C ₂ H ₅	Ph	C ₂₇ H ₃₄ N ₄ O ₃ ·HCl	497.08
2	SBT-79		C ₂ H ₅	Ph	C ₂₆ H ₃₂ N ₄ O ₂ ·HCl	469.07

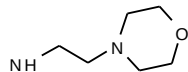
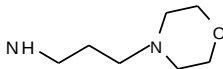
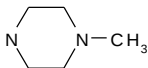
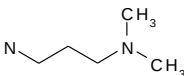
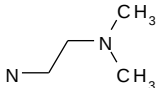
Продолжение таблицы 2.1

3	SBT-11		C_2H_5		$C_{27}H_{34}N_3O_3 \cdot HCl$	499.1
4	SBT-26		$SO_2N(Me)_2$		$C_{27}H_{32}FN_5OS \cdot HCl$	594.15
5	SBT-46		$SO_2N(Me)_2$		$C_{26}H_{27}FN_6O_4S \cdot HCl$	575.1
6	SBT-5		C_2H_5		$C_{27}H_{31}ClN_4O_3 \cdot HCl$	531.53
7	SBT-8		C_2H_5		$C_{26}H_{31}ClN_4O_2 \cdot HCl$	503.52
8	SBT-713		$SO_2N(Me)_2$		$C_{25}H_{28}FN_5O_4S \cdot HCl$	550.1
9	SBT-130		C_2H_5		$C_{26}H_{30}N_4O_3 \cdot HCl$	483.05

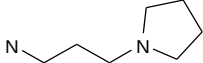
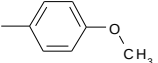
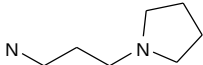
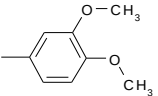
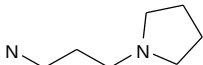
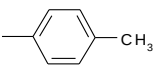
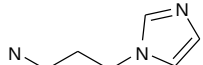
Продолжение таблицы 2.1

10	SBT-708		$\text{SO}_2\text{N}(\text{Me})_2$		$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}^*\text{HCl}$	576.16
11	SBT-143		C_2H_5		$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{FN}_4\text{O}_2^*\text{HCl}$	487.06
12	SBT-178		C_2H_5		$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5^*\text{HCl}$	559.15
13	SBT-140		C_2H_5		$\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{FN}_4\text{O}_3^*\text{HCl}$	501.04
14	SBT-109		C_2H_5		$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4^*\text{HCl}$	513.08
15	SS-31		CH_3	Ph	$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$	455,01

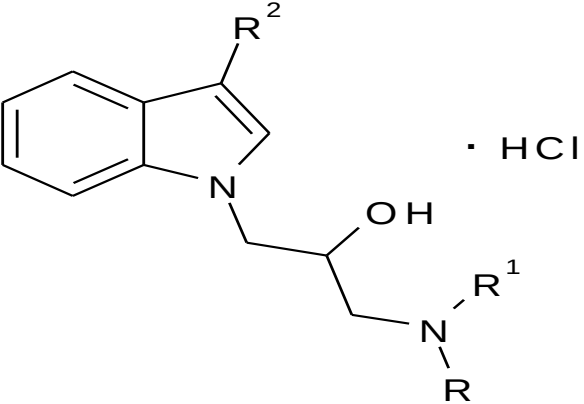
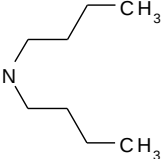
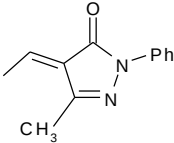
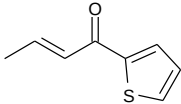
Продолжение таблицы 2.1

16	SS-32		CH ₃	Ph	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₃ · HCl	469,0
17	SS-33		CH ₃	Ph	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₃ · HCl	483,02
18	SS-34		CH ₃	Ph	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₂ · HCl	438,97
19	SS-35		CH ₃	Ph	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₂ · HCl	440,99
20	SS-36		CH ₃	Ph	C ₂₃ H ₂₆ N ₄ O ₂ · HCl	426,96

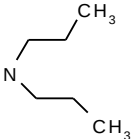
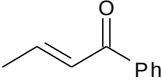
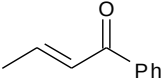
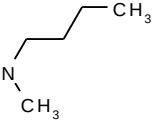
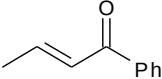
Продолжение таблицы 2.1

21	SS-41		CH ₃		C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₃ · HCl	497,05
22	SS-43		C ₂ H ₅		C ₂₉ H ₃₆ N ₄ O ₄ · HCl	541,1
23	SS-46		CH ₃		C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₂ · HCl	481,05
24	SS-56		CH ₃	Ph	C ₂₅ H ₂₅ N ₅ O ₂ · HCl	463,98

Продолжение таблицы 2.1

№ п/п	Шифр соединен ия	NRR ¹	R ²	Брутто формула	Молекулярная масса
2. Гидрохлориды 1-R¹R²-амино-3-(3-R²-1H-индол-1-ил)-2-пропанолов 					
25	SBT-25			C ₃₀ H ₃₈ N ₄ O ₂ *HCl	523.16
26	SBT-828			C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₂ S*HCl	431.04

Окончание таблицы 2.1.

27	SBT-814			$C_{26}H_{32}N_2O_2 \cdot HCl$	441.06
28	SBT-820			$C_{26}H_{30}N_2O_2 \cdot HCl$	439.04
29	SBT-815			$C_{25}H_{30}N_2O_2 \cdot HCl$	427.03

глюкоза (х.ч.) (ч.д.а., Реахим, Россия), бычий альбумин, тиобарбитуровую кислоту (ДИА-М, Германия), флуоресцентный зонд Fura-2/AM (Sigma, США) и кальций-чувствительный флуоресцентный зонд хлортетрациклина (Sigma, США), Тромбо-тест, АПТВ, ТЕХ-фибриноген тест, техпластин-тест (ООО «Технология стандарт», Россия), XIIa зависимый фибринолиз (НПО «Ренам», Россия), набор «Глюкоза ФКД» (Россия).

В качестве веществ и препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту («Sigma», США), тиклопидин (Тиклид, "Sanofi-syntelabo", Франция), пентоксифиллин (Aventis, Германия), гликлазид (Servier, Франция), верапамил (ЗАО «Северная звезда», Россия), вещества - Reactive blue 2 (Basilen blue) («Sigma», США) и PPADS («Sigma», США). В качестве растворителя веществ использовали дистиллированную воду.

Опыты проводили на 14 кроликах породы «Шиншилла» весом 3-4 кг, 225 белых нелинейных крысах обоего пола массой 250-350 г. и 215 белых нелинейных мышах обоего пола массой 20-32 г. Эксперименты выполнялись согласно методическим руководствам и нормативным документам (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96; правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); правила лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, утвержденные приказом Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. № 267). Забой животных проводили с соблюдением требований, изложенных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. На момент выполнения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

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

[Введите текст]

части исследования согласован с Региональным этическим комитетом (Протокол № 154 -2012).

2.2. Методы исследований

Метод исследования функциональной активности тромбоцитов *in vitro*. Изучение влияния веществ на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* проводили согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов НПФ «Биола» 220LA (Россия). Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971). Для этого венозную кровь, забранную из ушной краевой вены кролика, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали в течение 12 мин при 1500 об/мин на центрифуге MultiCentrifuge CM 6M (Elmi, Латвия). Для получения бедной тромбоцитами плазмы, необходимой для калибровки, обогащенную тромбоцитами плазму центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут .

Данный метод основан на регистрации степени изменений светопропускания плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении к последней веществ, индуцирующих агрегацию (в условиях постоянного перемешивания), а также на анализе флуктуаций светопропускания образца суспензии, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале прибора. Необходимым условием возникновения агрегации является механическое перемешивание плазмы, которое проводилось с помощью магнитной мешалки, прилагаемой к агрегометру.

Предварительно проводили калибровку прибора по двум точкам с использованием ЭДТА. При этом светопропускание бедной тромбоцитами плазмы принималось за 0%, а светопропускание богатой тромбоцитами плазмы за 100%. Для получения контроля агрегации тромбоцитов в ходе эксперимента в кювету агрегометра последовательно вносили 300 мкл богатой тромбоцитами

плазмы и 10 мкл индуктора агрегации тромбоцитов аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Sigma» США), в конечной концентрации 5 мкМ. При изучении антиагрегантной активности соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмой добавляем 10 мкл раствора исследуемого соединения в концентрации 1×10^{-4} М. Пробы инкубировали в термостатируемых ячейках агрегометра при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут. После включения записи агрегатограммы, на 10 секунде регистрации процесса, в кювету добавляли индуктор агрегации. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту, широко используемую в клинике как антиагрегантное средство.

При регистрации процесса агрегации тромбоцитов в течение 5 минут получали кривые, отражающие падение оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы. Степень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. 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.

Новые производные индола и препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в диапазоне концентраций 1×10^{-3} – 1×10^{-6} М. Для соединений, проявивших высокую антиагрегантную активность, и препарата сравнения рассчитывали величину EC_{50} (концентрация, ингибирующая активацию тромбоцитов на 50 %).

Моделирование внутрисосудистой агрегации тромбоцитов выполняли согласно методу J. F. Pinon (1984). Опыты проводили на белых беспородных крысах, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно). Влияние соединений на внутрисосудистую агрегацию кровяных пластинок оценивали через 1,5 часа после перорального введения вещества. в дозе 50

мг/кг. Стимулятор агрегации АДФ вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг. Наиболее активные соединения были изучены в дозах 10, 25 и 50 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту в дозах 125, 250 и 350 мг/кг.

Для оценки активности соединений определяли Δ % ингибирования функциональной активности тромбоцитов. Расчет ED_{50} (эффективная доза, подавляющая процесс агрегации тромбоцитов на 50%) выполняли с использованием метода регрессионного анализа.

Метод проведения анализа зависимости между антиагрегантной активностью и химической структурой производных индола. При анализе зависимости антиагрегантной активности от химической структуры производных индола все изученные вещества были разделены на классы с различным уровнем активности. В целях определения границ класса соединений с высокой антиагрегантной активностью был выполнен кластерный анализ данных по показателю $\Delta\%$ (10^{-4}). Кластеризацию проводили вероятностным методом гистограмм [Мандель И. Д., 1988].

По результатам анализа были выявлены следующие классы производных индола с антиагрегантной активностью:

- 1) высокоактивные – $\Delta(10^{-4}) \geq 50 \%$
- 2) умеренно активные – $\Delta(10^{-4}) \geq 25 \%$
- 3) низко активные – $\Delta(10^{-4}) \geq 15 \%$
- 4) неактивные – $\Delta(10^{-4}) = 0$ (условно);

Методы исследования антитромботических свойств соединений.

Эксперименты были выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 350-400 г и беспородных мышях. Изучено новое производное индола под шифром Sbt-828. В качестве препарата сравнения использовалась ацетилсалициловая кислота (Sigma, США). Вещество растворяли в дистиллированной воде и исследовали в изоэквимольной дозе ацетилсалициловой кислоте (20 мг/кг), которая составила для соединения Sbt-

828– 47,5 мг/кг и вводилось перорально за 2 часа до моделирования тромбозов, что соответствует времени достижения максимальной концентрации ацетилсалициловой кислоты в крови. Контрольные группы животных получали растворитель в эквивалентном объеме.

Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа. Антитромботическую активность соединений изучали, используя модель артериального тромбоза сонной артерии у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) согласно методу [Kurz K.D., 1990], который осуществляли спустя 2 часа после введения соединений. Крыс интраперитонеально наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг), затем послойно вскрывали кожу и ткани, отпрепаровывали сонную артерию на 3 см в длину. На участок длиной около 1 см укладывали ватный диск размером 2 мм x 8 мм, смоченный 50% раствором хлорида железа (III) (0,025 мл), и пленку Parafilm с целью изоляции окружающих тканей. Для исследования использовали ультразвуковой доплерограф «Минимакс-Допплер–К» (Санкт-Петербург). Ультразвуковой датчик аппарата устанавливался на расстоянии 1 см от ватного диска, наложенного на сонную артерию (рис.2.1.). Регистрацию кровотока проводили до полной окклюзии сосуда.

В зависимости от проявленного антитромботического эффекта с целью определения ED₅₀, (доза, в которой изученные соединения увеличивают время окклюзии сосуда тромбом по отношению к контролю на 50%) дозы веществ и препарата сравнения либо увеличивались, либо уменьшались. Они составили для Sbt 828- 12 и 23,5 мг/кг, а для ацетилсалициловой кислоты – 125 и 300 мг/кг.

Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током была поставлена согласно методу Guglielmi G. et al (1991) на нелинейных крысах – самцах массой 350-400. На данной модели в механизм тромбообразования вовлечена АТФ. В результате повреждения эндотелия сосудистой стенки воздействием постоянного электрического тока

[Введите текст]

активируется его выработка, что приводит к инициации процессов активации и агрегации тромбоцитов с формированием, в конечном итоге, тромбиновых сгустков крови.

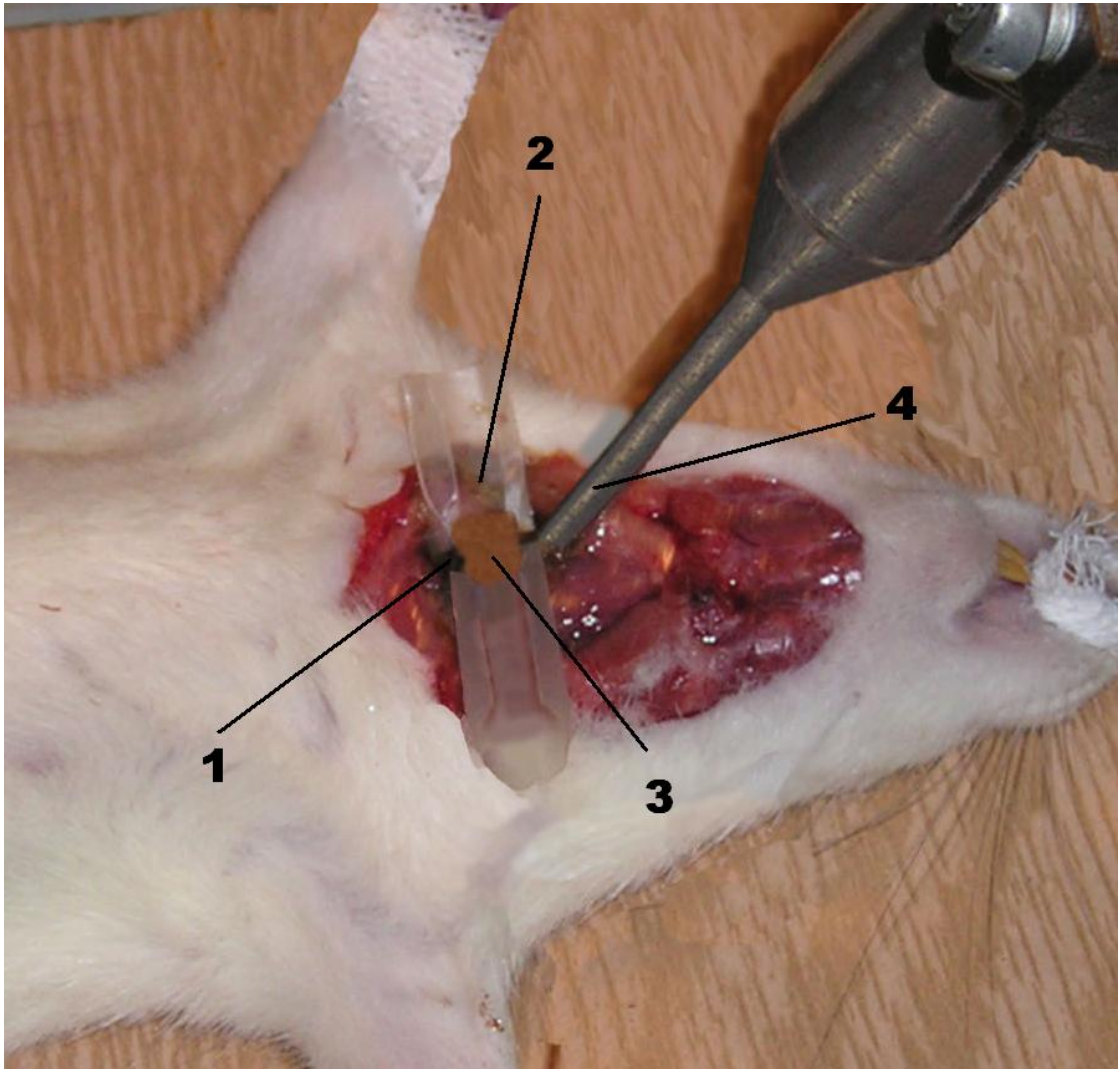


Рис. 2.1 - Моделирование артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III).

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

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

[Введите текст]

около 1 см были наложены титановые электроды, на места их контакта с артерией наносился акустический гель. Окружающие ткани изолировались пленкой Parafilm. На расстоянии 2 см от данного участка устанавливался датчик аппарата с рабочей частотой ультразвукового зондирования 25 МГц.

Индукция тромбоза сонной артерии проводилась постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока при этом соответствовала 50 мА. Воздействие на сосуд выполнялось до момента полной окклюзии. Регистрация артериального кровотока проводилась с помощью ультразвукового доплерографа «Минимакс-Допплер-К («СП Минимакс», Санкт-Петербург, Россия) (рис.2.2.). В качестве параметра, характеризующего антитромботические свойства исследуемых веществ, использовался интервал времени от момента начала стимуляции до полной окклюзии каротидной артерии.

Исходя из проявленного антитромботического действия с целью определения ED₅₀, доза вещества Sbt-828 была уменьшена до 23 и 12 мг/кг, а препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты увеличена до 60 и 125 мг/кг.

Модель генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза на мышах. Данная модель была поставлена в соответствии с методикой [Di Minno G., 1983]. Генерализованный тромбоз позволяет проводить оценку влияния соединений на процесс системной агрегации тромбоцитов. В качестве агента, вызывающего тромбоз использовали смесь растворов двух растворов: коллагена - в дозе 0,5 мг/кг и адреналина - в дозе 0,06 мг/кг. В качестве критерия эффективности исследуемых веществ фиксировали количество выживших животных по сравнению с животными контрольной группы и наличие тромбов в сосудах легких.

За выжившими животными наблюдали в течение суток. Умершие и выжившие мыши (для эфтаназии применялся эфирный наркоз) подвергались вскрытию для гистологической оценки тканей легких. У животных контрольной группы также проводили гистологическую оценку печени, сердца, почек, головного мозга. Гистологические препараты фиксировали с

[Введите текст]

использованием цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10.

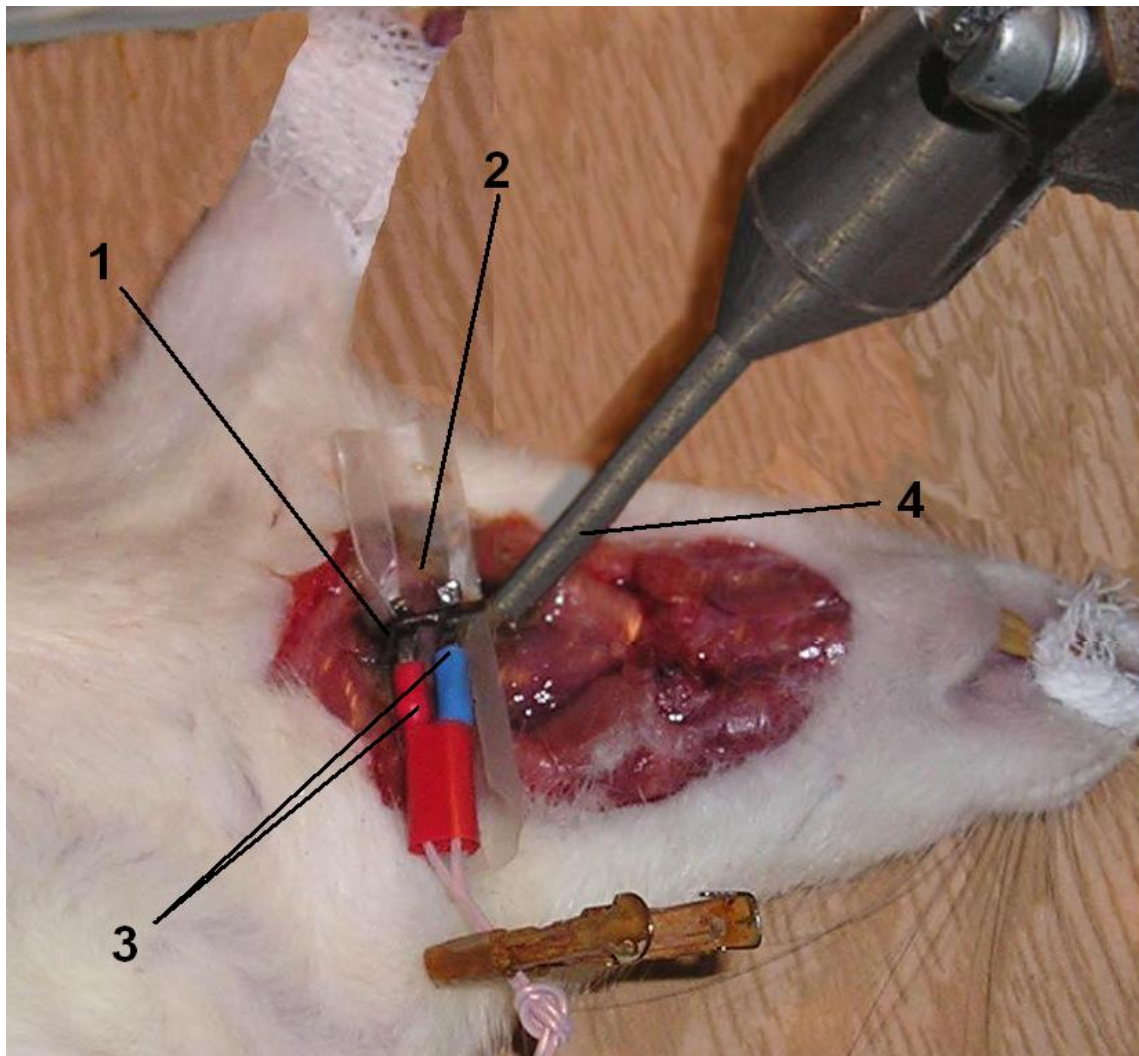


Рис. 2.2. - Моделирование артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.

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

При проведении морфологического исследования выявляли и оценивали признаки тромбообразования в стенке артериальных сосудов мышечного типа.

Для определения времени свертывания крови была использована модель «время кровотока на мышцах» [Gratacap M., 2009]. Для воспроизведения данной модели у мыши отсекали 5 мм с кончика хвоста. Хвост помещали в пробирку с физиологическим раствором на водяной бане [Введите текст]

(37⁰C) и регистрировали время от момента отсекаания кончика хвоста до момента прекращения вытекания крови из сосудов хвоста. По действию на данный параметр соединение и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота были изучены в дозах равных ED₅₀, которые были получены на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов при пероральном введении животным за 2 часа до исследования. Вещество растворялось в дистиллированной воде и вводилось перорально. Контрольные животные получали эквивалентный объем 0,9% раствора натрия хлорида.

Экспериментальный сахарный диабет вызывали свежеприготовленным на 0,01M ацетатном буфере раствором аллоксана при внутрибрюшинном введении в дозе 150 мг/кг [Chougale A., 2007]. Эксперименты проводили через два месяца на животных с тяжелой формой сахарного диабета, у которых была выявлена стойкая гипергликемия с содержанием глюкозы более 17 ммоль/л. Уровень глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом. Перед началом экспериментальных исследований осуществляли ежедневное пероральное введение соединения Sbt-828 и препарата сравнения в течение 1 недели.

Влияние препаратов на агрегацию тромбоцитов крыс с экспериментальным диабетом «ex vivo» изучали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации (модель 220 LA) научно-производственной фирмы «Биола» (г. Москва). Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах обоего пола массой 250-300 г. Определение агрегации тромбоцитов проводили по методу Born G. (1962) в модификации Габбасова З.А. и др. (1989). Для исследования пробы крови забирали из брюшного отдела аорты крыс, находящихся под наркозом, вызванным хлоралгидратом (400 мг/кг внутрибрюшинно). В качестве препарата сравнения использовали гликлазид в дозе 20 мг/кг (ED₅₀ гипогликемической активности при пероральном введении крысам с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом) [Дудченко Г.П., 1989]. Степень агрегации тромбоцитов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Вещество растворялось в дистиллированной воде

[Введите текст]

и вводилось перорально животным в дозе равной ED_{50} , полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов ежедневно в течение 7 дней. Контрольные животные с экспериментальным диабетом получали эквивалентный объем 0,9% раствора натрия хлорида.

Влияние веществ на реологические свойства крови выполнены на белых нелинейных крысах массой 250-300 г. с экспериментальным аллоксановым диабетом. Вязкость крови исследовали, используя вискозиметр ротационный типа-анализатора крови реологического (АКР-2), проводя измерения при шести скоростях сдвига (10^{c-1} , 20^{c-1} , 50^{c-1} , 100^{c-1} , 200^{c-1} , 300^{c-1}). Данные скорости сдвига моделируют различную интенсивность кровотока в сосудах [Добровольский Н.А., 1998]. Величины вязкости крови в области малых скоростей сдвига характеризуют агрегацию эритроцитов, а в области более высоких скоростей сдвига – их деформируемость.

Действие соединения на агрегацию эритроцитов оценивали по индексу агрегации эритроцитов (ИАЭ), который рассчитывали как отношение вязкости крови при самой низкой скорости сдвига (10^{c-1}) к самой высокой (300^{c-1}) [Парфенов А.С., 1994]. Вязкость крови была определена при стандартизированном гематокрите -40%.

Величину гематокрита определяли при помощи центрифугирования капилляров с образцами крови на Hematocrit Centrifuge GM-70 (Elmi, Латвия) (8000 об/мин, 3 минуты) как отношение протяженности в центрифужном капилляре столбика эритроцитов к столбику плазмы. В качестве препарата сравнения был изучен пентоксифиллин в дозе 4 мг/кг [Elenga A., 2002]. Вещество растворялось в дистиллированной воде и вводилось перорально ежедневно в течение 7 дней в дозе равной ED_{50} , полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов. Контрольные животные получали эквивалентный объем 0,9% раствора натрия хлорида.

Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током была поставлена согласно вышеописанному методу Guglielmi G. et al (1991) на нелинейных крысах – самцах массой 300-350 г. с

[Введите текст]

экспериментальным сахарным диабетом. В качестве препарата сравнения использовался гликлазид.

Изучение влияния соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами, проводили по вышеописанному методу Born G, в модификации Габбасова В.А. (1989). Исследования выполняли как на богатой тромбоцитами плазме кроликов по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971), так и на отмытых тромбоцитах.

При отмывании тромбоцитов богатую тромбоцитами плазму дважды центрифугировали с отмывочным 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 ресуспендировали в буфере с вышеуказанным составом, но с pH 7.35.

Влияние соединения на процессы агрегации тромбоцитов, индуцированной различными агонистами, изучали в диапазоне концентраций $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-7}$ М. Исследуемое вещество добавляли за 5 минут до внесения индукторов в плазму крови кроликов. Концентрации индукторов составляли: для АДФ и адреналина – 5 мкМ, арахидоновой кислоты - 50 мкМ, тромбина - 0,5 ед/мл, коллагена - 20 мкг/мл, U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) - 3 мкМ. Для оценки активности соединения определяли максимальную амплитуду агрегации, Δ % ингибирования функциональной активности тромбоцитов и EC₅₀ в молях.

Влияние соединения Sbt-828 на пуриновые P2Y₁ и P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов изучали методом малоуглового светорассеяния [Сакаев М.Р., 2000]. Данный метод делает возможным оценку всех стадий трансформации тромбоцитов. Регистрацию проводили на приборе «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия) в термостатируемой кюветной камере. Гомогенность гидродинамического турбулентного режима обеспечивалась специальной конструкцией мешалки. На кювету, содержащую 5 мл среды и 10^6 - 10^7 клеток/мл плазмы, обогащенной тромбоцитами, под углом 90° направлялся свет

[Введите текст]

от лазерного источника. Регистрация интенсивности светорассеяния осуществлялась фотодиодами в диапазоне углов 2-14 градусов (с шагом в 2 градуса), сигналы с которых через первичный блок преобразования поступали в регистрирующее устройство. Быстрое увеличение интенсивности светорассеяния в углах 10 и 12 градусов при внесении агониста агрегации отражает сферизацию тромбоцитов, которая вызывается повышением уровня внутриклеточного кальция, с полезной величиной сигнала 30-60%. Дальнейшая инвертация сигнала вызвана образованием псевдоподий и развитием агрегации. Динамика интенсивности светорассеяния в углу 2 градуса отражает только агрегационные процессы.

Исследования проводились на богатой тромбоцитами плазме кроликов. Активацию тромбоцитарных $P2Y_1$ -рецепторов проводили в безкальциевой среде, с добавлением 5 мМ ЭДТА. В качестве индуктора активации данных рецепторов использовали АДФ в концентрации 70 нМ. Эксперименты по оценке влияния соединений на $P2Y_{12}$ -рецепторы проводились в среде, содержащей 1 мМ кальция хлорида, индуцированной АДФ, в концентрации 200 нМ. Тестируемое вещество исследовали в дозе 1×10^{-6} М и вносили в кювету за 2 минуты до начала исследования.

Активность соединения по влиянию на пуриновые рецепторы тромбоцитов оценивали по ингибированию процессов активации и агрегации тромбоцитов. В качестве препарата сравнения использовали вещество PPADS.

Исследования по изучению воздействия на синтез TXA_2 проводили по методу J.B. Smith (1976). Для изучения влияния вещества на биосинтез TXA_2 использовали тест определения уровня малонового диальдегида (МДА).

Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах обоего пола массой 250-300 г. Изучение действия вещества на уровень TXA_2 производили в дозе ED_{50} , полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов. Соединение вводилось перорально за 2 часа до исследования. Группе контрольных животных вводился растворитель в эквивалентном количестве. У наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно) животных

забирали кровь из брюшной аорты и получали суспензию тромбоцитов путем многократного отмывания по вышеописанному методу. Определение МДА выполняли при концентрации тромбоцитов, равной 3×10^8 клеток/мл. В качестве препарата сравнения была выбрана ацетилсалициловая кислота.

Для проведения исследования агрегацию тромбоцитов индуцировали тромбином в концентрации 25 ед/мл. Контроль агрегации тромбоцитов под действием тромбина проводили на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 230 LA). Определение МДА в тромбоцитах проводили с помощью тиобарбитуровой кислоты по методу В.Б Гаврилова (1987). Измерение выполняли на спектрофотометре APEL PD-303 UV (Япония) (длина волны - 532 нм). Концентрацию МДА рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции равного $1,56 \times 10^5$ М.

Антиагрегационную активность сосудистой стенки исследовали согласно методу D. E. MacIntyre (1978), в модификации В.П. Балуды (1980), который основан на способности кусочка сосудистой стенки, помещенного в богатую тромбоцитами плазму, выделять простациклин и ингибировать агрегацию кровяных пластинок, вызванную различными индукторами.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах массой 250-350 г. Плазму, обогащенную тромбоцитами, получали по вышеописанному способу. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в концентрации 5 мкМ. Изучение влияния вещества на антиагрегационную активность сосудистой стенки производили в дозе, соответствующей ED_{50} , полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

На первом этапе исследований изучали влияние соединения на антиагрегационные свойства сосудистой стенки интактных животных. Для этого животным, внутривенно за 30 минут до наступления наркоза, вводили изучаемое вещество, после чего извлекали участок брюшной аорты и проводили определение ее антиагрегационной функции.

Во второй серии экспериментов исследовали способность вещества восстанавливать снижение антиагрегационной способности стенки сосудов,

[Введите текст]

вызываемое внутривенным введением адреналина в дозе 0,02 мг/кг. Исследуемое вещество вводили через 15 минут после инъекции адреналина, а еще через 15 минут проводили оценку способности сосудистой стенки аорты ингибировать агрегацию тромбоцитов. Для оценки активности соединений определяли максимальную амплитуду агрегации и Δ % ингибирования функциональной активности тромбоцитов.

Влияние соединения на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах проводили по методу Cho M. et al (2006). Для этого отмытые тромбоциты (10^8 /мл) кролика были проинкубированы с 5 мкМ Fura-2/AM в течение 30 минут при $t=37^\circ\text{C}$ в присутствии или отсутствии хлорида кальция (1 mM). В качестве препаратов сравнения были выбраны антагонист ионов кальция верапамил и ацетилсалициловая кислота. Для стимуляции выхода интрацеллюлярного кальция из внутриклеточных депо был использован тромбин в концентрации 0,5 ед/мл.

Перед проведением данных исследований была изучена способность соединений связывать ионы кальция. Для этого сравнивали влияние веществ на уровень кальция в интактных тромбоцитах с влиянием хелатора этих ионов ЭГТА. Оценка действия соединений и препаратов сравнения на уровень внутриклеточного кальция проводилась в диапазоне концентраций от 100 до 1 мкМ. Интенсивность флуоресценции была измерена на спектрофлуориметре Hitachi MPF - 400 (Япония) при длине волны возбуждения 340 nm и 380 nm и длине волны испускания 510 nm в течение 2 минут. Концентрация катионов кальция рассчитывалась с использованием уравнения (Schaeffer and Blaustein, 1989):

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

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.

Для изученных соединений были экспериментально определены величины EC_{50} (эффективные концентрации, в которых изученные соединения подавляют процесс высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} на 50%)

Уровень мембраносвязанного кальция в тромбоцитах измеряли с использованием кальций-чувствительного флуоресцентного зонда хлортетрациклина в концентрации 20 мкМ по методу, описанному Gasvelli A.H. и Hutchison J.D (1971). Данный метод основан на увеличении интенсивности флуоресценции хлортетрациклина при связывании его ионами кальция, находящимися в мембранах. Для исследования использовалась богатая тромбоцитами плазма кроликов, содержащая 3×10^8 клеток/мл. Оценка действия соединений на уровень внутриклеточного и мембраносвязанного кальция проводилась в диапазоне концентраций от 100 до 1 мкМ.

Интенсивность флуоресценции была измерена на спектрофлуориметре Hitachi MPF - 400 (Япония) при длине волны возбуждения 400 nm и длине волны испускания 530 nm. В качестве контроля оценивали флуоресценцию хлортетрациклина с обогащенной тромбоцитами плазмой при добавлении физиологического раствора натрия хлорида. Определяли активность вещества в процентах по отношению к контролю.

Влияние исследуемого соединения на показатели коагулограммы крови крыс определяли на гемокоагулометре «SOLAR» (Белоруссия) с использованием наборов реактивов производства «Технология–стандарт» (Россия), методиками, которые основаны на автоматическом определении клоттингового времени (время свертывания) [Баркаган З.С., 1999]. При патологии результаты коагуляционных тестов проявлялись в виде укорочения или удлинения клоттингового времени. Для калибровки прибора и выполнения тестов использовалась нормальная калибровочная плазма. Все коагуляционные

[Введите текст]

анализы проводили на бедной тромбоцитами плазме крыс. Методика получения бедной плазмы соответствует выше описанной.

Соединение Sbt-828 было изучено в дозе, соответствующей ED₅₀, полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов. Вещество растворялось в дистиллированной воде и вводилось перорально. Группы контрольных животных получали эквивалентный объем 0,9% раствора натрия хлорида.

Кровь забирали через два часа с момента введения соединений из брюшной артерии животных после их наркотизации внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (400 мг/кг).

Для определения протромбинового времени в кювету коагулометра вносили 100 мкл бедной тромбоцитами плазмы, затем помещали в кюветное отделение и вносили магнитный якорь. С этого момента начинали обратный отсчет времени (120 секунд) – время инкубации плазмы в автоматическом режиме при работающей магнитной мешалке. По окончании инкубационного времени в кювету дозатором вносили 200 мкл тромбопластин-кальциевой смеси со стандартизированной активностью. Время свертывания считывалось с дисплея коагулометра. Использование этого теста позволяет оценивать нарушение факторов активации внешнего пути свертывания.

Для определения тромбинового времени 100 мкл исследуемой, бедной тромбоцитами плазмы и магнитный якорь вносили в кювету. После инкубации пробы (120 секунд при 37°C) в нее добавляли 100 мкл стандартизированного по активности рабочего раствора тромбина. Тромбиновый тест позволяет оценить кинетику конечного этапа свертывания крови - скорость превращения фибриногена в фибрин.

Фибриноген в крови определяли хронометрически на коагулометре «SOLAR» (по Клаусу). 200 мкл разведенной имидазоловым буфером плазмы (1:5) инкубировали в кюветном отделении при работающей мешалке. По окончании времени инкубации в кювету вносили 100 мкл прогретого рабочего

раствора тромбина. Коагулометр автоматически регистрировал время образования первых нитей фибрина.

При определении *активированного парциального тромбопластинового времени* регистрировали время свертывания рекальцифицированной плазмы в условиях контактной и фосфолипидной активации. Для этого к 100 мкл бедной тромбоцитами плазме добавлялось 100 мкл кефалин-каолиновой суспензии. После проведения инкубации полученной смеси в кювету вносилось 100 мкл 0,28% раствора хлорида кальция (25 мМ). Использование этого теста позволяет оценить нарушение активности или дефицит факторов активации свертывания внутреннего пути.

Метод определения фибринолитической активности плазмы крови.

Данный метод основан на измерении времени полного лизиса эуглобулиновой фракции, полученной из плазмы крови при осаждении в кислой среде и содержащей факторы свертывания крови и фибринолиза.

Для проведения эксперимента венозную кровь, взятую из ушной краевой вены кролика, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали в течение 12 мин при 1500 об/мин на центрифуге MultiCentrifuge CM 6M (Elmi, Латвия). Для получения бедной тромбоцитами плазмы пробирки с богатой тромбоцитами плазмой центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. Для изучения фибринолитической активности соединения Sbt-828 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты, исследуемые вещества инкубировали 5 минут с плазмой бедной тромбоцитами в концентрациях равных $ЭК_{50}$, полученных при изучении их на моделях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (см.гл.3). Затем в чистую пробирку добавляли 8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл 1% раствора уксусной кислоты, 0,5 мл бедной тромбоцитами плазмы и 0,5% суспензии каолина. После этого полученную смесь перемешивали и инкубировали при $t=37^{\circ}$ в течение 30 минут. Затем центрифугировали 6 минут при 1500 об/мин и после этого отбирали надосадочную жидкость. К оставшемуся осадку добавляли 0,5 мл рабочего

буферного раствора, полученного разведением дистиллированной водой концентрированного имидазолового буфера, перемешивали полученную смесь, затем вносили в нее 0,025 М раствор кальция хлорида. Через 30-60 с после образования сгустка включали секундомер и отмечали время полного лизиса сгустка.

Острая токсичность и расчёт условного терапевтического индекса.

Острую токсичность определяли на белых неинбредных мышах-самцах массой 20-25 г. при внутрибрюшинном введении. За животными наблюдали в течение двух недель после введения вещества. Для расчета величины токсикологического показателя LD_{50} использовали метод Личфилда-Вилкоксона в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития [Миронов А.Н., 2012].

Условный терапевтический индекс соединений определяли как отношение показателя LD_{50} к EC_{50} . Расчет EC_{50} проводили методом регрессионного анализа.

Изучение общетоксических свойств выполняли, используя многотестовое наблюдение по С. Ирвину [Irwin S., 1964]. Соединение Sbt-828 вводили внутрибрюшинно однократно лабораторным мышам в возрастающих дозах: 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг и 150 мг/кг. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Контрольная группа животных получала растворитель в аналогичном объеме. Перед введением растворов веществ исследовались исходные показатели тестов. Всего было 7 экспериментальных групп по 5 особей в каждой.

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

1. Интегральные показатели: общее состояние, характер шерстного покрова, состояние слизистых оболочек (окраска, наличие и характер выделений, отечность), оформленность и цвет фекалий.

2. Изменение эмоционального состояния (вокализации, агрессия и пугливость), нарушения со стороны ЦНС (синдром Штраубера, тремор, парезы, судороги), рефлекс (слуховой, роговичный, ипсилатеральный сгибательный).

3. Двигательную, мышечную координацию и реактивность: двигательная (Ротарод-тест) и мышечная (удержание на проволоке, сетке) координации, поведенческая реакция (реактивность), наличие синдрома «горбатости».

4. Функциональное состояние вегетативной нервной системы: тест «открытое поле», частота дыхания, цвет кожи, ректальная температура, наличие или отсутствие экзофтальма, птоза.

Реактивность мышей оценивалась по характеру реакции на изменение окружающей обстановки в виде перемещения на открытый стол.

Настороженность определялась ориентировочными рефлексам при использовании стандартного звукового раздражителя (громкий хлопок).

Пугливость животных оценивалась при прикосновении корнцангом.

Тремор, судороги, характер походки, изменения положения тела и конечностей оценивались при визуальном наблюдении.

Для исследования изменения координации двигательной активности проводили «Ротарод тест», при котором регистрировали продолжительность удержания животного на металлической перекладине диаметром 3 см, вращающейся со скоростью 10 оборотов в минуту. Влияние вещества на мышечную координацию оценивали в «тесте удержания на проволоке и сетке». При этом отмечали количество лапок цепляемых мышью за проволоку и сетку, переводя затем в баллы (1 лапка – 1 балл).

Роговичный и слуховой рефлекс оценивались по реакции отдергивания головы при раздражении роговицы и слухового прохода соответственно. Ипсилатеральный сгибательный рефлекс измерялся путём сдавливания лапы

[Введите текст]

зажимом с постоянным уровнем компрессии с оценкой времени возникновения и силы реакции.

Возбудимость мышей определялась в тесте «открытое поле», позволяющем оценивать также ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования животных (Воронина Т.А., 2005). Установка «открытое поле» представляла собой квадратную площадку размером 80х80 см с имеющимися 16 отверстиями в полу и разделенной на 25 равных квадратов с выделением центральной зоны поля, с освещенностью площадки 90 Лк. Животное помещалось в центральный квадрат площадки хвостом к экспериментатору. Наблюдение за животными проводили в течение 2 минут и регистрировали следующие показатели: число пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность), число вставаний на задние лапы (вертикальная двигательная активность) и число заглядываний в отверстия (ориентировочно-исследовательская активность), число выходов в центральную зону, количество фекальных болюсов (эмоциональный фактор) [Буреш Я., 1991].

Регистрация болевой реакции осуществлялась при наложении зажима на основание хвоста. Общий тонус скелетных мышц оценивался по отдергиванию передней лапки при захватывании её.

Термометрия проводилась с помощью электронного термометра («OMRON», Германия) при введении в прямую кишку на глубину 15 мм.

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

О действии соединения, изучаемого в разных дозах, на состояние животных судили по изменению регистрируемых показателей по сравнению с контрольными значениями, а так же проводили сравнение результатов опытных групп между собой.

Статистическую обработку данных проводили с помощью встроенных функций программы Excel из пакета Office XP (Microsoft, США) (среднее арифметическое значение, стандартная ошибка средней арифметической),

[Введите текст]

программ «Statistica 6.0» (StatSoft, США) и «Graph.Pad.Prism.5.0» (США). Для статистической обработки данных скрининга использовали непараметрический метод сравнения независимых групп с помощью t -критерия Манна-Уитни («Statistica 6.0»). Обсчет результатов испытаний по влиянию соединений на выживаемость мышей при моделировании генерализованного тромбоза проводился с помощью точного критерия Фишера в программе «Statistica 6.0». Статистическую обработку данных, полученных при гистологических исследованиях, проводили с использованием программы «Видео Тест Морфо-4.

ГЛАВА 3. ПОИСК ВЕЩЕСТВ С АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА

Тромбообразование играет важную роль в возникновении ишемических нарушений в различных органах человеческого организма. Одним из важнейших механизмов является внутрисосудистое тромбообразование, связанное с повышением агрегации тромбоцитов [Broos K, 2011; Тюренок И.Н., 2011]. При повреждении стенки сосуда внешние факторы запускают каскад процессов, приводящих к образованию тромба за счёт взаимодействия тромбоцитов с другими клетками, плазменными белками и небелковыми веществами [Rivera J., 2009]. Поэтому проблема регуляции клеточного звена гемостаза имеет важное значение в поиске новых антиагрегантных средств.

Основываясь на вышесказанном, была проведена работа по поиску и изучению новых антиагрегантных средств по влиянию на АДФ – индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* в ряду соединений класса индола. В исследованиях выполнен анализ закономерностей между структурой и активностью с выявлением основных заместителей, отвечающих за данный вид активности.

Хорошо известно, что в организме на тромбоциты может оказывать влияние не только АДФ, а самые различные проагрегантные факторы, которыми например, являются - коллаген сосудистой стенки, фактор активирующий тромбоциты, тромбин, скорость кровотока, дислипотеидемия [Yuhki K., 2010]. Поэтому с целью выделения из наиболее активных веществ соединения-лидера была воспроизведена модель внутрисосудистой агрегации тромбоцитов, которая дает возможность более полно учесть суммарное влияние патологических факторов на процесс агрегации тромбоцитов и также позволяет оценить антиагрегационный эффект изученных веществ по сравнению с исследованиями *in vitro*.

Изучение острой токсичности наиболее активных соединений и расчет условного терапевтического индекса также позволил выявить наиболее активное соединение-лидер.

3.1. Поиск веществ, проявляющих способность ингибировать процессы агрегации тромбоцитов

Проведенные исследования, позволили установить, различное ингибирующее влияние на функциональную активность тромбоцитов у изученных соединений в концентрации 1×10^{-4} М. В таблице 3.1 приведены результаты блокирующего влияния на агрегацию тромбоцитов исследованных соединений. Антиагрегантный эффект препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты составил 32,75%. Из 29 изученных веществ наиболее активными оказались соединения под шифрами: Sbt-815, Sbt-828, Sbt-820, Sbt-814, Sbt-143, Sbt-79, Sbt-130. Так вещества Sbt-815 и Sbt-828 достоверно блокировали агрегацию тромбоцитов кролика на 92,14 и 80,24%, превосходя препарат сравнения в 2,8 и 2,45 раза соответственно. Остальные из вышеперечисленных соединений также достоверно ингибировали функциональную активность тромбоцитов, превосходя ацетилсалициловую кислоту. Антиагрегантная активность новых производных индола под шифрами Sbt – 26, Sbt – 46, Sbt – 708, SS-33 также незначительно, однако, достоверно превосходила препарат сравнения. Соединения под шифром Sbt – 8, Sbt – 140, Sbt – 713, Sbt – 109, Sbt – 178, SS– 31, SS – 41, SS – 43, SS – 46, SS – 56 по проявленной активности были сравнимы с ацетилсалициловой кислотой. А вещества под шифрами Sbt – 25, SS– 32, SS– 36, уступали по антиагрегантной активности препарату сравнения в 3,5; 2,8 и 3,2 раза соответственно (табл.3.1.).

В результате проведенного поиска новых веществ со способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов из 29 соединений, было отобрано, для дальнейшего изучения 7 веществ под шифрами: Sbt-815, Sbt-828, Sbt-820, Sbt-814, Sbt-143, Sbt-79, Sbt-130, проявивших наиболее высокую активность.

Таблица 3.1.

Влияние производных индола на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* (M±m) (n=6).

№	Шифр соединения	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов в концентрации 10 ⁻⁴ М (M±m)
1.	Sbt-815	92,14±4,23*#
2.	Sbt-828	80,24±7,16*#
3.	Sbt-820	63,2±3,6*#
4.	Sbt-79	55,2±2,25*#
5.	Sbt-130	53,52±1,11*#
6.	Sbt-143	52,46±7,15*#
7.	Sbt-814	51,8±13,1*#
8.	SS-33	47,37±6,2*#
9.	SS-31	47,26±10,5*
10.	Sbt-708	45,2±2,75*#
11.	SS-43	44,48±7,9*
12.	Sbt-26	44,2±2,3*#
13.	SS-56	2,86±1,8*
14.	Sbt-713	42,53±4,84*
15.	Sbt-46	42,4±0,75*#
16.	Sbt-68	41,1±2,21*
17.	Sbt-140	41,05±6,27*
18.	SS-46	39,32±8,8*
19.	SS-41	38,90±9,5*
20.	Sbt-8	37,97±2,5*
21.	SS-35	37,14±4,1*
22.	Sbt-109	30,49±1,02*
23.	Sbt-178	29,14±3,56*
24.	Sbt-5	24,25±4,62*
25.	Sbt-11	21,25±5,24*
26.	SS-34	18,64±4,0
27.	SS-32	11,67±6,2
28.	SS-36	10,43±3,1
29.	Sbt-25	9,14±6,84
30.	Ацетилсалициловая кислота	32,75±1,10*

Примечание: * -(p≤0,05) изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни

#-(p<0,05)- изменения статистически значимы по отношению к эффекту препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты

n-число тестируемых животных.

Данные соединения были исследованы на предмет антиагрегантной активности в диапазоне концентраций $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-6} \text{ М}$. Все выбранные вещества оказали дозозависимое антиагрегантное действие, и для них была рассчитана EC_{50} .

Как видно из таблицы 3.2. наибольшую дозозависимую активность в отношении блокирования агрегации тромбоцитов проявили соединения под шифрами Sbt-815 и Sbt-828.

Таблица 3.2.

Эффективная концентрация (EC_{50}) новых производных индола и ацетилсалициловой кислоты ($(\text{M} \pm \text{m})$ ($n=6$)).

	Шифр соединения	Ингибирование агрегации $\Delta\%$ ($\text{M} \pm \text{m}$)				EC_{50} (10^{-5})
		10^{-3} М	10^{-4} М	10^{-5} М	10^{-6} М	
1	Sbt-130	—	$53,52 \pm 1,11^*$	$41,41 \pm 6,27^*$	$24,6 \pm 2,18^*$	8,15
2	Sbt-79	—	$55,2 \pm 2,25^*$	$20,6 \pm 1,10^*$	$7,03 \pm 1,99^*$	8,73
3	Sbt-143	—	$52,46 \pm 7,15^*$	$23,5 \pm 1,85^*$	$11,07 \pm 1,15^*$	9,2
4	Sbt-814	—	$51,8 \pm 13,1^*$	$33,04 \pm 9,8^*$	$15,98 \pm 2,15^*$	9,17
5	Sbt-820	—	$63,2 \pm 3,6^*$	$37,37 \pm 1,55^*$	$41,3 \pm 1,10^*$	8,0
6	Sbt-828	---	$80,24 \pm 7,16^*$	$33,2 \pm 4,36^*$	$23,69 \pm 2,18^*$	4,45
7	Sbt-815	---	$92,14 \pm 4,23^*$	$52,4 \pm 6,49^*$	$44,3 \pm 9,45^*$	1,5
8	Ацетил-салициловая кислота	$53,4 \pm 4,23^*$	$29,3 \pm 3,4^*$	$3,1 \pm 1,9$	0	71,0

Примечание: *- $p < 0,05$ – изменения статистически значимы по сравнению с контрольными значениями.

n-число тестируемых животных

При этом EC_{50} вещества Sbt-815 составила $1,5 \times 10^{-5} \text{ М}$, а соединения Sbt-828 – $4,45 \times 10^{-5} \text{ М}$. EC_{50} ацетилсалициловой кислоты была равна $71,0 \times 10^{-5} \text{ М}$. Таким образом, соединение Sbt-815 по EC_{50} превосходило препарат сравнения в 47 раз, а вещество Sbt-828 – в 16 раз.

На следующем этапе у этих двух соединений была определена острая токсичность (LD_{50}). При этом вещества вводились однократно внутривбрюшинно мышам обоего пола (см. главу 2).

В группе животных, которые получали соединение Sbt-815, наблюдались симптомы выраженного поражения центральной и вегетативной нервной систем, нарушение функциональной активности высшей нервной деятельности: появление заторможенности, отсутствия реакции на внешние раздражители (хлопок), развитие птоза, полное угнетение роговичного и слухового рефлексов, повышение болевой и тактильной чувствительности, ограничение подвижности, угнетение дыхания. Гибели животных предшествовала седация, явления каталепсии, редкие тонические судороги. При введении вещества Sbt-828 у животных наблюдалось только снижение двигательной активности и болевой чувствительности. Гибели животных предшествовали клонико-тонические судороги. Значение LD_{50} для вещества Sbt-815 составило 200 мг/кг, а для Sbt-228 - 220 мг/кг. Исходя из полученных значений LD_{50} , данные вещества можно отнести к классу низко токсичных веществ в соответствии с классификацией И.В. Саноцкого (1975). Однако наименьшую токсичность проявило соединение Sbt- 828.

На следующем этапе с целью выявления наиболее перспективного соединения была рассчитана условная широта терапевтического действия (условный терапевтический индекс (УТИ)). Расчетные данные представлены в таблице 3.3. Вещество Sbt-815 по значению условного терапевтического индекса превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 13 раз, а соединение Sbt-828 в 4,8 раза.

Таблица 3.3.

Антиагрегантная активность ($ЭК_{50}$), величина острой суточной токсичности ($ЛД_{50}$), и терапевтический индекс (ТИ) новых производных индола и ацетилсалициловой кислоты.

№	Шифр соединения	EC_{50} , 1×10^{-5} М	LD_{50} мг/кг	ТИ $LD_{50}/ЭК_{50}$
1	Sbt-815	$1,5 \times 10^{-5}$	200	31,2
2	Sbt-828	$4,45 \times 10^{-5}$	220	11,6
3.	Ацетил-салициловая Кислота	$7,1 \times 10^{-4}$	310	2,4

3.2. Зависимость антиагрегантной активности производных индола от их структуры и физико-химических свойств.

На следующем этапе был проведён анализ зависимости между антиагрегантной активностью и химической структурой новых производных индола. Для этого все изученные вещества были разделены на классы с различным уровнем активности. Так в ряду замещённых амидов производных индола доля высокоактивных веществ составила 12,5 %, умеренно активных – 66,7 %, низкоактивных – 20,84 %, неактивных – 0 %. В то же время среди производных аминспиртов ряда индола 80% соединений продемонстрировали высокую активность, и лишь одно соединение оказалось низкоактивным (табл. 3.4.).

Таблица 3.4.

Ранжирование исследуемых веществ по степени их антиагрегантной активности на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*.

Группа соединений	Количество соединений (%)			
	Высоко активные	Умеренно активные	Низко активные	Неактивные
Производные N-[(1-R ¹ -амино) карбонил-2-(1-R ² -1H-индол-3-ил) винил]-R ³ – амидов	12,5	66,7	20,8	0
Производные 1-R ¹ -амино-3-(3-R ² -1H-индол-1-ил)-2-пропанола	80	0	20	0

Так как в целом все изученные вещества ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов «*in vitro*» и отличались лишь по степени выраженности эффекта, можно предположить, что в антиагрегантную активность данного класса вносит положительное влияние базовая структура, а именно индол. Анализ влияния заместителей на высокий уровень

антиагрегантной активности в ряду замещенных амидов производился для заместителей в положении R^1 , R^2 и R^3 .

Изменение антиагрегантной активности среди замещённых амидов ряда индола наблюдалось в зависимости от структуры заместителей R^1 и R^3 у атома углерода C^7 . В положении N^9 у соединений, проявивших высокую активность, располагался этильный радикал. Максимальную антиагрегантную активность в данном ряду проявили три соединения Sbt-79, Sbt-130 и Sbt-143. В положении R^1 у веществ Sbt-79 и Sbt-143 находятся диэтиламиноэтильные заместители. При этом в положении R^3 у вещества Sbt-79 находится фенильный заместитель, а у соединения Sbt-143 он усилен атомом фтора (табл.3.5.). Другое из трех высокоактивных соединений из группы замещенных амидов вещество Sbt-130 в положении R^1 имеет 1,4-метилпиперазиновый заместитель, а в положении R^3 - 2-метоксифенильный заместитель. У соединений, проявивших умеренное антиагрегантное действие, в положении R^1 снижение данного вида биологической активности наблюдалось при замене пропиленового заместителя (SS-33, Sbt-78) на этильный у R^1 морфолин содержащих веществ (Sbt-708, Sbt-26). Последующее снижение антиагрегантной активности наблюдалось при появлении в положении R^1 пирролидинэтильных заместителей (SS-43, SS-56). Также снижение антиагрегантной активности у веществ данной группы наблюдалось при расположении в положении R^3 -2-фторфенильных заместителей (Sbt-26, Sbt-46, Sbt-713). В группе низкоактивных замещенных амидов снижение изученного вида биологической активности в группе наблюдалось у всех соединений, когда в положении N^9 располагался метильный, а в положении R^3 фенильные радикалы (SS-32, SS-34, SS-36).

Анализ структура-активность в ряду аминоспиртов производных индола показал, что изменения силы антиагрегантного действия у высокоактивных веществ данной группы зависело от заместителей в положении N^9 . Так, уменьшение R^2 -радикала на CH_2 группу (Sbt-814, Sbt-815) или его замена на гетероциклический азотосодержащий заместитель N-азепин (Sbt-820) вызывало увеличение антиагрегантной активности. В отличие от этих трех соединений

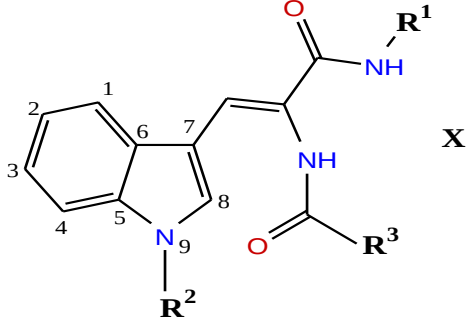
[Введите текст]

вещество Sbt-828, проявившее высокую биологическую активность в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов, в положении R^1 имеет пиперидиновый, а в положении N^9 тиенилкарбоксиэтильный заместители (табл. 3.5.).

Таким образом, в результате проведённого анализа «структура-активность» соединений, относящихся к группе новых производных индолов, установлено, что для проявления выраженного антиагрегантного эффекта в ряду замещённых амидов производных индола имеет значение структура заместителей и их сочетание у атома углерода в положении 7, а для аминоспиртов ряда индола – в положении N^9 .

Таблица 3.5.

Зависимость антиагрегантной активности от химического строения соединений класса индолов

Шифр Вещества	R ¹	R ²	R ³	X	Антиагрегантная активность (подавление АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов), Δ%
1	2	3	4	5	6
Замещённые амиды ряда индола 					
Sbt – 79	диэтиламиноэтил	этил	фенил	HCl	-55,2±2,25*

Продолжение таблицы 3.5.

1	2	3	4	5	6
Sbt-130	1,4-метилпиперазин	этил	2-метоксифенил	HCl	-53,52±1,11*
Sbt-143	диэтиламиноэтил	этил	2-фторфенил	HCl	-52,46±7,15*
SS-33	морфолинопропил	метил	фенил	HCl	-47,37±6,2*
SS-31	диэтиламиноэтил	метил	фенил	HCl	-47,26±10,5*
Sbt-708	морфолиноэтил	диэтиламиносульфо н	толил	HCl	-45,2±2,75*
SS-43	пирролидиноэтил	этил	3,4- диметоксифенил	HCl	-44,48±7,9*

Продолжение таблицы 3.5.

1	2	3	4	5	6
Sbt-26	морфолиноэтил	диэтиламиносульфон	2-фторфенил	HCl	-44,2±2,3*
SS-56	пирролидиноэтил	метил	фенил	HCl	-42,86±1,8*
Sbt-713	1,4-метилпиперазин	диэтиламиносульфон	2-фторфенил	HCl	-42,53±4,84*
Sbt-46	1-имидазолинопропил	диметиламиносульфон	2-фторфенил	HCl	-42,4±0,75*
Sbt - 68	морфолинопропил	этил	фенил	HCl	-41,1±2,21*
Sbt-140	морфонилоэтил	этил	2-фторфенил	HCl	-41,05±6,27*

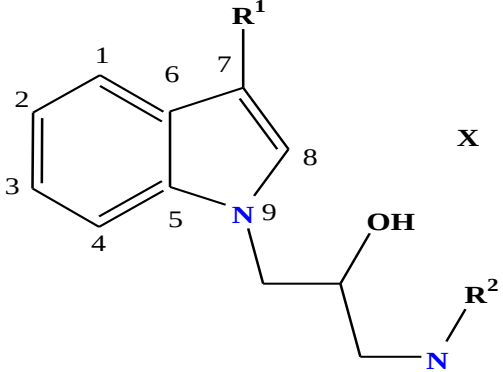
Продолжение таблицы 3.5.

1	2	3	4	5	6
SS-46	пирролидиноэтил	метил	толил	HCl	-42,4±0,75*
SS-41	пирролидиноэтил	метил	метоксифенил	HCl	-38,90±9,5*
Sbt-8	диэтиламиноэтил	этил	2-хлорфенил	HCl	-37,97±2,5*
SS-35	диэтиламинопропил	метил	фенил	HCl	-37,14±4,1*
Sbt-109	морфолиноэтил	этил	2-метоксифенил	HCl	-30,49±1,02*
Sbt-178	диэтиламиноэтил	этил	3,4,5- триметоксифенил	HCl	-29,14±3,56*

Продолжение таблицы 3.5.

1	2	3	4	5	6
Sbt-5	морфолиноэтил	этил	2-хлорфенил	HCl	-24,25±4,62*
Sbt-11	диэтиламиноэтил	этил	4-метоксифенил	HCl	-21,25±5,24*
SS-34	пиперидинометил	метил	фенил	HCl	-18,64±4,0
SS-32	морфолиноэтил	метил	фенил	HCl	-11,67±6,2
SS-36	диэтиламиноэтил	метил	фенил	HCl	-10,43±3,1

Продолжение таблицы 3.5.

1	2	3	4	5	6
Аминоспирты ряда индола 					
Sbt - 815	2-(2-метилкарбонил)вин ил	метил-(п-бутил)-амин	-	HCl	-92,14±4,23*
Sbt - 828	пиперидин	тиенилкарбоксиэтил	-	HCl	-80,24±7,16*

Окончание таблицы 3.5.

1	2	3	4	5	6
Sbt - 820	2-(2-метилкарбонил)винил	N-азепин	-	HCl	-63,2±3,6*
Sbt - 814	2-(2-метилкарбонил)винил	диэтиламин	-	HCl	-6,5±4,90
Sbt - 25					-9,14±6,84
Ацетилсалициловая кислота					-32,75±1,10*

Примечание: *-статистически значимые отличия относительно контрольного измерения ($p \leq 0,05$; критерий Манна-Уитни)

3.3. Влияние новых производных индола на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов.

Как видно из таблицы 3.6., уровень агрегации тромбоцитов контрольной группы животных составил 24,3 отн. ед. Ацетилсалициловая кислота в дозе 125 мг/кг достоверно ингибировала внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов на 28,7%. Соединение Sbt-815 уступало препарату сравнения и достоверно блокировало агрегацию тромбоцитов на 18,9%. Агрегация тромбоцитов в группе животных, получавших Sbt-828 составляла 4,11 отн.ед., что соответствовало 83,1% ингибирования (табл.3.6.).

Таблица 3.6.

Влияние соединений Sbt-815, Sbt-828 (50 мг/кг) и ацетилсалициловой кислоты (125 мг/кг) на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов, индуцированную внутривенным введением АДФ (1 мг/кг), ($M \pm m$), ($n=6$).

N п/п	Название вещества	Уровень агрегации (отн.ед.)	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов
1.	Контроль	24,3 $\pm$ 0,39	-
2.	Sbt-815,	19,7 $\pm$ 3,13*	18,9 $\pm$ 2,21*
3.	Sbt-828	4,1 $\pm$ 1,94**	83,1 $\pm$ 5,13**
4.	Ацетилсалициловая кислота	14,5 $\pm$ 0,7*	28,7 $\pm$ 3,47*

Примечание: *- ($p \leq 0,05$)- **-($p \leq 0,001$)-изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни
n-число тестируемых животных

Таким образом, соединение Sbt-828 проявило в изученной дозе выраженную способность блокировать внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов, превосходя препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту. Это подтверждает высокую антиагрегантную активность данного вещества, изученную в опытах *in vitro*. Антиагрегантное действие соединения Sbt-815 по выраженности действия не совсем совпадало с эффектом, проявленным им при изучении в опытах *in vitro*. Вероятно, низкий эффект ингибирования внутрисосудистой агрегации тромбоцитов веществом Sbt-815 связан с фармакокинетическими особенностями данного соединения.

Следовательно, для дальнейшего более глубокого изучения антиагрегантной активности на различных моделях экспериментальной патологии и механизма антиагрегантного действия было выбрано вещество Sbt-828 (рис. 3.1.).

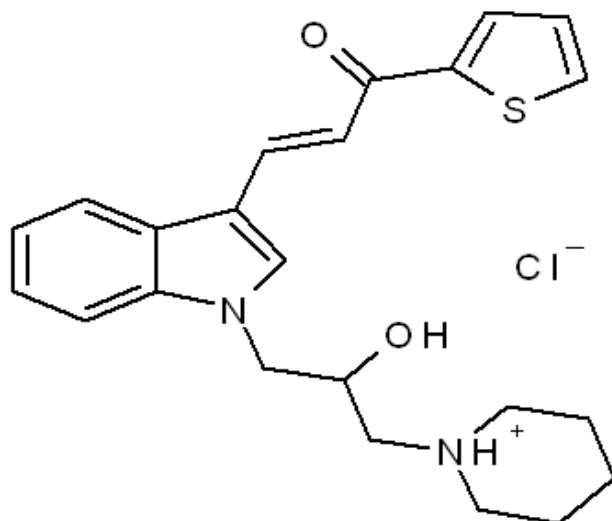
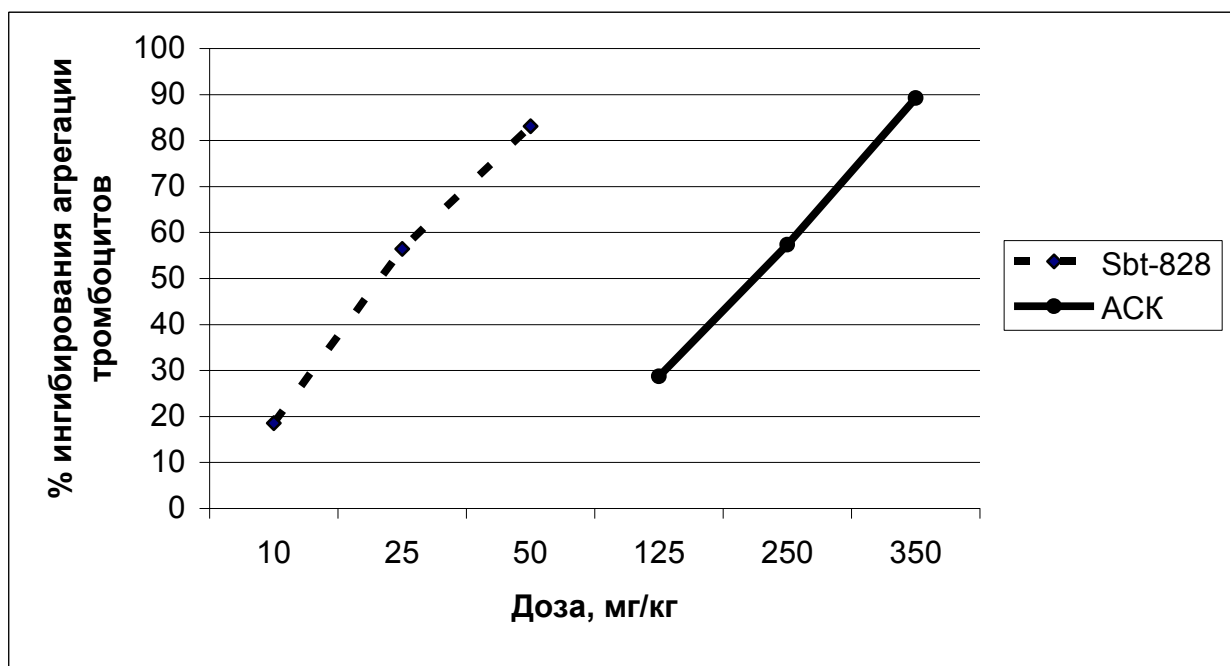


Рис. 3.1. Структурная формула соединения Sbt-828 (1-Пиперидино-3-(3-тиенилкарбоксиэтил-1H-индол-1-ил)-2-пропанола гидрохлорид (Патент РФ №2486182)

Далее была изучена дозозависимая антиагрегантная активность выбранного соединения на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов. Так, при уменьшении дозы до 25 и 10 мг/кг вещество Sbt-828 достоверно снижало уровень внутрисосудистой агрегации тромбоцитов с 24,3 отн. ед в контроле до 10,6 ($p \leq 0,01$) и 18,8 ($p \leq 0,05$) отн. ед. соответственно (рис. 6). ED_{50} данного соединения составила 21,7 мг/кг.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 350 мг/кг блокировала агрегацию тромбоцитов «in vivo» на 89,2% ($p \leq 0,001$), а в дозе 250 мг/кг на 57,8% ($p \leq 0,001$) ED_{50} ацетилсалициловой кислоты составила 192,0 мг/кг (рис.3.2.).



ис.3.2. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов крыс, индуцированную АДФ (1 мг/кг внутривенно).

Таким образом, выполненные исследования показали, что вещество Sbt-828 предотвращало внутрисосудистую агрегацию кровяных пластинок в 8,8 раза, превышая активность препарата сравнения.

3.4. Заключение

В результате проведенного экспериментального изучения 29 новых производных индола *in vitro*, было выявлено 7 соединений, проявляющих высокую антиагрегантную активность и рассчитана их EC_{50} . Из данных веществ было выделено 2 наиболее высокоактивных соединения под шифром Sbt-815 и Sbt-828, превосходящих препарат сравнения по EC_{50} в 47 и 16 раз соответственно. При изучении этих веществ на предмет острой токсичности (LD_{50}) было выявлено, что соединение Sbt-828 обладает более низкой токсичностью. По условному терапевтическому индексу вещество Sbt-815 превосходит препарат сравнения в 13 раз, а соединение Sbt-828 в 4,8 раза.

При изучении влияния соединений-лидеров на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов крыс была обнаружена низкая активность вещества Sbt-815 по сравнению с исследованиями *in vitro*. Данные результаты могут объясняться особенностями фармакокинетики данного вещества при действии на целый организм. Соединение Sbt-828 в изученной дозе вновь, как и в исследованиях *in vitro* показало высокую активность в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов и превосходило препарат сравнения. В связи с этим было изучено его дозозависимое действие с определением ED₅₀. По данному показателю вещество Sbt-828 превосходило ацетилсалициловую кислоту в 8,8 раза.

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

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА НА СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ

Артериальные тромбозы являются важным фактором, который определяет исход заболеваний сердечно-сосудистой системы [Hagedorn I., 2010]. Артериальные тромбы, формирующиеся при высокой скорости кровотока на атеросклеротическом повреждении сосудистой стенки, состоят преимущественно из скоплений тромбоцитов, фиксированных между собой фибриновыми нитями (белые тромбы) [Palomo I., 2008]. Присутствие активированного тромбина, являющегося одним из главных медиаторов активации тромбоцитов и превращения фибриногена в фибрин, определяет тактику патогенетической терапии артериальных тромбов, включающую обязательное использование фармакологических средств, снижающих агрегационные свойства тромбоцитов [Sinha A.R., 2013].

Однако при проведении антиагрегантной терапии большое внимание уделяется нежелательному эффекту в виде кровотечений, характерному для всех существующих антитромбоцитарных средств [Ueno M., 2011]. Поэтому, важным звеном изучения новых потенциальных антиагрегантных средств является показатель «времени кровотечения» с целью оценки выраженности данного побочного эффекта.

4.1. Изучение антитромботической активности соединения Sbt-828 на модели артериального тромбоза, вызванного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс

При обработке артерий крыс раствором хлористого железа (III) происходит образование тромба, показателями которого является время полной окклюзии сосуда (остановка кровотока) [Randal J., 2007].

Среднее время окклюзии сонной артерии в контрольной группе животных, которым вводился растворитель, составило 17,7 минут. При

введении внутрь крысам соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты происходило увеличение этого показателя.

Данные, полученные при изучении антитромботического действия соединения Sbt-828 представлены на рисунке 4.1.

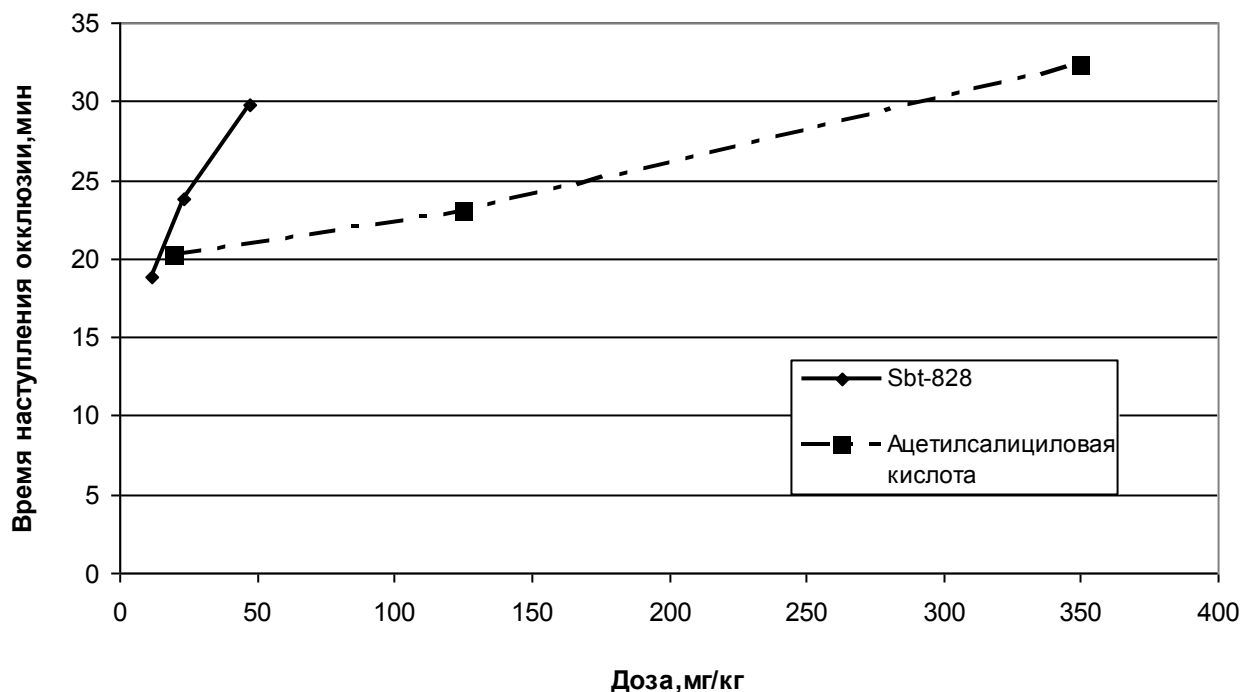


рис.4.1. Влияние соединения Sbt-828 на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III).

Соединение Sbt-828 в дозе 47,5 мг/кг достоверно увеличивало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс на 73,6 % ($p < 0,001$). При уменьшении дозы до 21,5 и 10,5 мг/кг данное вещество также пролонгировало время образования тромба на 36,8 ($p < 0,01$) и 8,04 % ($p > 0,05$) соответственно. ED₅₀ соединения Sbt-828 при этом составила 32,7 мг/кг.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 20 мг/кг увеличивала время полной окклюзии сосуда на 16,8 % ($p < 0,05$). При изучении в дозах 125 и 350 мг/кг препарат увеличивал время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс на 32,2 ($p < 0,01$) и 85,8 % ($p < 0,001$) соответственно (рис. 4.1.). ED₅₀ ацетилсалициловой кислоты при этом составила 114,74 мг/кг.

Таким образом, соединение Sbt-828 на данной модели проявило выраженную антитромботическую активность и по ED₅₀ превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 3,5 раза.

4.2. Исследование антитромботического действия вещества Sbt-828 на модели артериального тромбоза, индуцированного анодным током.

В контрольной группе животных среднее время окклюзии сонной артерии составило 14,6 мин (рис.4.2.). Введение соединения Sbt-828 перорально за два часа до воздействия электрического тока предупреждало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс. На рисунке 4.2. представлена антитромботическая активность изученного соединения и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты в изоэквимоллярных дозах. При действии соединения Sbt-828 в дозе 47,5 мг/кг время полной окклюзии сонной артерии крыс наступало на 27,3 мин. ($p < 0,001$). В дозе 35,5 мг/кг образование тромба приходилось на 21 минуту ($p < 0,01$) от начала воздействия тромботического агента. Дальнейшее снижение дозы вещества до 23,5 мг/кг пролонгировало данный показатель до 17 мин. ($p < 0,05$) (табл. 4.1.). ED₅₀ соединения Sbt-828 составила 34,3 мг/кг.

Препарат сравнения в дозе 20 мг/кг недостоверно пролонгировал время наступления полной окклюзии до 15,1 мин. (рис.4.2). В связи с этим данное соединение было изучено в более высоких дозах. Так в дозе 60 мг/кг ацетилсалициловая кислота пролонгировала время образования тромба до 17,5 мин. ($p < 0,05$), а в дозе 125 мг/ кг – до 28,5 мин ($p < 0,001$). ED₅₀ при этом составила 61,9 мг/кг.

Таким образом, при сравнительной оценке антитромботического действия соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты оказалось, что наиболее эффективным в предотвращении окклюзии сонной артерии крыс, вызванной анодным током, является производное индола, которое по силе действия в 1,8 раза превосходило препарат сравнения.

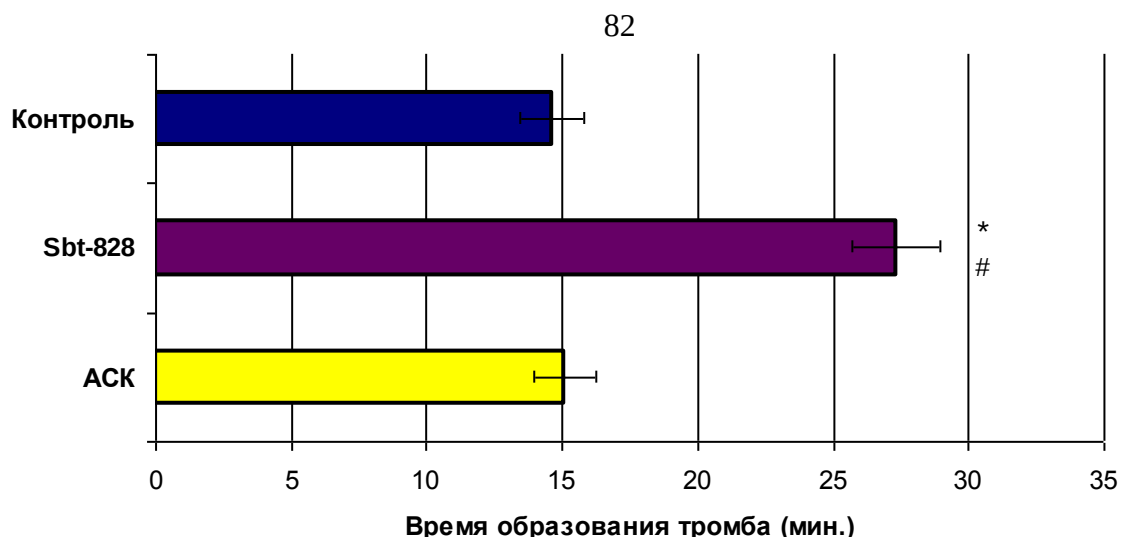


Рис.4.2. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты (АСК) в изоэквиволяльных дозах на время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс на модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током.

Примечание: АСК-ацетилсалициловая кислота.

* - изменения статистически значимы по отношению к контрольным значениям, U-критерий ($p < 0.05$).

- изменения статистически значимы по отношению к показателю активности ацетилсалициловой кислоты, U-критерий ($p < 0.05$).

Таблица 4.1.
Антитромботическая активность соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током, ($M \pm m$), ($n=6$).

N п/п	Название вещества	Доза, мг/кг	% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Sbt-828	47	86,64±5,13***	34,3
		35,5	43,83±5,59**	
		23,5	16,47±2,81*	
2.	Ацетилсалициловая кислота	125	95,0±4,32***	61,9
		60	20,3±2,83*	
		20	8,0±5,25	

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ – изменения статистически достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни

4.3. Действие соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на выживаемость мышей в условиях системного тромбоза.

При изучении антитромботического действия соединения Sbt-828 на модели системного адреналин-коллагенового тромбоза в контрольной группе животных наблюдалась гибель 95 % мышей. При наблюдении за животными после введения тромботических агентов отмечались характерные признаки нарушения дыхательной функции легких, которые проявлялись поверхностным, частым дыханием. У мышей наблюдался выраженный экзофтальм и изменение цвета радужной оболочки глаз. Также визуально определялся парез задних конечностей: мыши не двигались, не отдергивали задние лапы при сильном нажатии, возникали тетанические судороги при которых животные принимали характерную позу: задние лапы выпрямлены и отведены назад. В течение 1-3 минут после введения тромботических агентов животные погибали от удушья.

В группе мышей, получавших соединение Sbt-828, выживаемость животных составила 90%. Ацетилсалициловая кислота оказала маловыраженное недостоверное защитное действие. В группе мышей, получивших препарат сравнения, выжившие животные составили 30% (рис.4.3.).

Проведенные гистологические исследования органов*, а именно, печени, сердца, почек и головного мозга животных, которым вводились тромботические агенты, показали, что микрососуды данных органов не были повреждены тромбами, что соответствует литературным данным [Мурина М.А., 2002].

В результате электронно-микроскопического исследования в образцах легких животных контрольной группы было обнаружено преобладание альвеол средних размеров, в сосудах микроциркуляторного русла хорошо просматривались белые тромбы. Часть из них была адгезирована к сосудистой

* - Выражаем глубокую признательность зав.кафедрой патологической анатомии, д.м.н. А.В.Смирнову за помощь в проведении морфологических исследований.

стенке, а часть находилась в просветах сосудов. В артериолах обнаруживались смешанные тромбы (рис.4.5.).

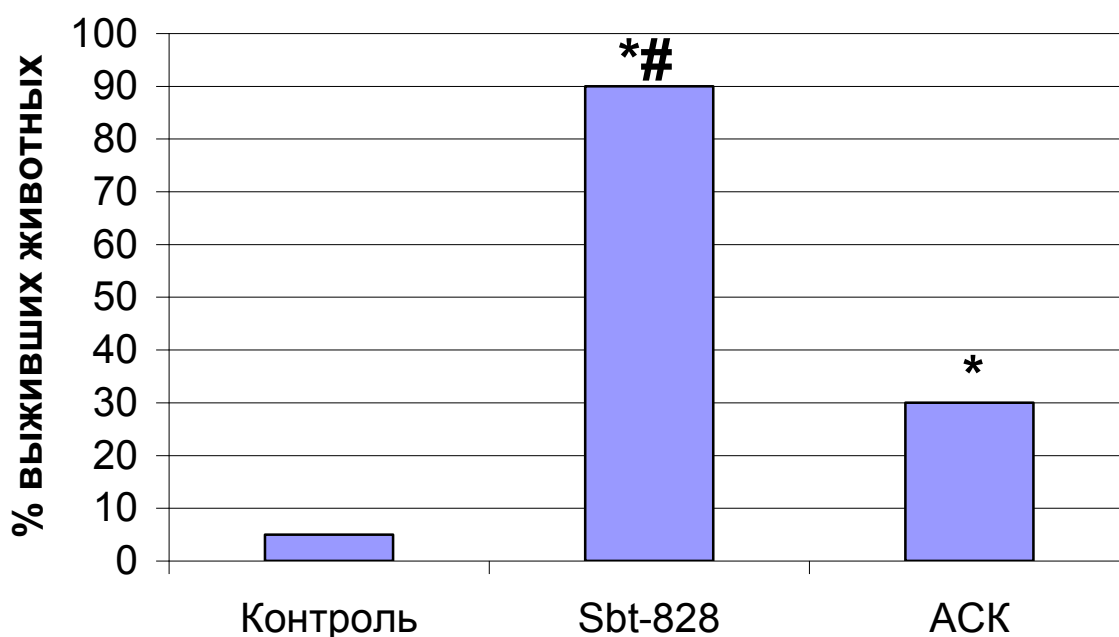


Рис.4.3. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на выживаемость мышей в условиях генерализованного тромбоза

Примечание: * $(p \leq 0,05)$ - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Фишера

$(p < 0,05)$ - изменения статистически значимы по отношению к группе мышей, получавших ацетилсалициловую кислоту

При проведении морфометрического исследования срезов легких контрольных животных выявлено, что относительная площадь тромбов на данных срезах составила 10,21%, средняя площадь тромба на срезах - 3939,8 мкм² и периметр тромба на срезах - 262,9 мкм (табл.4.2.).

При гистологическом исследовании легких животных, которые получали препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, встречались участки чередования эмфизематозно – расширенных альвеол и альвеол меньших размеров с выраженным полнокровием капилляров межальвеолярных перегородок (рис. 4.5.). В некоторых сосудах микроциркуляторного русла были выявлены белые и смешанные тромбы, адгезированные к сосудистой стенке. Отмечалось выраженное расширение тромбированных капилляров межальвеолярных перегородок. В сравнении с контролем в группе животных,

которым вводился препарат сравнения, было отмечено недостоверное снижение относительной площади тромбов на срезе легкого на 18,6 %, средней площади тромбов и их периметра на 22,9 и 5,1% соответственно (табл.4.2.).

У животных, получавших соединение Sbt-828, при электронно-микроскопическом исследовании было обнаружено нарушение кровообращения по типу полнокровия капилляров межалвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Наблюдалось утолщение межалвеолярных перегородок в результате полнокровия и отека, обнаружены также явления диапедеза эритроцитов в межалвеолярные перегородки, в просвет некоторых альвеол и очаговые, мелкие кровоизлияния. В сравнении с контрольной группой и животными, получавшими ацетилсалициловую кислоту, в группе животных, которым вводился препарат сравнения было отмечено достоверное уменьшение относительной площади тромбов на срезе легкого на 33,67 % и 18,7% соответственно. Также по сравнению с контролем соединение Sbt-828 недостоверно снижает среднюю площадь тромбов на срезе на 30,8% и периметр тромба на 10% (табл.4.2.).

Таким образом, показатели морфометрических параметров в целом соответствуют качественным структурным изменениям в сосудах легких и указывают на выраженную антитромботическую активность соединения Sbt-828.

4.4. Влияние соединения Sbt-828 на время кровотечения

На рисунке 4.6. представлены результаты исследования влияния соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на время кровотечения из хвостовой вены мыши. В контрольной группе животных время кровотечения составило $185,7 \pm 5,46$ секунд. Эти данные совпадают с показателями, которые были получены другими авторами [Ма Н., 2001].

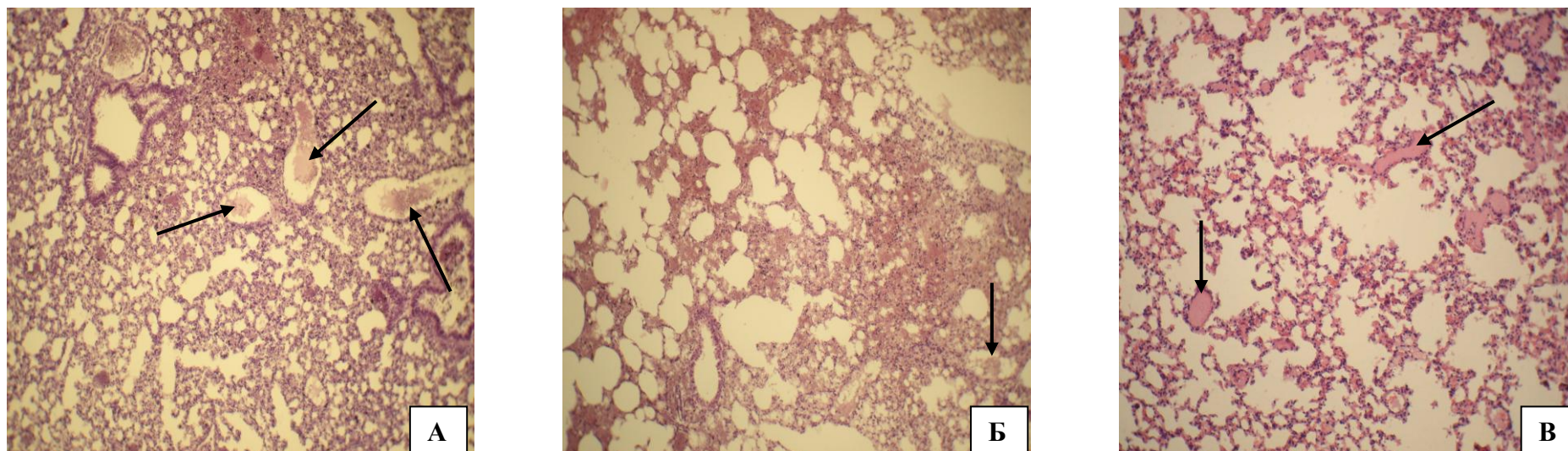


Рис. 4.5. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на тромбообразование вызванное коллагеном и адреналином в легких мышей

Окраска гематоксилином и эозином Ув.х100

Примечание: А – Контроль, Б – Sbt-828, В- ацетилсалициловая кислота,

Стрелками обозначены белые тромбы в просветах сосудов микроциркуляторного русла

Таблица 4.2. Влияние соединения Sbt-828 в дозе эквимолярной дозе ацетилсалициловой кислоты на изменение некоторых морфометрических параметров тромбов в сосудах легких мышей ($M \pm m$) ($n=6$)

№ п/п	Название вещества	Относительная площадь тромбов, %	Средняя площадь тромба на срезе, мкм^2	Периметр тромба
1.	Контроль (физ. р-р)	$10,21 \pm 2,22$	$3939,8 \pm 889,0$	$262,9 \pm 26,4$
2.	Sbt-828	$6,773 \pm 0,67^{*}\#$	$2727,1 \pm 544,4$	$236,4 \pm 33,7$
3.	АСК	$8,327 \pm 0,15$	$3037,7 \pm 314,4$	$249,4 \pm 27,1$

Пимечание: *- ($p \leq 0,05$) - изменения статистически значимы по отношению к контролю, # - ($p \leq 0,05$) - изменения статистически значимы относительно препарата сравнения, критерий Манна-Уитни;
n - число тестируемых животных.

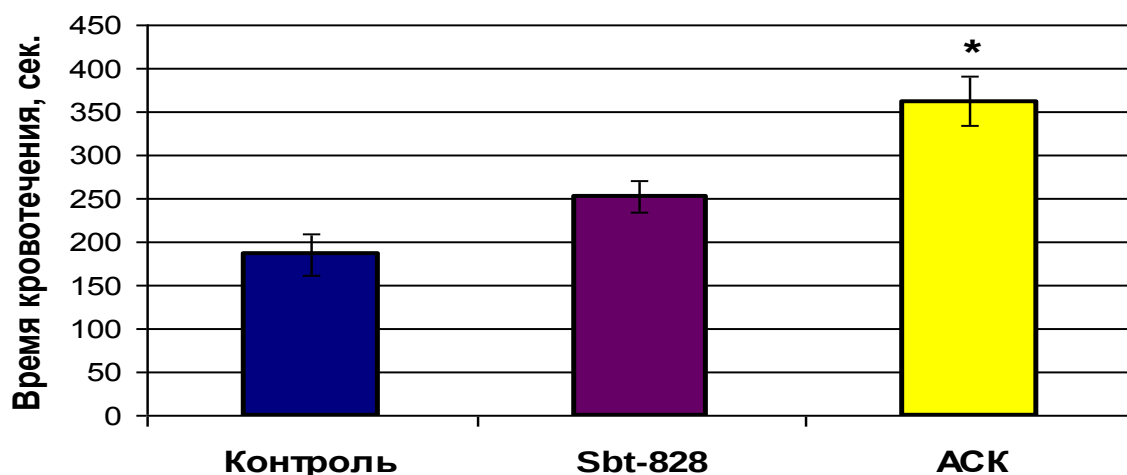


Рис 4.6. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на время кровотечения у мышей. Примечание: АСК – ацетилсалициловая кислота; $n=7$ (количество тестируемых животных в каждой группе).

Примечание: *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – изменения статистически значимы по отношению к контролю.

Соединение Sbt-828 в дозе 21,7 мг/кг достоверно пролонгировало время кровотечения на 36% по сравнению со значениями, полученными в контрольной группе. Время кровотечения из хвостовой вены под влиянием этого вещества составило $252,4 \pm 7,9$ секунд.

Ацетилсалициловая кислота достоверно пролонгировала время кровотечения на 94,8 %, которое составило $361,8 \pm 13,2$ секунд, что почти в два раза превосходило данный показатель группы контрольных животных. Таким образом, соединение Sbt-828 в сравнении с ацетилсалициловой кислотой оказало менее выраженное пролонгирование времени кровотечения из хвостовой вены мыши.

4.5. Заключение

В результате изучения влияния нового производного индола на процессы экспериментального тромбообразования, вызванные тромботическими агентами (генерализованный адреналин-коллагеновый тромбоз), а также повреждением стенки артерий факторами различного генеза (поверхностная аппликация раствора хлорида железа (III) и электрического тока на сонную артерию), установлена высокая антитромботическая активность соединения Sbt-828 при однократном введении внутрь интактным животным за 2 часа до моделирования тромбозов. Полученные результаты подтверждают, что в основе механизма антитромбогенного действия изученного вещества лежит ингибирующее воздействие на процессы агрегации тромбоцитов. В пользу этого также свидетельствует тот факт, что воспроизведенные экспериментальные модели артериальных тромбозов являются тромбоцит-зависимыми, так как в их возникновении основную роль играют тромбоциты.

При изучении влияния соединения Sbt-828 на время кровотечения из хвостовой вены мышей, наблюдалось удлинение данного показателя. Однако данное вещество в меньшей степени пролонгировало время кровотечения, чем препарат сравнения. В связи с этим можно предположить, что у вещества Sbt-828 не будет сильно выражен побочный эффект в виде кровотечений.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ Sbt-828 НА ТРОМБОЦИТАРНО-СОСУДИСТЫЙ ГЕМОСТАЗ И РЕОЛОГИЮ КРОВИ НА МОДЕЛИ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА У КРЫС.

Сахарный диабет (СД) является распространенным эндокринным заболеванием. Нормализация уровня глюкозы в крови является важным, но не единственным направлением в лечении сахарного диабета. Медицинское и социальное значение СД возрастает в связи с угрожающим увеличением частоты и тяжестью сердечно-сосудистых осложнений, возникающих при данной патологии [Resl M., 2010; Lopes R., 2011]. Схемы назначения лекарственных средств, согласно клиническим рекомендациям зарубежных и российских стандартов лечения СД помимо препаратов, нормализующих уровень глюкозы в крови, включают также использование для профилактики диабетических ангиопатий средства, оказывающие влияние на систему гемостаза. Состояние данной системы неразрывно связано с проблемой артериальных тромбозов, определяющих исход сосудистых осложнений сахарного диабета [Natarajan A., 2008; Morel O., 2010]. Одним из наиболее значимых показателей системы гемостаза является функциональная активность тромбоцитов [Дедов И.И., 2009]. Предполагается, что одним из факторов развития микро- и макроангиопатий является гиперреактивность этих форменных элементов крови.

Кроме того, существует большое количество данных, подтверждающих прямое и косвенное участие гемореологических факторов в развитии микрососудистых и атеросклеротических осложнений при СД [Singh M., 2009]. Так, при данной патологии повышается агрегация эритроцитов и вязкость крови, снижается способность мембраны к деформации, увеличивается адгезия эритроцитов к эндотелиальным клеткам. В основе этих гемореологических нарушений лежит изменение структурно-функциональных свойств клеточной мембраны, а именно, дестабилизация липидного бислоя последней [Муравьев А.В., 2009].

[Введите текст]

Все вышеперечисленные нарушения гемостаза обуславливают ускоренное прогрессирование атеросклероза, который сопровождается риском возникновения тромбозов и микроциркуляторных нарушений [Hagedorn I., 2010]. Поэтому, антитромбоцитарная защита, помимо самостоятельного положительного эффекта коррекции гликемии, должна приниматься во внимание при лечении данной патологии [Natarajan A., 2008]. В связи с этим была проведена комплексная оценка воздействия соединения Sbt-828 на показатели агрегации тромбоцитов, вязкости крови и способность предотвращать артериальный тромбоз, вызванный электрическим током в условиях экспериментальной модели аллоксанового диабета.

5.1. Влияния соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов крыс *ex vivo*.

При формировании тяжелой формы аллоксанового диабета наблюдалось изменение состояния крыс. У животных отмечалась потеря массы тела, развитие полиурии, полидипсии, полифагии – клинические признаки, характерные для тяжелой формы диабета.

Во всех группах животных непосредственно перед забором крови для исследования различных параметров определяли уровень глюкозы. У крыс после формирования тяжелой формы экспериментального диабета уровень глюкозы увеличивался в 3,7 раза по сравнению с интактными животными (табл. 5.1.). Соединение Sbt-828 после ежедневного семидневного введения не оказывало влияния на уровень глюкозы в крови.

В образцах крови крыс с экспериментальным диабетом наблюдалось повышение амплитуды АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в 2 раза по сравнению с интактными животными (рис. 5.1.). При этом соединение Sbt-828 блокировало процессы агрегации у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом. Наблюдалось достоверное уменьшение амплитуды агрегации тромбоцитов на 41,2% ($p \leq 0,05$) (рис. 5.1.). Препарат сравнения - гипогликемическое средство гликлазид - ингибировал процессы агрегации тромбоцитов на 23,1 % ($p \leq 0,05$).

Таблица 5.1.

Влияние соединения Sbt-828 при курсовом (1 неделя) пероральном введении на концентрацию глюкозы в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом ($M \pm m$, $n=7$).

N п/п	Группы животных	Исходная концентрация глюкозы (моль/л)	Концентрация глюкозы через 2 месяца после моделирования аллоксанового диабета (моль/л) и семидневного введения соединений
1.	Контроль (интактные животные)	$4,86 \pm 0,13$	$4,74 \pm 0,08$
2.	Аллоксановый диабет	$18,23 \pm 0,48$	$17,6 \pm 0,54$
3.	Аллоксановый диабет + Sbt-828	$17,94 \pm 0,35$	$17,28 \pm 0,34$

Примечание: * - $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно исходных концентраций глюкозы, критерий Манна-Уитни.
n-число тестируемых животных.

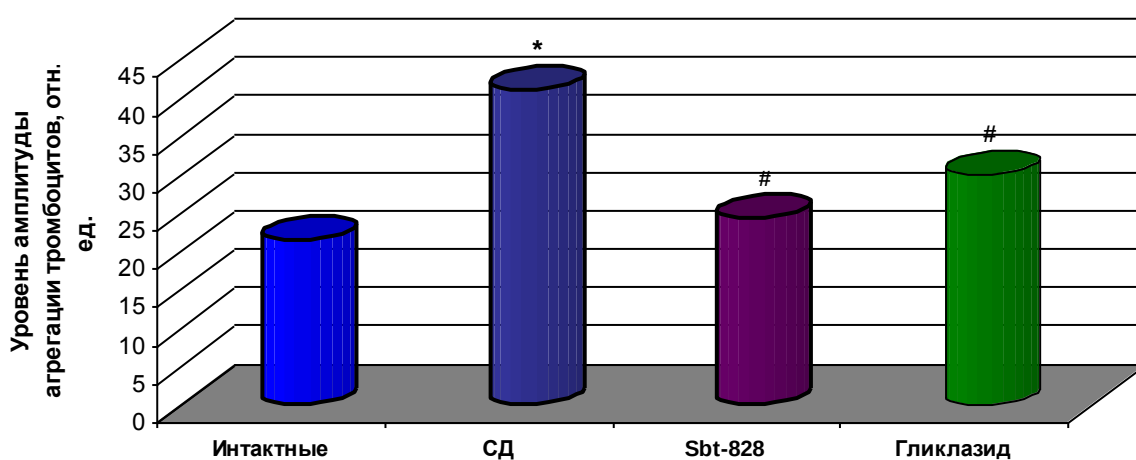


Рис. 5.1. Влияние соединения Sbt-828 и гликлазида при курсовом введении на агрегацию тромбоцитов крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом *ex vivo* в дозах равных ED_{50} , полученных на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

Примечание: # - $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно агрегации крыс с экспериментальным диабетом, * - $p < 0,05$ - изменения статистически значимы относительно интактных животных.

5.2. Действие соединения Sbt-828 на реологические свойства крови крыс.

У животных со стойкой гипергликемией в образцах проб крови было выявлено повышение вязкости крови при различных скоростях сдвига. Из литературных данных известно, что изменение реологических свойств крови вызывает формирование синдрома повышенной вязкости у больных сахарным диабетом [Singh M., 2009; Кудряшова М.В., 2010].

Выраженное повышение показателей вязкости крови наблюдалось при низких скоростях сдвига, что свидетельствует об активации процессов агрегатообразования в веноулярных отделах микроциркуляторного русла. Напротив, повышение данного реологического параметра при максимальной скорости сдвига характеризует, прежде всего, выраженные нарушения структуры и функции эритроцитарных мембран.

Нарушения вязкостных характеристик крови больных животных представлены на рисунке 5.2. Соединение Sbt-828 снижало вязкость крови крыс с экспериментальным диабетом. При этом наиболее выраженное достоверное действие, исследуемое вещество оказывало при низкосдвиговых скоростях.

Так, при скорости сдвига 10с^{-1} и 20с^{-1} данное вещество уменьшало вязкость на 28,9 и 22,1 % соответственно. В сравнении с изученным соединением, пентоксифиллин оказывал менее выраженное воздействие на показатели вязкости крови при низкосдвиговых скоростях. Так, при скорости сдвига 10с^{-1} и 20с^{-1} препарат сравнения снижал вязкость крови крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом на 16 и 9,2% соответственно (рис. 5.2). При увеличении скоростей сдвига корректирующее воздействие исследуемого вещества на данный реологический показатель сохранялось, что свидетельствует о его способности оказывать влияние на агрегационный и деформационный компонент показателя. Индекс агрегации эритроцитов больных животных составил 2,31 (рис. 5.3.), что на 33% больше данного показателя у интактных животных. Соединение Sbt-828 уменьшало значение

индекса агрегации эритроцитов, снижая его на 25,5%. При этом препарат сравнения пентоксифиллин снижал индекс агрегации эритроцитов животных с экспериментальной аллоксановой интоксикацией на 10,4%.

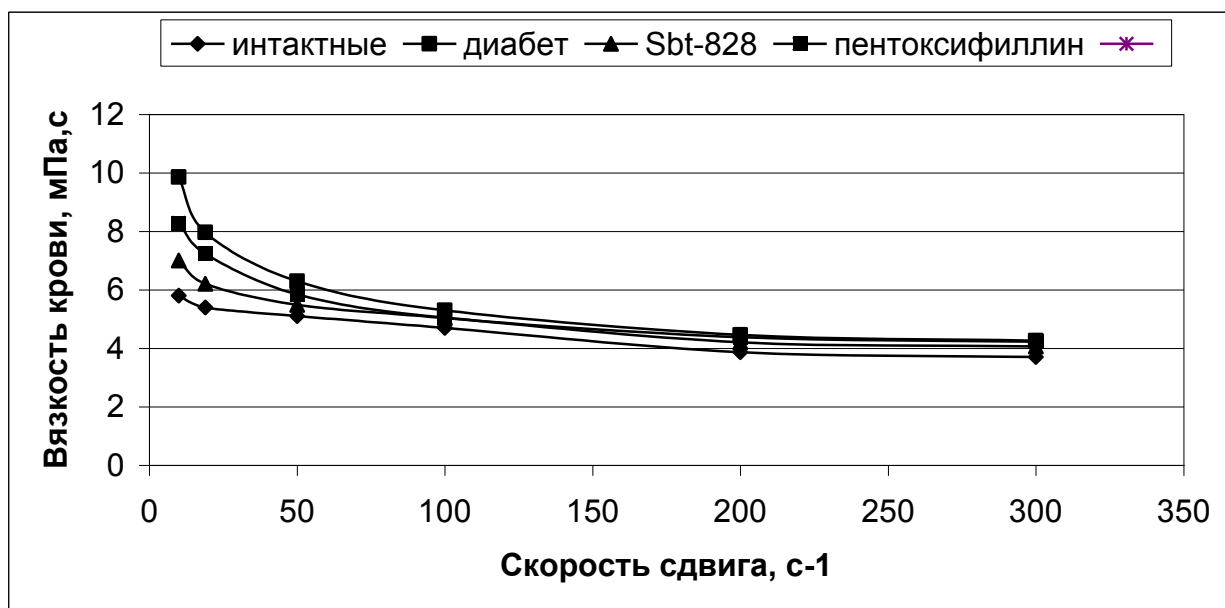


Рис. 5.2. Влияние соединения Sbt-828 и пентоксифиллина на вязкость крови крыс с аллоксановым диабетом в диапазоне 10с^{-1} - 300с^{-1}

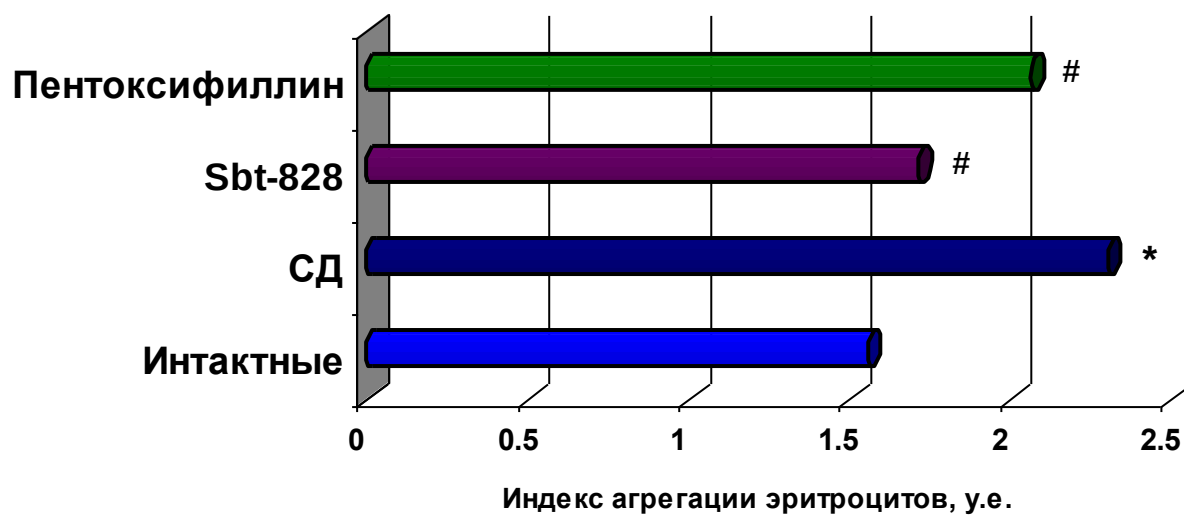


Рис. 5.3. Влияние соединения Sbt-828 в дозе, равной ED_{50} , полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов и пентоксифиллина в дозе 4 мг/кг при курсовом введении (гл.3), на индекс агрегации эритроцитов крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом.

Примечание: # - $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно индекса агрегации эритроцитов крыс с экспериментальным диабетом; * - $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно группы интактных животных.

5.3. Исследование антитромботической активности вещества Sbt-828 на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током

На экспериментальной модели артериального тромбоза крыс среднее время наступления полной окклюзии сонной артерии intactных животных составило 15,1 мин. У животных с аллоксановой интоксикацией данный показатель был меньше и равнялся 11,5 мин (рис. 5.4.). Введение животным соединения Sbt-828 и препарата сравнения гликлазида в течение 7 дней в разной степени увеличивало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс, вызванной воздействием анодного тока. Так полная окклюзия сонной артерии при введении вещества Sbt-828 наблюдалась на 22 мин, что составило увеличение времени образования тромба на 91,3% ($p < 0,001$) по отношению к контролю (табл. 5.2.).

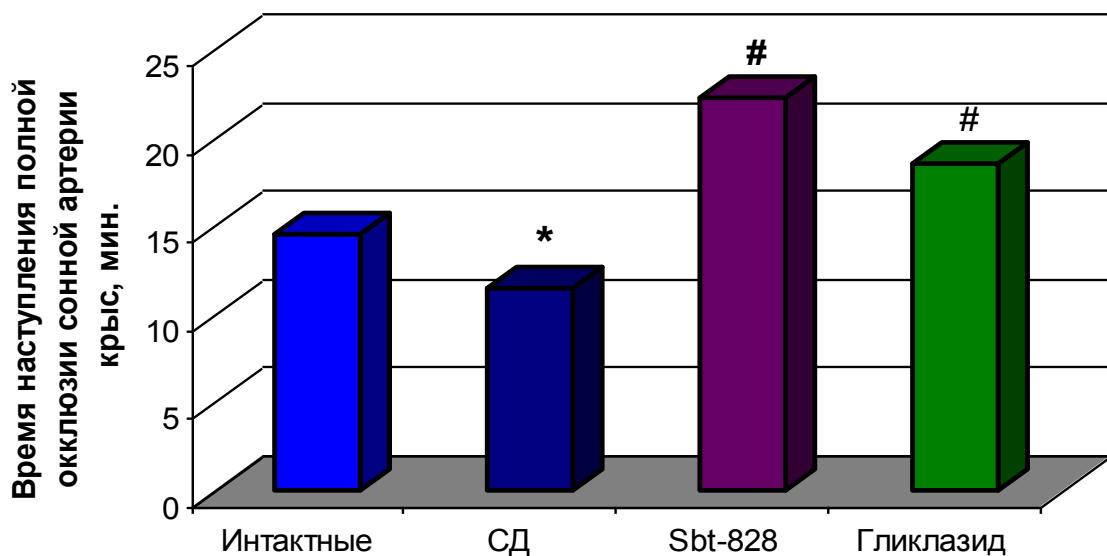


Рис. 5.4. Влияние соединения Sbt-828 и гликлазида при курсовом введении на время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс с аллоксановой интоксикацией на модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током.

Примечание: *- $p < 0,05$ - достоверность относительно времени наступления окклюзии сонной артерии у контрольной группы крыс с экспериментальным диабетом.

Препарат сравнения гликлазид в изученной дозе достоверно увеличивал время наступления полной окклюзии сосуда на 61,2% ($p < 0,001$) по отношению к контролю.

Таблица 5.2.

Антитромботическая активность соединения Sbt-828 и гликлазида при 7-дневном введении на модели индуцированного электрическим током тромбоза сонной артерии крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом ($M \pm m$, $n=7$).

N п/п	Название Вещества	Доза мг/кг	% увеличения времени окклюзии по отношению к контролю
1.	Sbt-828	21,7	91,3 $\pm$ 7,12**
2.	Гликлазид	20	61,2 $\pm$ 3,9*

Примечание: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ – изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.
n-число тестируемых животных.

5.4. Заключение

В результате исследований, выполненных на животных с экспериментальным аллоксановым диабетом, было показано, что соединение Sbt-828 достоверно угнетает агрегацию тромбоцитов, превосходя по активности препарат сравнения гликлазид. Также вещество в условиях синдрома гипервязкости, который наблюдается при сахарном диабете, оказало нормализующее действие на параметры вязкости крови. При этом препарат сравнения пентоксифиллин уступал по действию соединению Sbt-828. Следовательно, можно предположить, что в основе гемореологической активности данного вещества, вероятно, лежит способность ингибировать процессы агрегации эритроцитов.

В результате изучения влияния вещества Sbt-828 на процессы тромбообразования у животных с экспериментальным диабетом, вызванные повреждением стенки артерий электрическим током, установлена высокая

антитромботическая активность данного соединения при 7-дневном пероральном введении.

Таким образом, в результате проведенных исследований была выявлена способность производного индола, улучшать состояние тромбогенного потенциала крови при СД.

ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА Sbt-828

Ключевая роль тромбоцитов в тромбообразовании и, как следствие, в развитии и прогрессировании многих сердечно-сосудистых заболеваний требует тщательного изучения механизмов действия этого процесса. Основные пути экспериментального изучения соединений с данным видом активности включают воздействие на индукторы агрегации тромбоцитов и их рецепторы, влияние на баланс TXA_2 и простагличина в организме, воздействие на трансмембранный транспорт кальция и перераспределение данных ионов внутри клетки.

Агрегацию тромбоцитов могут вызывать различные физиологические, механические и химические стимулы. Основными физиологическими активаторами являются коллаген, тромбин, АДФ и TXA_2 [Воронина Е.Н., 2006]. Взаимодействуя с соответствующими мембранными рецепторами тромбоцита, агонисты способствуют его переходу в активированное состояние, которое характеризуется изменением формы, адгезией, агрегацией и секрецией содержимого гранул [Jennings L.K., 2009]. Поэтому нам представилось интересным выяснить, не оказывает ли соединение Sbt-828 антагонистическое действие в отношении различных индукторов агрегации тромбоцитов.

В результате действия все агонисты агрегации тромбоцитов приводят к повышению уровня кальция в тромбоцитах [Colomer J., 2010]. Из этого можно заключить, что они играют ключевую роль в регуляции функциональной активности тромбоцитов [Harper A.G., 2009]. Изменение концентрации внутриклеточного кальция тромбоцитов является сигналом для активации или ингибирования ферментов, которые в свою очередь регулируют метаболизм, сократительную и секреторную активность, адгезию и клеточный рост [Bergmeier W., 2009]. В связи с этим представилось необходимым выяснить не влияет ли соединение Sbt-828 на уровень внутриклеточного и мембраносвязанного Ca^{2+} .

[Введите текст]

Важным направлением в изучении механизма действия соединений с антиагрегантной активностью является влияние на баланс простациклин-тромбоксановой системы. При повышении тромбогенного потенциала крови увеличивается количество TXA_2 , что приводит к повышению агрегации тромбоцитов и вазоконстрикции. Косвенным доказательством повышения синтеза TXA_2 является обнаружение значительного количества МДА (малоновый диальдегид) в тромбоцитах [Никонов В.В., 2008]. Кроме того, для многих заболеваний, сопровождающихся повышением тромбогенного потенциала крови характерно снижение противотромботического потенциала сосудистой стенки. Поэтому было изучено влияние соединений на простациклин-генерирующую активность стенки аорты и уровень МДА в тромбоцитах животных при индукции тромбином.

6.1. Влияние соединения Sbt-828 на рецепторные механизмы активации тромбоцитов.

6.1.1. Действие вещества Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ.

В результате проведенных исследований было установлено, что соединение Sbt-828 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота при использовании в качестве индуктора агрегации АДФ в концентрации 5 мкМ снижают функциональную активность тромбоцитов крови кроликов *in vitro*.

В контрольных образцах плазмы крови степень агрегации тромбоцитов составила 26,7 отн.ед. Соединение Sbt-828 в концентрации $1 \times 10^{-4}\text{M}$ снижало степень агрегации тромбоцитов до 5,3 отн.ед., что соответствовало ингибированию агрегации тромбоцитов относительно контроля на 80,2% ($p \leq 0,001$). При уменьшении концентрации вещества до $1 \times 10^{-5}\text{M}$ и $1 \times 10^{-6}\text{M}$ дозозависимо снижалась его способность к блокированию агрегации тромбоцитов до 39,4 ($p \leq 0,05$) и 11,6% ($p > 0,05$) соответственно (табл. 6.1.). При этом EC_{50} соединения Sbt-828 составила $4,45 \times 10^{-5}\text{M}$.

Ацетилсалициловая кислота уменьшала степень агрегации тромбоцитов в концентрации $1 \times 10^{-3}\text{M}$ до 16,3 отн. ед. ($p \leq 0,05$), что соответствовало 51,3% ингибирования функциональной активности тромбоцитов относительно контроля. При снижении концентрации ацетилсалициловой кислоты уменьшалась способность препарата угнетать агрегацию тромбоцитов. В концентрациях $1 \times 10^{-4}\text{M}$ и $1 \times 10^{-5}\text{M}$ она снижалась до 29,3% ($p \leq 0,05$) и 3,1% ($p > 0,05$) соответственно. EC_{50} ацетилсалициловой кислоты составила $7,1 \times 10^{-4}\text{M}$ (табл. 6.1.).

Таблица 6.1.

Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на АДФ (5 мкМ) индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика, (опыты *in vitro*) ($\text{M} \pm \text{m}$).

Название соединений	Агрегация тромбоцитов ($\Delta\%$ по отношению к контролю)				EC_{50}, M
	$1 \times 10^{-3}\text{M}$	$1 \times 10^{-4}\text{M}$	$1 \times 10^{-5}\text{M}$	$1 \times 10^{-6}\text{M}$	
Sbt-828		$80,24 \pm 7,16^*$	$33,2 \pm 4,36^*$	$23,69 \pm 7,18^*$	$4,45 \times 10^{-5}$
Ацетил-салициловая кислота	$53,4 \pm 4,13^*$	$29,3 \pm 3,6^*$	$3,1 \pm 1,7$		$7,1 \times 10^{-4}$

Примечания: $^*-(p \leq 0,05)$ - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

6.1.2. Влияние соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную адреналином.

Соединение Sbt-828 дозозависимо ингибировало агрегацию тромбоцитов, вызванную адреналином. Относительное значение амплитуды агрегации тромбоцитов под действием индуктора адреналина в концентрации 5 мкМ составило 40,7 отн. ед. (табл. 6.2.). В концентрации $1 \times 10^{-4}\text{M}$ вещество Sbt-

828 уменьшало агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором на 98,2% ($p \leq 0,001$) относительно контрольных значений. При уменьшении концентраций до $2,5 \times 10^{-5} \text{ М}$ и $1 \times 10^{-5} \text{ М}$ данное вещество ингибировало функциональную активность тромбоцитов на 25,9 ($p \leq 0,05$) и 1,6% соответственно. EC_{50} соединения Sbt-828 при этом составила $7,1 \times 10^{-5} \text{ М}$ (табл. 6.2.).

Таблица 6.2.

Влияние соединения Sbt-828 на адреналин- индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика (опыты in vitro) ($\text{M} \pm \text{m}$).

Название соединения	Контроль	Амплитуда агрегации тромбоцитов (отн.ед.)			$\text{EC}_{50}, \text{М}$
		$1 \times 10^{-4} \text{ М}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5} \text{ М}$	
Sbt-828	$40,7 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,4^*$	$30,2 \pm 0,8^*$	$40,1 \pm 1,3$	$7,1 \times 10^{-5}$

Примечание: $^*(p \leq 0,05)$ - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

6.1.3. Оценка эффективности влияния вещества Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой.

При изучении влияния соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой в концентрации 50 мкМ, была установлена его высокая ингибирующая активность в отношении данного физиологического агониста (табл. 6.3.).

В контрольных образцах плазмы крови амплитуда агрегации тромбоцитов составила 26,5 отн.ед. Соединение Sbt-828 в концентрации $1 \times 10^{-5} \text{ М}$ достоверно снижало амплитуду агрегации тромбоцитов до значения 0,42 отн.ед. ($p \leq 0,001$), что соответствовало 98,4% ингибирования данного процесса. В концентрации $1 \times 10^{-6} \text{ М}$ и $1 \times 10^{-7} \text{ М}$ вещество дозозависимо уменьшало амплитуду агрегатограммы до 16,4 ($p \leq 0,05$) и 24,06 отн. ед., что

[Введите текст]

соответствовало 38,1 и 9.18% ингибирования агрегации тромбоцитов соответственно. EC_{50} соединения Sbt-828 при этом составила 1,1 мкМ.

Таблица 6.3.

Влияние соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную арахидоновой кислотой (опыты in vitro) ($M \pm m$).

Название соединения	Контроль	Амплитуда агрегации тромбоцитов (отн.ед.)			EC_{50}, M
		$1 \times 10^{-5} M$	1×10^{-6}	$1 \times 10^{-7} M$	
Sbt-828	$26,5 \pm 0,17$	$0,42 \pm 0,26^{**}$	$16,4 \pm 2,55^*$	$24,06 \pm 0,98$	$1,1 \times 10^{-6}$

Примечание: $^{*-(p \leq 0,001)}$ $^{*-(p \leq 0,05)}$ - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

6.1.4. Действие соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином.

При изучении влияния вещества Sbt-828 на агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцированную тромбином в концентрации 0,5 ед. NIH/мл, были получены следующие данные, которые представлены в таблице 6.4. Контрольное значение амплитуды агрегации тромбоцитов в образцах плазмы крови, вызванной тромбином, составило 50,1 отн.ед.

Соединение Sbt-828 в дозе $1 \times 10^{-4} M$ достоверно снижало амплитуду агрегации тромбоцитов и ингибировало этот процесс относительно контроля на 65,7 % ($p \leq 0,01$). При уменьшении дозы соединения до $5 \times 10^{-5} M$ и $1 \times 10^{-6} M$ его способность к ингибированию агрегации тромбоцитов снижалась до 27,1 ($p \leq 0,05$) и 2,2 % соответственно. EC_{50} соединения Sbt-828 при этом составила $3,7 \times 10^{-5} M$ (табл.6.4.).

Таблица 6.4.

Влияние соединения Sbt-828 на тромбин (0,5 ед. NIH/мл)- индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика (опыты in vitro) ($M \pm m$).

Название соединения	Агрегация тромбоцитов ($\Delta\%$ по отношению к контролю)			EC_{50}, M
	$1 \times 10^{-4} M$	1×10^{-5}	$1 \times 10^{-6} M$	
Sbt-828	$65,7 \pm 4,25^{**}$	$27,1 \pm 3,2^*$	$2,2 \pm 1,07$	$3,7 \times 10^{-5}$

Примечание: ** -($p \leq 0,01$) * -($p \leq 0,05$) - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

6.1.5. Влияние соединения Sbt-828 на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Выполненные исследования позволили выявить антиагрегантную активность соединения Sbt-828 в отношении агрегации тромбоцитов, вызванной индуктором коллагеном. Под действием данного агониста в концентрации 20 мкг/мл относительное значение амплитуды агрегации тромбоцитов составило 23,0 отн. ед.

Соединение Sbt-828 в концентрации $1 \times 10^{-4} M$ полностью блокировало агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором, при этом амплитуда агрегации тромбоцитов снижалась до 0,37 отн.ед., что составило 98,4% ($p \leq 0,001$) ингибирования. В дозе $5 \times 10^{-5} M$ вещество ингибировало функциональную активность тромбоцитов на 50,4 % ($p \leq 0,001$), при этом амплитуда агрегации тромбоцитов соответствовала 11,42 отн.ед. ($p \leq 0,001$). При уменьшении концентрации вещества до $1 \times 10^{-5} M$ амплитуда агрегации составила 20,63 отн. ед., что соответствовало 10,3% ингибирования. EC_{50} соединения Sbt-828 при этом равнялась $3,4 \times 10^{-5} M$ (табл. 6.5.).

Таблица 6.5.

Влияние соединения Sbt-828 на коллаген - индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика (опыты *in vitro*) ($M \pm m$).

Название соединения	Агрегация тромбоцитов ($\Delta\%$ по отношению к контролю)			EC ₅₀ ,M
	1x10 ⁻⁴ M	5x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵ M	
Sbt-828	98,4 ± 6,5**	50,35 ± 4,6*	10,31 ± 2,1	3,4 x 10 ⁻⁵

Примечание: **-($p \leq 0,01$) *-($p \leq 0,05$) - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

6.1.6. Действие вещества Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, вызванное агонистом тромбоксановых рецепторов U 46619.

При изучении влияния соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистом тромбоксановых рецепторов U 46619 в концентрации 3 мкМ, было установлено, что вещество проявило дозозависимое антиагрегантное действие в отношении данного индуктора (табл. 6.6).

Соединение Sbt-828 в дозе 1 x 10⁻⁴ М достоверно блокировало агрегацию тромбоцитов, вызванную веществом U 46619. Величина ингибирования при этом составила 96,22 %. Изучение соединения Sbt-828 в дозах 5 x 10⁻⁵ М и 1 x 10⁻⁵ М привело к дальнейшему снижению активности. В данных концентрациях вещество ингибировало агрегацию тромбоцитов на 68,7% и 41,8% соответственно. EC₅₀ при этом составила 2,2 x 10⁻⁵ М.

Таблица 6.6.

Влияние соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов кролика, вызванную агонистом тромбоксановых рецепторов (3 мкМ))- (опыты in vitro) ($M \pm m$).

Название соединения	Агрегация тромбоцитов ($\Delta\%$ по отношению к контролю)			EC_{50}, M
	$1 \times 10^{-4} M$	5×10^{-5}	$1 \times 10^{-5} M$	
Sbt-828	$96,22 \pm 7,3^{**}$	$68,7 \pm 6,4^{**}$	$41,8 \pm 3,1^*$	$2,2 \times 10^{-5}$

Примечание: ** -($p \leq 0,001$) * -($p \leq 0,15$) - изменения статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

6.1.7. Влияние соединения Sbt-828 на пуриновые $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ -рецепторы тромбоцитов.

В результате выполненных исследований было выявлено, что вещество Sbt-828 в концентрации $10^{-6} M$ ингибирует активацию тромбоцитов, вызванную активацией $P2Y_1$ рецепторами в безкальциевой среде, на 13,73% (табл. 6.7.).

Вещество сравнения - реактив Basilen blue, обладающий неселективным антагонизмом по отношению к $P2Y$ -рецепторам в концентрации $10^{-6} M$ продемонстрировал эффект, равный 21,5%. Таким образом, изученное соединение проявило маловыраженную $P2Y_1$ -антагонистическую активность, уступая веществу сравнения.

Таблица 6.7.

Влияние соединения SBT-828 и Basilen blue на степень активации тромбоцитов кролика в безкальциевой среде, индуцированной 70 нМ АДФ ($M \pm m$).

Вид активности	Шифр соединения	
	SBT-828	Basilen blue
Подавление активации тромбоцитов, $\Delta\%$	$13,73 \pm 1,89$	$21,5 \pm 2,08$

Далее было изучено влияние соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов кролика, вызванную активацией $P2Y_{12}$ рецепторами, индуцированную 200 нМ АДФ (рис. 6.1.). При этом вещество Sbt-828 ингибировало агрегацию тромбоцитов, вызванную активацией $P2Y_{12}$ рецепторов на 91,15 % , тогда как вещество сравнения PPADS - на 21,1%. Данная активность соединения Sbt – 828 дает возможность предположить о его действии на активацию аденилатциклазного пути.

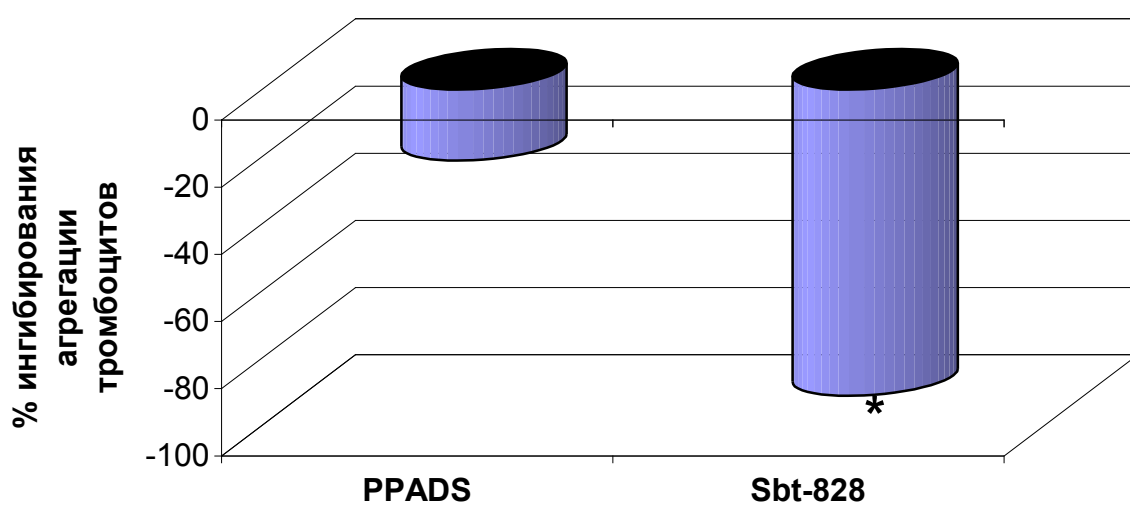


Рис. 6.1. Влияние соединения Sbt-828 в концентрации 1 мкМ на степень агрегации тромбоцитов кролика, индуцированной 200 нМ АДФ в кальцовой среде.

Примечание: * - $p \leq 0,001$ -данные статистически значимы по отношению к веществу сравнения, критерий Манна-Уитни

6.2. Действие производного индола Sbt-828 на баланс простаглицлина и тромбосана в организме крыс

6.2.1. Влияние вещества Sbt-828 на продукцию тромбосана A_2 в тромбоцитах интактных крыс

В результате проведенных исследований был определен исходный уровень малонового диальдегида в интактных тромбоцитах крыс, который составил 1,68 отн. ед. После индуцирования тромбоцитов тромбином концентрация малонового диальдегида (МДА) через три минуты после внесения индуктора возросла в 3,9 раза по сравнению с исходным уровнем. Суспензия тромбоцитов интактных крыс, которым предварительно вводилось соединение Sbt-828 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота, по-разному реагировали на изменение уровня МДА (рис.6.2.). В суспензии тромбоцитов интактных животных, которые получали вещество Sbt-828, не наблюдалось уменьшения исходного уровня МДА. Однако после индукции агрегации тромбоцитов тромбином вещество Sbt-828 статистически значимо снижало его концентрацию на 71% (рис. 6.2.).

Ацетилсалициловая кислота недостоверно уменьшала исходный уровень МДА в интактных тромбоцитах крыс. После индукции тромбином препарат сравнения снижал концентрацию последнего в кровяных пластинках на 54,3%.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что соединение Sbt-828 достоверно снижает уровень TXA_2 , о чем свидетельствует уменьшение содержания МДА в тромбоцитах крыс, индуцированных тромбином.

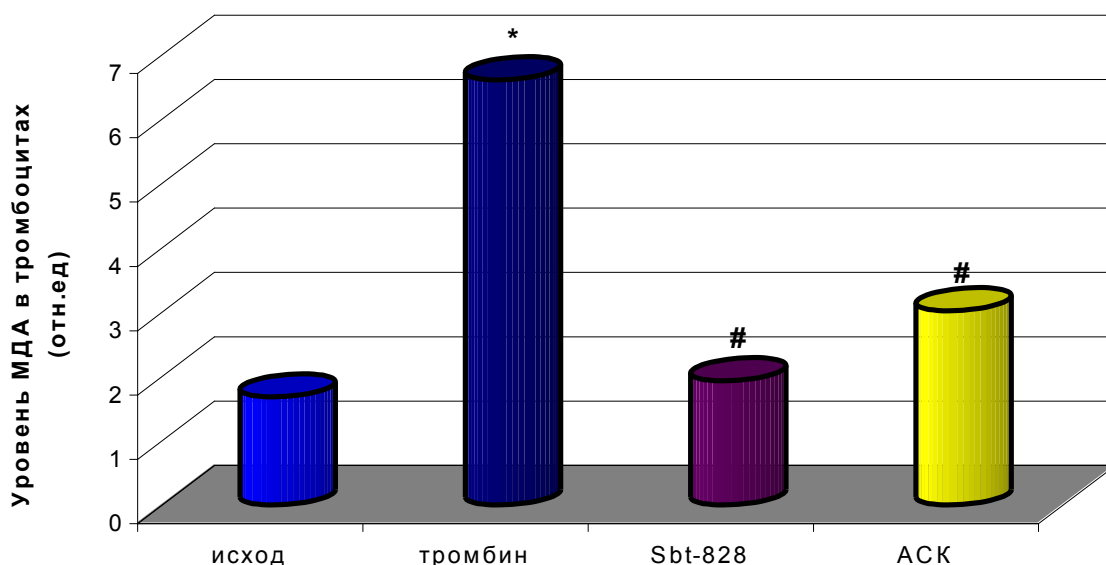


Рис. 6.2. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на изменение уровня МДА в тромбоцитах крыс в процессе агрегации, индуцированной тромбином (25 ед/мл)

Примечание: исход – содержание МДА в интактных тромбоцитах; тромбин - уровень МДА после стимуляции тромбоцитов тромбином

* - $p < 0,01$ изменения статистически значимы по отношению к показателям интактных тромбоцитов (исхода), U-критерий

- $p < 0,01$ изменения статистически значимы по отношению к показателям тромбоцитов, индуцированных тромбином, U-критерий

6.2.2. Изучение влияния соединения на простагландин-генерирующую активность сосудистой стенки интактных животных

Из результатов проведенных исследований, представленных в таблице, видно, что при инкубации стенки аорты интактных крыс с богатой тромбоцитами плазмой, в 2 раза происходило снижение их агрегации, относительно контрольных значений.

Соединение Sbt-828 не вызывало достоверных изменений активности аорты в отношении снижения агрегации тромбоцитов. В контрольных значениях (сосудистая стенка) и в опыте (сосудистая стенка + вещество) антиагрегантная активность стенки аорты колебалась в пределах от 49% до 55% (табл.6.8.).

Таблица 6.8.

Влияние соединения Sbt-828 на антиагрегационную активность сосудистой стенки ($M \pm m$).

№ п.п	Исследуемое соединение	Доза мг/кг	Ингибирование агрегации тромбоцитов отн. ед.		
			Контроль БТП	БТП + сосудистая стенка	
				В исходном состоянии	Через 30 мин после в/в введения вещества
1.	Sbt-828	26	$29,35 \pm 2,16$	$15,1 \pm 0,98^*$	$16,23 \pm 0,77^*$

Примечание: *- $p < 0,05$ -изменения статистически значимы по отношению к контролю.

Примечание: БТП - богатая тромбоцитами плазма

Затем через 30 минут после внутривенного введения адреналина антиагрегационная активность стенки аорты снижалась и в среднем составляла 28% , что было в 2 раза ниже результатов, полученных до введения тромботического агента (рис. 6.3).

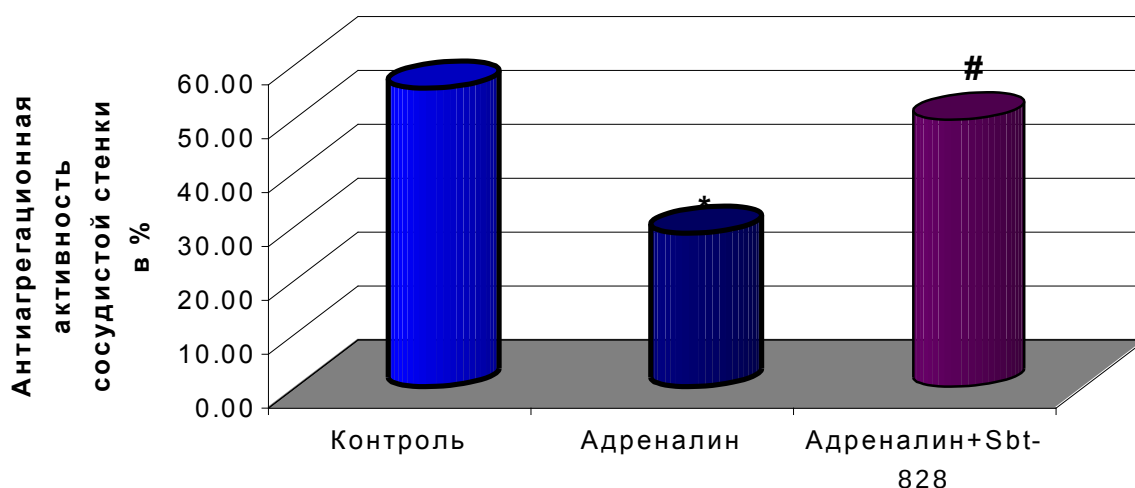


Рис. 6.3. Влияние соединения Sbt-828 на антиагрегационную активность сосудистой стенки, сниженную адреналином ($M \pm m$)

Примечание: *- изменения статистически значимы по отношению к контролю.

- изменения статистически значимы по отношению к показателю агрегации тромбоцитов, индуцированных адреналином.

На фоне предварительного введения адреналина изученное вещество восстанавливало сниженную антиагрегантную активность стенки брюшной аорты крыс. Так, после введения соединения Sbt-828 антиагрегационная активность сосудистой стенки составила 48,1%. Таким образом, изученное вещество достоверно восстанавливало способность стенки аорты угнетать процессы агрегации тромбоцитов относительно результатов, полученных после введения адреналина (рис. 6.3).

6.3. Влияние нового производного индола на уровень кальция в тромбоцитах животных

6.3.1. Действие соединения Sbt-828 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах

Проведенные эксперименты были выполнены в два этапа. На первом этапе изучения влияния вещества Sbt-828 на уровень внутриклеточного кальция эксперименты были выполнены в присутствии физиологических концентраций Ca^{2+} . Прирост флуоресценции Fura-2/AM, активированной тромбином, в присутствии концентраций внеклеточного Ca^{2+} отражает общий прирост внутриклеточного Ca^{2+} за счет его входа в клетку, а также мобилизации из внутренних источников. Однако перед проведением исследований были изучены хелатирующие свойства соединения Sbt-828 по отношению к ионам кальция. Было выяснено, что данное вещество в отличие от ЭГТА не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах (рис. 6.4.), что свидетельствует в пользу того, что оно не является хелатором ионов кальция.

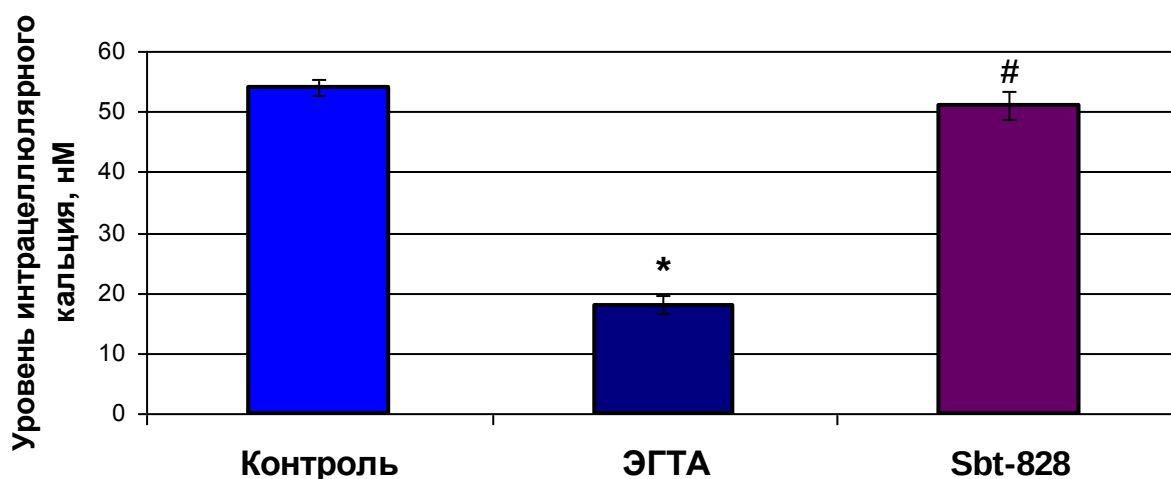


Рис. 6.4. Влияние соединения Sbt-828 и ЭГТА на связывание ионов кальция в интактных тромбоцитах.

Примечание: * - $p < 0,05$ - изменения статистически значимы относительно контроля (тромбоциты); ** - $p < 0,05$ - изменения статистически значимы относительно ЭГТА, критерий Манна-Уитни.

При индукции тромбином выход Ca^{2+} из клеточных депо в присутствии физиологических концентраций, сопровождался повышением содержания внутриклеточного Ca^{2+} с базального уровня 50,6 нМ до 263,7 нМ (табл. 6.9). Полученный результат был принят за контроль. Соединение Sbt-828, добавленное за 2 минуты до стимуляции тромбином, дозозависимо ингибировало повышение содержания внутриклеточного кальция.

В концентрации 100 мкМ вещество блокировало выход внутриклеточного Ca^{2+} , при этом его количество в пробе составило 109,1 нМ, что соответствовало 58,6% ингибирования данного процесса (рис. 6.5). При снижении дозы до 10 и 1 мкМ соединение Sbt-828 ингибировало индуцированное тромбином увеличение содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах на 40,7 % и 18,5 % соответственно (табл. 6.9). EC_{50} для соединения Sbt-828 при этом составила 34 мкМ.

Ацетилсалициловая кислота в дозе 100 мкМ не проявила активности, так как уменьшала прирост внутриклеточного кальция на 1,7 % по сравнению с контрольными значениями. Верапамил, являющийся антагонистом ионов кальция, в концентрации 100 мкМ в меньшей степени, чем соединение Sbt-828, снижал уровень внутриклеточного кальция. Процент ингибирования при этом составил 33,3 % (табл. 6.9, рис. 6.5).

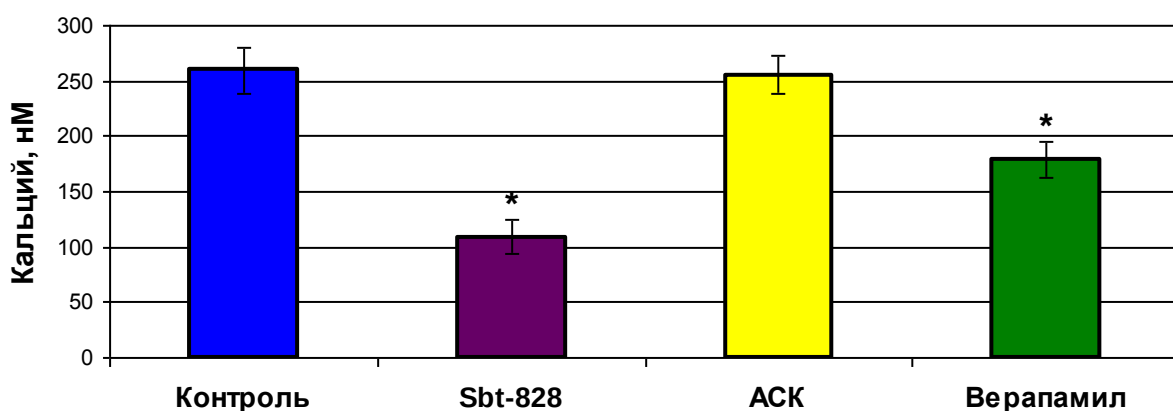


Рис. 6.5. Влияние соединения Sbt-828, ацетилсалициловой кислоты и верапамила в дозе 100 мкМ на прирост уровня внутриклеточного кальция индуцированный тромбином.

Примечание: * - $p < 0,05$ -достоверность относительно контроля, критерий Манна-Уитни

[Введите текст]

Таблица 6.9.

Влияние соединения Sbt-828 и препаратов сравнения на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином в концентрации 0,5 ед/мл в кальциевой среде (опыты in vitro) ($M \pm m$)

№ п/п	Названия веществ	Дозы соединений, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ
1.	Суспензия тромбоцитов		50,9±2,34
2.	Суспензия Тромбоцитов+тромбин	Контроль	263,7±3,96
3.	Суспензия Тромбоцитов+тромбин + Sbt-828	100	109,1±3,03**
		10	156,4±3,11**
		1	214,92±5,24
4.	Суспензия Тромбоцитов+тромбин + АСК	100	262,8±5,1
5.	Суспензия Тромбоцитов+тромбин + Верапамил	100	178,54±7,7*

Примечание: * - $p < 0,01$ * - $p < 0,001$ -изменения статистически значимы относительно значений, полученных в контроле (U-критерий)

На втором этапе исследования проводилось изучение влияние вещества Sbt-828 на уровень внутриклеточного кальция в отсутствии внешнего Ca^{2+} . Увеличение флуоресценции Fura-2/AM, вызванное тромбином в отсутствии внеклеточного Ca^{2+} , отражает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

При индукции тромбином выход Ca^{2+} из клеточных депо в безкальциевой среде сопровождался увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} с базального уровня 50,6 нМ до 211,3 нМ (табл. 6.10).

Изученное соединение в дозе 100 мкМ практически не оказало ингибирующего действия на уровень внутриклеточного Ca^{2+} , индуцированного тромбином. Процент блокирования составил всего 6,3 %.

Препарат сравнения верапамил не оказывал влияния на изучаемый показатель. Уровень внутриклеточного Ca^{2+} в пробе с данным веществом соответствовал значениям, полученным в контроле (табл. 6.10). Ацетилсалициловая кислота в опытах с безкальциевой средой не исследовалась, так как показала свою неэффективность в отношении снижения уровня внутриклеточного кальция в кальциевой среде.

Таблица 6.10.

Влияние соединения Sbt-828 и верапамила на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированный тромбином в безкальциевой среде (опыты *in vitro*) ($M \pm m$).

№ п/п	Название соединений	Доза, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ
1.	Суспензия тромбоцитов	-	50,39
2.	Суспензия тромбоцитов+тромбин (контроль)	-	$211,3 \pm 4,1$
3.	Sbt-828	100	$198 \pm 2,02$
4.	Верапамил	100	$209,7 \pm 3,6$

6.3.2. Влияние вещества Sbt-828 на концентрацию мембранносвязанного кальция в тромбоцитах.

На данном этапе эксперимента было выявлено снижение соединением Sbt-828 уровня мембранносвязанного кальция в тромбоцитах (табл. 6.11). Добавление изучаемого вещества в концентрации 100 мкМ к плазме, богатой тромбоцитами достоверно снижало флуоресценцию и составляло 39,6 %. При уменьшении дозы соединения Sbt-828 до 10 мкМ эффект ингибирования флуоресценции уменьшался и был равен 8,4% (табл. 6.11)

Таблица 6.11.
Влияние соединения Sbt-828 на уровень мембранносвязанного кальция в тромбоцитах (опыты in vitro) ($M \pm m$).

№ п/п	Название соединения	Доза, мкМ	$\Delta\%$ ингибирования уровня кальция
1.	Sbt-828	100	$39,6 \pm 3,7^*$
		10	$8,4 \pm 2,13$

* - $p < 0,05$ -изменения статистически значимы относительно значений, полученных в контроле (U-критерий)

6.4. Влияние соединения Sbt-828 на показатели коагулограммы плазмы интактных животных и фибринолитическую активность.

6.4.1. Действие вещества на показатели коагулограммы

Данные по изучению воздействия соединения Sbt-828 на коагуляционные характеристики крови интактных крыс представлены в таблице 6.12.

Соединение Sbt-828 достоверно изменяло длительность АПТВ по сравнению с контролем на 16,6% . Увеличение продолжительности АПТВ может свидетельствовать об уменьшении содержания или активности внутренних факторов свертывания (XII, ПК, ВМК, XI, IX, VIII) и факторов общего пути (X, V, II, I). Однако значения АПТВ, полученные при влиянии вещества Sbt-828, не превышают верхнюю границу нормы (продолжительность АПТВ в норме составляет 25-38 с).

Таблица 6.12.

Влияние соединения SBT-828 на показатели коагулограммы плазмы крови интактных крыс (опыты ex vivo) ($M \pm m$, n=6).

Название соединения	АПТВ, сек	ПВ, сек	ТВ, сек	Фибриноген, г/л
Контроль	$32,7 \pm 0,28$	$19,78 \pm 0,66$	$36,62 \pm 1,08$	$3,83 \pm 0,32$
SBT-828	$38,0 \pm 1,37^*$	$19,5 \pm 0,75$	$38,8 \pm 1,63$	$3,59 \pm 0,41$

Обозначения: АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время, ТВ – тромбиновое время.
n- число тестируемых животных

Достоверных изменений длительности протромбинового времени по сравнению с контролем для исследованного вещества зафиксировано не было.

Также можно считать незначимым недостоверное по отношению к контролю увеличение тромбинового времени в плазме крови крыс, получавших Sbt-828.

Содержание фибриногена, под действием данного вещества, статистически недостоверно уменьшалось по сравнению с контролем на 6,3%. Полученные данные свидетельствуют о незначительном сдвиге в системе агрегатного состояния крови в сторону гипокоагуляции, однако уровень этих изменений является недостоверным относительно контрольных значений показателей коагулограммы. Это позволяет сделать вывод об отсутствии прямого антикоагулянтного эффекта в исследуемой дозе у соединения Sbt-828.

6.4.2. Влияние соединения Sbt-828 на фибринолитическую активность плазмы крови крыс

Соединение Sbt-828 проявило выраженную фибринолитическую активность. В изученной дозе вещество достоверно снижало данный вид активности на 57,9%, по сравнению с исходными данными (рис. 6.6).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также проявила фибринолитические свойства, снижая время растворения сгустка на 18,2%.

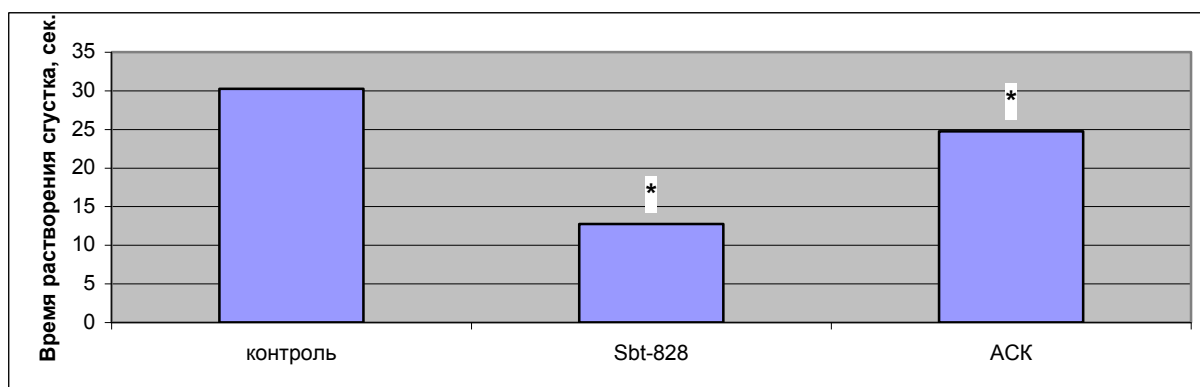


Рис. 6.6. Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на время растворения сгустка

Примечание: * - $p < 0,05$ -достоверность относительно контроля, критерий Манна-Уитни

6.5. Заключение

В результате экспериментального изучения механизма действия соединения Sbt-828 было установлено, что данное вещество дозозависимо блокирует агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами.

Наиболее выражено вещество Sbt-828 ингибировало процессы агрегации тромбоцитов, вызванные арахидоновой кислотой, что может указывать на возможный механизм действия, связанный с ингибированием фермента циклооксигеназы. Кроме того, активность вещества в отношении остальных агонистов агрегации тромбоцитов свидетельствует о неизбирательности его действия. Также необходимо отметить, что для подавления активации агонистами мембранных рецепторных систем характерны более низкие концентрации веществ, необходимые для проявления их рецепторного действия.

Вещество Sbt-828 не оказывает влияния на агрегацию тромбоцитов, вызванную активацией $P2Y_1$ - рецепторов, т.е. не влияет на начальные этапы активации процесса агрегации тромбоцитов. Однако изученное вещество в концентрации 1 мкМ практически полностью блокирует агрегацию тромбоцитов, вызванную активацией $P2Y_{12}$ - рецепторов, что может являться одним из предполагаемых механизмов действия данного вещества.

Также было показано, что вещество Sbt-828 в условиях патологии *in vitro* способно уменьшать количество МДА, что указывает на снижении им уровня проагреганта TXA_2 .

Важную роль в регуляции тромбогенного потенциала крови играет эндотелий сосудистой стенки. Известно, что многие заболевания снижают антитромботический потенциал последней. Кроме того, ацетилсалициловая кислота подавляет выработку простациклина сосудистой стенкой. Поэтому, было изучено влияние нового производного индола на антиагрегационную активность сосудистой стенки. В результате проведенных исследований по влиянию соединения Sbt-828 на простациклин-генерирующую активность

сосудистой стенки было показано, что изученное вещество не оказывает влияния на ее способность вырабатывать простаглицлин, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, но при этом новое производное индола восстанавливает эту способность при повышении тромбогенного потенциала крови, что может быть связано с ингибированием им процессов внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

При изучении влияния соединения Sbt-828 на уровень кальция в тромбоцитах было показано, что данное вещество подавляет концентрацию внутриклеточного кальция в тромбоцитах в присутствии его физиологических концентраций, превосходя по своей способности препараты сравнения - антиагрегантное средство ацетилсалициловую кислоту и антагонист ионов кальция верапамил. Однако, в отсутствии физиологических концентраций Ca^{2+} изученное вещество не проявляет выраженной активности, что позволяет предположить отсутствие у него прямого влияния на уровень внутриклеточного кальция. Также соединение Sbt-828 не оказывало влияние на уровень мембраносвязанного кальция.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных, а также данных литературы предполагаемый антиагрегантный механизм действия соединения Sbt-828 может реализовываться через ингибирование фермента циклооксигеназы и соответственно снижение уровня тромбоксана A_2 , на что указывает также его способность выраженно ингибировать агрегацию тромбоцитов *in vitro*, вызванную арахидоновой кислотой, коллагеном и агонистом тромбоксановых рецепторов U46619. Кроме того, возможным механизмом действия изученного вещества может быть блокирование P2Y_{12} рецепторов тромбоцитов, однако, для этого необходимо проведение более глубокого изучения данного вида активности.

ГЛАВА 7. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ Sbt-828

Изучение токсического действия и характера изменений, приводящих к гибели животных, является важным этапом фармакологического исследования новых соединений. Оценка общего токсического действия веществ на мышах по С. Ирвину [Irwin S., 1964] позволяет оценить состояние ЦНС, эмоциональный статус животных, поведенческие реакции, нервно-мышечную возбудимость, вегетативные параметры, а так же определить дозы соединений, при которых начинают проявляться их неблагоприятные эффекты.

Ранее была определена острая токсичность соединения Sbt-828 (глава 3), показатель которой (LD_{50}) при внутрибрюшинном введении мышам составил 220,0 мг/кг, что делает возможным отнести его к малотоксичным препаратам [Саноцкий И.В., 1975]. Но для того, чтобы оценить возможные токсические эффекты показателя острой токсичности вещества бывает недостаточно, так как нежелательные эффекты могут проявляться в дозах, которые не вызывают гибель животных.

В связи с этим изучение возможности проявления токсических эффектов соединения Sbt-828 является целесообразным.

7.1. Влияние соединения Sbt-828 на эмоциональный статус, рефлексы и нервно-мышечную возбудимость

В целях изучения влияния на изменения эмоционального статуса животных, нервно-мышечной возбудимости и рефлексы соединения Sbt-828 проводились следующие исследования: наблюдение за наличием или отсутствием вокализации, пугливости во время касания мыши корнцангом, агрессии, проявление синдрома Штрауба, тремора, парезов, судорог.

Также проводили оценку выраженности слухового, роговичного и ипсилатерального сгибательного рефлексов.

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

При введении соединения Sbt-828 в дозе до 100 мг/кг состояние рефлексов у животных не изменялось. Начиная с дозы 100 мг/кг, статистически недостоверно на 17% снижался роговичный рефлекс на 30 минуте, а ипсилатеральный сгибательный и слуховой рефлекс на 17% через 30 и 60 минут с момента введения соединения Sbt-828. Роговичный рефлекс восстанавливался к 60 минуте, а ипсилатеральный сгибательный и слуховой рефлекс рефлекс - к 120 минуте.

В дозах 125 и 150 мг/кг у мышей не наблюдалось угнетение роговичного рефлекса, но в дозе 125 мг/кг отмечалось снижение к 120 минуте слухового рефлекса на 17%, и к 30 минуте наблюдения на 34% угнетался ипсилатеральный сгибательный рефлекс, которые полностью восстанавливались к 180 и 60 минутам соответственно. При повышении дозы до 150 мг/кг изменения слухового и ипсилатерального сгибательного рефлексов соответствовали данным, полученным при введении вещества Sbt-828 в дозе 125 мг/кг (табл. 7.1).

Нервно-мышечная возбудимость мышей при всех дозах исследуемого вещества Sbt-828 до 150 мг/кг оставалась в пределах нормы. На протяжении всего исследования парезов, тремора, судорог и синдрома Штраубе не было отмечено ни в одной из групп животных. При введении соединения в дозе 150 мг/кг на 30 минуте в 30% случаев возникали тремор, подергивания и судороги. К 60 минуте тремор и подергивания наблюдались в 34% случаев. Судороги к этому времени проявились у 17 % животных. К 120 минуте наблюдения данные проявления инервно-мышечной возбудимости полностью нивелировались (табл. 7.2).

Таблица 7.1.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутривбрюшинном введении) на рефлексы мышеч (M±m).

Доза, мг/кг	Рефлексы														
	Роговичный					ответ на раздражение слухового прохода					Ипсилатеральный сгибательный				
	интервалы времени, мин														
	Исход	30	60	120	180	Исход	30	60	120	180	Исход	30	60	120	180
Контроль (физ. р-р)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100	—	17%↓	—	—	—	—	17%↓	17%↓	—	—	—	17%↓	17%↓	—	—
125	—	—	—	—	—	—	—	—	17%↓	—	—	34%↓	—	—	—
150	—	—	—	—	—	—	34%↓	17%↓	—	—	—	17%↓	—	—	17%↓

Таблица 7.2.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на нервно-мышечную возбудимость мышц ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Нервно-мышечная возбудимость														
	Тремор					Подергивания					судороги				
	интервалы времени, мин.														
	исход	30	60	120	180	исход	30	60	120	180	исход	30	60	120	180
Контроль (физ. р-р)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
125	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
150	—	30%	34%	—	—	—	30%	34%	—	—	—	30%	17%	—	—

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение Sbt-828 не оказывает выраженного влияния на функциональную активность высшей нервной деятельности (отсутствие изменений эмоционального поведения животных) и вызывает незначительные нарушения нервно-мышечной возбудимости. При этом опытное вещество приводит к обратимым нарушениям нервно-мышечной проводимости в дозах 150 мг/кг. Это подтверждается незначительным снижением на 30 и 60 минуте ипсилатерального сгибательного и слухового (на 30 и 180 минуте) рефлексов.

7.2. Действие вещества Sbt-828 на двигательную и мышечную координацию, реактивность

В целях изучения влияния соединения Sbt-828 на изменения со стороны двигательной и мышечной координации (миорелаксантное действие) выполнялись следующие тесты: наблюдение за изменением позы (положение тела в пространстве, конечностей), двигательной (расстройство равновесия, дискоординация, тонус конечностей, «Ротарод тест») и мышечной («тест удержания на проволоке и сетке») координацией, регистрация реактивности (время начала движения животного с места).

Группы животных, изучаемые дозы вещества Sbt-828 и способ его введения, а также временные интервалы регистрации исследуемых параметров и методики проведения тестов соответствовали главе 2.

После того как мышам, было введено соединение Sbt-828, не наблюдалось изменения позы, тонуса конечностей и нарушения равновесия. Также на протяжении всего исследования не наблюдалось развитие дискоординации.

При внутрибрюшинном введении соединения Sbt-828 в дозе 10 и 50 мг/кг у животных наблюдалось статистически незначимое снижение значения данного показателя в среднем на 22,2% (табл. 7.3).

При введении соединения Sbt-828 в дозе 100 мг/кг отмечалось достоверное уменьшение времени удержания животных на вращающемся стержне - во временных интервалах 30 и 60 минут в 3,7 раз и во временных

интервалах 120 и 180 минут в 1,7 раза относительно контроля и животных, получавших меньшие дозы вещества (10 – 50 мг/кг). Однако при введении соединения в данной дозе на 180 минуте достоверность уменьшения времени удержания животных отмечалась только относительно значений, полученных в контроле.

В дозе вещества 125 мг/кг во временных интервалах 30 и 60 минут животные не удерживались на вращающемся стержне. При увеличении временных интервалов до 120 и 180 минут мыши вновь удерживались на стержне, однако время удержания было снижено в 9 и 3,6 раза соответственно относительно контроля. По отношению к группам мышей, которые получали опытное вещество от 10 до 100 мг/кг, статистически достоверно уменьшалась двигательная координация также статистически достоверно уменьшалась.

В группе животных с максимально исследуемой дозой вещества Sbt-828 отсутствовало удержание на вращающемся стержне во всех временных интервалах (табл. 7.3).

При введении соединения Sbt-828 в дозе 10 и 50 мг/кг сохранялась мышечная координация животных, т.е. способность к удержанию всеми лапами на проволоке во всех временных интервалах. Введение соединения Sbt-828 в дозе 100 мг/кг вызывало статистически значимое угнетение мышечной координации, начиная с 30 до 120 минуты в среднем в 1,4 раза, которое практически полностью восстанавливалась к 180 мин. В дозе 125 мг/кг наблюдали статистически значимое по отношению к контролю в 4,6 раза и к группе животных с меньшими дозами (10-100 мг/кг) снижение способности удерживаться всеми лапками только на проволоке. В дозе 150 мг/кг мышечная координация была полностью угнетена во всех временных интервалах за исключением 180 минут (табл. 7.4). Через три часа с момента введения 150 мг/кг Sbt-828 способность животных удерживаться всеми лапками за проволоку сохранялась примерно на 12,5%, что было статистически незначимо к контролю и группам с меньшими дозами вещества (табл. 7.4). В диапазоне доз

10-100 мг/кг сохранялась мышечная координация животных, а именно их способность удерживаться на сетке.

Таблица 7.3.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на двигательную координацию (Ротарод-тест) интактных мышей ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Время удержания на вращающемся стержне, сек.				
	интервалы измерения				
	Исход	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.
контроль (физ.р-р)	30,0±0,00	30,0±0,00	30,0±0,00	30,0±0,00	30,0±0,00
10	30,0±0,00	30,0±0,00	28,3±1,83	24,3±3,08	22,0±4,20
50	30,0±0,00	30,0±0,00	25,0±3,46	28,3±1,83	24,7±2,85
100	30,0±0,00	8,0±5,05 ^{1,2,3}	7,8±4,88 ^{1,2,3}	17,5±6,18 ^{1,2,3}	17,3±3,47 ¹
125	30,0±0,00	—	—	3,3±2,26 ^{1,2,3,4}	8,2±3,81 ^{1,2,3,4}
150	30,0±0,00	—	—	—	—

Примечание: ¹ Статистически значимые отличия относительно группы контроля; ² Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 10 мг/кг; ³ Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴ Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 100 мг/кг ($p < 0,05$, Two-way ANOVA)

Таблица 7.4.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на мышечную координацию интактных мышей ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Мышечная координация, баллы									
	удержание на проволоке					удержание на сетке				
	интервалы измерения									
	исход	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.	исход	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.
контроль (физ. р-р)	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00
10	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00
50	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	4,0±0,00	3,8±0,18	4,0±0,0
100	4,0±0,00	2,7±0,46 ^{1,2,3}	3,0±0,57 ^{1,2,3}	2,8±0,44 ^{1,2,3}	3,3±0,37	4,0±0,00	4,0±0,00	3,7±0,37 ^{1,2,3}	4,0±0,00	4,0±0,00
125	4,0±0,00	0,7±0,46 ^{1,2,3,4}	0,7±0,47 ^{1,2,3,4}	1,5±0,55 ^{1,2,3,4}	2,8±0,44 ^{1,2,3}	4,0±0,00	—	—	4,0±0,00	4,0±0,00
150	4,0±0,00	—	—	—	0,5±0,71 ^{1,2,3,4,5}	4,0±0,00	—	—	—	0,5±0,71 ^{1,2,3,4,5}

Примечание: ¹Статистически значимые отличия относительно группы контроля; ²Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 10 мг/кг; ³Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 100мг/кг; ⁵Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 125 мг/кг мг/кг ($p < 0,05$, Two-way ANOVA)

При оценке результатов изменения реактивности животных было показано, что в дозах 10 и 50 мг/кг соединение Sbt-828 не оказывало влияния на данный показатель. При введении Sbt-828 в дозах 100 и 125 мг/кг на 30 и 60 минутах наблюдения выявлялось статистически значимое снижение реактивности животных по сравнению с контрольной группой и группами животных, получавших вещество в дозах 10 и 50 мг/кг. Однако к 120 и 180 минутам данное снижение было статистически незначимым. В дозе 150 мг/кг соединение Sbt-828 вызывало статистически значимое снижение реактивности животных по отношению к контролю и группам животных, получавших вещество в диапазоне доз 10-125 мг/кг на протяжении всего времени наблюдения (табл. 7.5).

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных наблюдений было выявлено, что вещество Sbt-828 проявляет миорелаксантную активность в диапазоне доз от 100 до 150 мг/кг при проведении «Роторад-теста» и при 125 мг/кг в тесте «удержание на проволоке». Значимое снижение двигательной активности мышей (реактивность) наблюдается во временном интервале 30-60 минут после введения вещества в дозах 100-150 мг/кг. При остальных дозах Sbt-828 статистически достоверного изменения двигательной, мышечной координации, реактивности не развивается.

Таблица 7.5.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на поведенческую реакцию (реактивность) интактных мышей ($M \pm m$).

Доза мг/кг	Реактивность, сек.				
	интервалы измерения				
	исход	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.
контроль (физ. р-р)	2,2±0,34	4,3±1,08	6,7±0,78	6,2±0,91	6,8±1,04
10	2,0±0,40	7,2±1,86	8,3±3,63	8,3±3,63	8,3±3,43
50	2,3±0,37	3,3±1,51	4,3±1,78	9,7±6,69	9,7±5,35
100	2,0±0,28	32,7±10,46 ^{1,2,3}	29,3±15,34 ^{2,3}	18,8±10,02	13,3±10,29
125	3,5±0,84	30,8±2,76 ^{1,2,3}	23,0±2,08 ³	20,0±1,65	16,8±1,43
150	2,2±0,52	66,7±8,64 ^{1,2,3,5}	57,0±4,24 ^{1,2,3,4,5}	55,5±4,95 ^{1,2,3,4,5}	54,5±7,78 ^{1,2,3,4,5}

¹Статистически значимые отличия относительно группы контроля; ²Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 10 мг/кг;

³Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 100 мг/кг; ⁵Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 125 мг/кг ($p < 0,05$, Two-way ANOVA)

7.3.Изучение поведенческой реакции мышей (тест «открытое поле») при введении соединения Sbt-828.

Для оценки действия вещества на поведенческие реакции (спонтанная двигательная активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования) животных применялся метод «открытого поля» [Воронина Т.А., 2005]. Данный метод исследования описан в главе 2. При проведении исследований наблюдали уменьшение всех регистрируемых параметров с повышением вводимой дозы Sbt-828 и увеличением времени его действия как относительно контрольной группы животных, так и внутри каждой опытной группы. Так статистически значимое относительно минимальной дозы Sbt-828 уменьшение горизонтальной активности наблюдали в группе, получавшей вещество из расчёта 150 мг/кг через 30 мин. после его введения. У животных, которые получали Sbt-828 в количестве 10 и 50 мг/кг, незначительно снижалась вертикальная двигательная активность в каждом временном интервале. В группах животных, которым вводили вещество в диапазоне доз 100-150 мг/кг данный параметр не регистрировался в течение всего исследования (табл. 7.6). Также с увеличением дозы от 50 до 125 мг/кг статистически значимо уменьшалась исследовательская активность (число заглядываний в отверстия) относительно контрольных значений в 2-6 раз, а в дозе 150 мг/кг поисковая активность у животных отсутствовала (табл. 7.6).

В группе мышей, которым вводилось вещество Sbt-828 в дозах 10, 50, 100 и 125 мг/кг в течение всего времени наблюдения отмечалось недостоверное снижение показателей груминга. У животных при максимально вводимой дозе Sbt-828 наблюдалось полное отсутствие актов груминга во всех временных интервалах наблюдения (табл. 7.6).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокие дозы (от 125 до 150 мг/кг) соединения Sbt-828 приводят к угнетению активности животных (горизонтальной, вертикальной и поисковой активностей) и практически не оказывает влияния на эмоциональный статус животных.

Таблица 7.6.

Влияние соединения Sbt – 828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на поведенческую активность мышей в тесте «открытое поле» ($M \pm m$).

Тип активности	Время измерения, мин	Контроль	Доза, мг/кг				
			10	50	100	125	150
1	2	3	4	5	6	7	8
Горизонтальная двигательная активность	исход	36,2±3,62	36,7±6,43	37,0±2,88	30,3±10,26	30,8±2,32	43,5±4,4
	Время после введения соединения, мин.						
	30	26,5±5,83	22,7±5,34	32,0±7,47	20,5±5,59	27,0±5,49	—
	60	21,0±5,87	16,7±2,60	20,7±9,95	23,8±10,23	16,5±6,38	0,5±0,71 ^{1,2,3,4}
	120	17,5±6,36	12,7±0,88	14,2±4,56	19,5±5,07	8,7±1,69	2,5±3,54 ^{3,4}
	180	18,0±1,26	12,2±1,04	14,2±6,31	10,7±3,74	8,7±2,60	—

Продолжение таблицы 7.6.

1	2	3	4	5	6	7	8
Вертикальная двигательная активность	исход	6,3±1,78	6,2±2,14	6,2±3,23	6,5±1,69	5,8±1,61	6,3±1,49
	Время после введения соединения, мин.						
	30	7,8±1,68	3,8±2,32	3,2±2,09	—	—	—
	60	3,2±1,66	2,8±1,25	2,8±1,31	—	—	—
	120	5,2±2,03	1,5±0,68	1,8±1,37	0,3±0,23	—	—
	180	5,5±1,49	1,2±0,72	1,5±1,26	—	—	—
Исследовательская активность (число заглядываний в отверстия)	исход	4,7±1,22	4,3±1,05	4,5±1,01	4,3±2,01	2,3±1,05	2,3±0,37
	Время после введения соединения, мин.						
	30	4,5±0,68	2,2±1,07	2,2±0,66 ¹	1,3±0,54 ¹	0,7±0,54 ¹	—
	60	2,3±0,54	1,0±0,40	1,8±0,77	0,8±0,34	0,2±0,18	—
	120	1,3±0,46	2,0±0,75	0,7±0,23	1,7±0,83	0,3±0,23	—
	180	0,7±0,37	0,7±0,54	0,8±0,52	1,00±0,40	0,2±0,18	—

Продолжение таблицы 7.6.

1	2	3	4	5	6	7	8
Груминг	исход	0,8±0,52	0,8±0,18	0,8±0,34	0,7±0,37	0,7±0,23	—
	Время после введения соединения, мин.						
	30	1,0±0,40	0,8±0,44	1,2±0,91	0,2±0,18	0,2±0,18	—
	60	1,0±0,49	1,2±0,52	1,2±0,59	0,2±0,18	0,2±0,18	—
	120	1,2±0,34	0,5±0,37	0,7±0,37	0,3±0,23	0,3±0,37	—
	180	0,7±0,37	0,2±0,18	0,7±0,37	0,7±0,46	0,2±0,18	—
Количество выходов в центр	исход	1,2±0,52	1,5±0,47	1,7±0,61	1,0±0,69	1,2±0,82	1,7±0,92
	Время после введения соединения, мин.						
	30	1,5±0,62	0,5±0,24	1,2±0,87	—	1,0±0,69	—
	60	1,0±0,49	0,2±0,18	0,3±0,23	—	—	—
	120	1,0±0,69	—	1,0±1,10	—	—	—
	180	1,8±0,34	—	0,8±0,52	0,3±0,23	—	—

Окончание таблицы 7.6.

1	2	3	4	5	6	7	8
Эмоциональность (число болюсов)	исход	—	0,2±0,18	—	0,2±0,18	—	—
	Время после введения соединения, мин.						
	30	—	0,2±0,18	—	—	—	—
	60	—	—	—	—	—	—
	120	—	—	—	—	—	—
	180	—	0,2±0,18	—	—	—	—

¹Статистически значимые отличия относительно группы контроля; ²Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 10 мг/кг;

³Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 100 мг/кг; (p<0,05, Two-way ANOVA)

7.4 Действие соединения Sbt-828 на функции вегетативной нервной системы мышей.

При проведении исследований влияния вещества Sbt-828 на состояние функции вегетативной нервной системы наблюдали за изменением болевой чувствительности, динамикой ректальной температуры, изменением цвета кожи, наличием или отсутствием птоза, экзофтальма, частотой дыхательных движений.

Формирование групп животных, диапазон изучаемых доз соединения Sbt-828, способ его введения, а также временные интервалы регистрации исследуемых параметров и методики проведения тестов описаны в главе 2.

Во всем диапазоне изучаемых доз птоз и экзофтальм у опытных животных не наблюдались. Появление цианоза кожи регистрировалось в группе животных, которым вводили опытное соединение в дозе 150 мг/кг. После введения соединения Sbt-828 наблюдалось недостоверное снижение болевой чувствительности при зажиме основания хвоста мышам во всех группах животных. И лишь в дозе 100 мг/кг на 30 минуте отмечалось достоверное повышение болевой чувствительности относительно групп животных, получавших вещество Sbt-828 в дозах 10 и 50 мг/кг в 1,8 раза, которое снижалось уже к 60 минуте наблюдения (табл. 7.7).

Ректальная температура у животных статистически значимо не менялась при введении Sbt-828 в дозах до 125 мг/кг. Однако, на протяжении всего исследования, в группе животных с максимально вводимой дозой (150 мг/кг) регистрировали достоверное относительно всех остальных экспериментальных групп животных снижение температуры на 3,2 - 4,3%. Данный факт может свидетельствовать о том, что соединение Sbt-828 в достаточно высоких концентрациях, возможно, приводит к торможению обменных процессов, нарушению проводниковой функции среднего и продолговатого мозга, а так же угнетению активности центра терморегуляции – гипоталамуса (табл. 7.8).

Таблица 7.7.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на динамику болевой чувствительности интактных мышей ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Болевая чувствительность, сек				
	интервалы измерения				
	исход	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.
контроль (физ. р-р)	1,7 $\pm$ 0,37	1,7 $\pm$ 0,37	1,3 $\pm$ 0,23	1,3 $\pm$ 0,23	1,2 $\pm$ 0,18
10	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
50	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
100	1,0 $\pm$ 0,00	1,3 $\pm$ 0,37	1,8 $\pm$ 0,91 ^{2,3,4}	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
125	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,3 $\pm$ 0,37	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
150	1,0 $\pm$ 0,00	—	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00

Примечание: ²Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 10 мг/кг;

³Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴Статистически значимые отличия относительно Sbt-828 в дозе 150 мг/кг ($p < 0,05$, Two-way ANOVA)

Таблица 7.8.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на динамику ректальной температуры интактных мышей ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Ректальная температура (°C)				
	интервалы измерения, мин.				
	исход	30	60	120	180
контроль (физ. р-р)	37,4 $\pm$ 0,45	37,2 $\pm$ 0,47	37,3 $\pm$ 0,44	37,4 $\pm$ 0,45	37,6 $\pm$ 0,47
10	37,9 $\pm$ 0,24	37,7 $\pm$ 0,37	32,7 $\pm$ 5,29	37,5 $\pm$ 0,15	37,8 $\pm$ 0,23
50	37,9 $\pm$ 0,31	38,0 $\pm$ 0,26	37,8 $\pm$ 0,26	38,2 $\pm$ 0,16	38,1 $\pm$ 0,21
100	36,9 $\pm$ 0,21	36,8 $\pm$ 0,31	36,9 $\pm$ 0,31	36,2 $\pm$ 0,16	36,8 $\pm$ 0,36
125	38,0 $\pm$ 0,15	37,9 $\pm$ 0,32	37,9 $\pm$ 0,25	38,0 $\pm$ 0,25	38,0 $\pm$ 0,10
150	37,2 $\pm$ 0,42	36,9 $\pm$ 0,18 ^{1,2,3,4,5}	36,6 $\pm$ 0,21 ^{1,2,3,4,5}	36,0 $\pm$ 0,14 ^{1,2,3,4,5}	36,3 $\pm$ 0,21 ^{1,2,3,4,5}

Примечание: ¹Статистически значимые отличия относительно группы контроля;

²Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 10 мг/кг; ³Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 100 мг/кг; ⁵Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 125 мг/кг мг/кг ($p < 0,05$, Two-way ANOVA)

При введении вещества в дозах 10, 50 и 125 мг/кг достоверного изменения частоты дыхания у мышей не наблюдалось. В группе животных, получавших Sbt-828 из расчёта 100 мг/кг на 30 минуте статистически значимо снижалась частота дыхания на 13,8 % относительно контрольной группы животных, которая к 60 минуте исследования полностью восстанавливалась.

При этом наблюдалось изменение ритма дыхания и его глубина. Оно было уреженное, поверхностное, прерывистое. Нарушение характера дыхания указывало на угнетение дыхательной и моторной функции центра дыхания (табл. 7.9).

При введении вещества в максимальной дозе к 30 минуте у животных наоборот отмечалось статистически значимое увеличение частоты дыхания на 11,4 % относительно групп животных, получавших вещество в дозах 50, 100 и 125 мг/кг, которое уже к 60 минуте наблюдения соответствовало контрольным значениям.

Следовательно, токсическое действие соединения Sbt-828 на функциональную активность вегетативной нервной системы проявляется в дозе 150 мг/кг, что подтверждается достоверным угнетением терморегуляции, а также угнетением функции дыхания в дозе 100 мг/кг.

Таблица 7.9.

Влияние соединения Sbt-828 (при однократном внутрибрюшинном введении) на частоту дыхательных движений интактных мышей ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Частота дыхательных движений за 1 мин.				
	интервалы измерения, мин.				
	исход	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.
контроль (физ. р-р)	163,3 $\pm$ 4,49	167,2 $\pm$ 6,72	160,2 $\pm$ 3,89	169,2 $\pm$ 3,94	162,5 $\pm$ 6,07
10	156,0 $\pm$ 3,75	168,0 $\pm$ 5,66	154,0 $\pm$ 5,40	154,0 $\pm$ 5,40	155,8 $\pm$ 3,63
50	166,2 $\pm$ 4,33	158,7 $\pm$ 2,44	156,0 $\pm$ 2,77	167,3 $\pm$ 3,65	166,7 $\pm$ 2,92
100	169,3 $\pm$ 3,13	144,0 $\pm$ 7,76 ^{1,2}	154,7 $\pm$ 5,02	162,0 $\pm$ 6,86	155,3 $\pm$ 7,10
125	160,7 $\pm$ 6,92	158,0 $\pm$ 7,82	160,7 $\pm$ 6,54	154,7 $\pm$ 8,37	170,7 $\pm$ 4,76
150	173,3 $\pm$ 3,33	186,7 $\pm$ 10,71 ^{3,4,5}	147,0 $\pm$ 4,24	152,0 $\pm$ 16,97	156,0 $\pm$ 11,31

Примечание: ¹Статистически значимые отличия относительно группы контроля; ²Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 10 мг/кг; ³Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 50 мг/кг; ⁴Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 100 мг/кг; ⁵Статистически значимые отличия относительно группы животных, получавших Sbt-828 в дозе 125 мг/кг мг/кг ($p < 0,05$, Two-wayANOVA)

7.5. Заключение

В результате проведенного исследования по изучению общетоксических свойств соединения Sbt-828 при однократном внутрибрюшинном введении было выявлено, что данное вещество во всех исследуемых дозах практически не оказывало влияние на эмоциональное поведение животных, не вызывало развитие побочных вегетативных эффектов в виде птоза и экзофтальма.

Начиная с дозы Sbt-828 100 мг/кг, наблюдались обратимые единичные признаки поражения только со стороны центральной нервной системы (двигательная координация) и высшей нервной деятельности (поведенческие реакции). В максимально вводимой дозе соединения Sbt-828 (150 мг/кг) у животных регистрировались выраженные симптомы общетоксического эффекта изученного вещества. Это подтверждается признаками повреждения центральной (угнетение мышечной координации и реактивности), а так же нарушением работы периферической (снижение рефлексов) и вегетативной (урежение дыхания, снижение ректальной температуры и болевой чувствительности) нервных систем.

ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Повышение агрегационной активности тромбоцитов является одним из важнейших патогенетических механизмов развития и прогрессирования нарушений коронарного и мозгового кровообращения [Broos K., 2011]. Тромбоциты играют ведущую роль в гемокоагуляции, являясь как основой формирования тромба, связанной с их способностью к адгезии, агрегации, уплотнению и секреции, так и активаторами плазменных факторов свертывания [Rivera J., 2009]. Поэтому, обязательным звеном в лечении и профилактике тромбозов являются антитромбоцитарные препараты, которые могут существенно уменьшить риск развития тромботических осложнений. [Воронина Е.Н., 2006; Maree A.Q., 2007]. В настоящее время имеется более 20 различных лекарственных препаратов, которые способны угнетать функции тромбоцитов с помощью различных механизмов действия. В настоящее время в клинической практике подтверждена эффективность лишь ацетилсалициловой кислоты, тенонопирифинов (тиклопидина и клопидогрела), дипиридамола в сочетании с ацетилсалициловой кислотой, а также антагонистов GP IIb/IIIa для внутривенного применения.

Данные препараты являются высокоэффективными, однако они не лишены недостатков и побочных эффектов. Среди этих эффектов желудочно-кишечные осложнения, которые сопровождаются эрозиями слизистой оболочки, болями в эпигастральной области, изжогой и кровотечениями. Также описана резистентность к ацетилсалициловой кислоте и клопидогрелу, характеризующаяся отсутствием блокирования функции тромбоцитов и уменьшением антитромботического эффекта [Morini S., 2010]. Ингибиторы гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa, помимо перечисленных выше нежелательных эффектов, могут вызывать брадикардию, АВ-блокаду, гипотензию, спутанность сознания, нарушение зрения, анафилактический шок, анемию, лейкоцитоз [De Luca G., 2009]. Также недостатком антиагрегантных

препаратов является то, что они блокируют только какой-то один путь, приводящий к агрегации тромбоцитов. В последнее время для повышения антитромботического эффекта используется двойная антиромбоцитарная терапия, что приводит к усилению побочных эффектов. Это требует постоянного лабораторного контроля со стороны системы крови и уровня активности тромбоцитов с использованием метода агрегометрии. Поэтому в настоящее время ведется активный поиск новых антитромботических соединений, влияющих на новые звенья патогенеза агрегации тромбоцитов [Nilsson T., 2010].

На основании обзора литературных данных, а также на основании исследований, проведенных ранее на кафедре фармакологии Волгоградского Государственного Медицинского университета, выявлена способность гетероциклических азотсодержащих соединений, блокировать агрегацию тромбоцитов [Спасов А.А., 2006; Кучерявенко А.Ф., 2013]. Полученные данные открывают перспективу для разработки высокоэффективных антиагрегантных средств на основе гетероциклических индолсодержащих систем с целью их дальнейшего доклинического и клинического изучения в качестве новых потенциальных отечественных антитромботических средств. Химический класс производных индола считается перспективным для создания на его основе новых препаратов, о чем свидетельствует широкий спектр, проявляемой биологической активности [Mehta D.S., 2005; Nofal Z.M., 2011].

В качестве объектов исследования было взято 29 гетероциклических соединений, которые по химической структуре относятся к следующим классам производных индола: амиды и аминоспирты ряда индола.

Для поиска наиболее активных соединений в ряду новых производных индола использовался метод АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов G. Born, в модификации Габбасова В.А.(1989) *in vitro*.

Наиболее изученным и широко используемым антиагрегантным средством с доказанной активностью является ацетилсалициловая кислота.

[Введите текст]

Данное средство было выбрано в качестве препарата сравнения потому, что проявляет способность ингибировать процессы агрегации тромбоцитов *in vitro*, в отличие от не менее широко используемого антиагрегантного средства – клопидогреля, проявляющего свою активность только в целом организме. Кроме того, согласно данным литературы гетероциклические индолсодержащие соединения по механизму действия относятся к ингибиторам циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы. В ходе экспериментального изучения дозозависимой антиагрегантной активности ацетилсалициловой кислоты было рассчитано значение EC_{50} , которое составило $7,1 \times 10^{-4} M$.

При проведении экспериментального поиска веществ с антиагрегантной активностью среди производных индола было выявлено 7 соединений, проявляющих высокую способность угнетать функциональную активность тромбоцитов. У данных соединений была изучена дозозависимая активность и определены EC_{50} . При этом наиболее выраженное действие в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов проявили два соединения под шифрами Sbt-815 и Sbt-828. EC_{50} вещества Sbt-815 составила $1,5 \times 10^{-5} M$, а соединения Sbt-828 – $4,45 \times 10^{-5} M$. Полученные результаты превосходили препарат сравнения в 47 и 16 раз соответственно. По терапевтическому индексу соединения Sbt-815 и Sbt-828 превышали ацетилсалициловую кислоту в 13 и 4,4 раза соответственно.

Среди изученных соединений был проведен детальный анализ влияния заместителей на высокий уровень антиагрегантной активности. В результате было выявлено, что в группе замещённых амидов ряда индола вклад в наличие антиагрегантной активности могут вносить диаминоэтильные заместители в положении R^1 , а также фенильный и 2-фтор и 2-метоксифенильные заместители в положении R^3 .

На основе анализа зависимости антиагрегантной активности от структуры в группе производных аминоспиртов ряда индола можно сделать вывод, что изменения силы антиагрегантного действия у высокоактивных веществ данной группы зависят от радикалов в положении N^9 . Так, выраженное

[Введите текст]

антиагрегантное действие двух наиболее активных соединений Sbt-815 и Sbt-828 определяется метил-(п-бутил)-аминовым и тиенилкарбоксиэтильным заместителями соответственно в положении N⁹.

Кроме того, все изученные новые производные индола ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов «*in vitro*» и отличались лишь по степени выраженности эффекта, можно предположить, что в антиагрегантную активность данного класса вносит также положительное влияние базовая структура, а именно индол.

Несмотря на способность изученных соединений подавлять агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ, известно, что в целом организме на тромбоциты оказывает влияние не только данный индуктор, а целый ряд факторов, к которым относятся коллаген сосудистой стенки, фактор активирующий тромбоциты, тромбин, простациклин, NO и др. Также большое значение имеет скорость кровотока, активность ПОЛ, дислипидемия и др [Yuhki K., 2010]. Поэтому, чтобы наиболее полно оценить антиагрегантное действие изучаемых соединений, было проведено исследование антитромбоцитарной активности веществ *in vivo* на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

В результате проведенных экспериментов было показано, что соединение Sbt-828 проявило высокую способность предотвращать внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов, превосходя ацетилсалициловую кислоту в 2,9 раза, что подтверждает высокий антитромбоцитарный эффект данного соединения, полученный в опытах *in vitro*. Что касается антиагрегантного действия соединения Sbt-815, оно по выраженности действия уступало препарату сравнения, что, возможно, может быть связано с фармакокинетическими особенностями данного соединения. Поэтому, для дальнейшего более глубокого изучения антиагрегантной активности на различных моделях экспериментальной патологии и механизма антиагрегантного действия, с учетом влияния на основные звенья патогенеза агрегации тромбоцитов, было выбрано вещество Sbt-828.

Проблема артериальных тромбозов занимает ведущую роль в кардиологической практике. Они часто являются причиной внезапной смерти, инфаркта миокарда, сосудистых осложнений сахарного диабета, снижают результативность хирургического лечения ишемической болезни сердца [Hagedorn I., 2010]. Артериальные тромбозы формируются при высокой скорости кровотока при повреждении сосудистой стенки, состоят преимущественно из скоплений тромбоцитов, фиксированных между собой фибриновыми нитями (белые тромбы). Присутствие активированного тромбина, являющегося одним из главных медиаторов активации тромбоцитов и превращения фибриногена в фибрин, определяет тактику патогенетической терапии артериальных тромбозов, включающую обязательное использование фармакологических средств, снижающих агрегационные свойства. Поэтому было изучено антитромбогенное действие соединения Sbt-828 на различных моделях артериальных тромбозов. К таким тромбоцит-зависимым тромбозам относится тромбоз, индуцированный поверхностной аппликацией 50% хлорида железа (III) и анодного тока на сонную артерию крыс, а также генерализованный адреналин-коллагеновый тромбоз на мышах. В качестве препарата сравнения была изучена ацетилсалициловая кислота.

Модель тромбоза, индуцированного аппликацией 50% хлорида железа (III), активирует следующие составляющие тромботического процесса: агрегацию тромбоцитов, образование фибрина и эритроциты [Dogne J.M., 2004]. Также хлорид железа способствует развитию в очаге поражения реакции Хабера-Вейса (по химии Фентона (взаимодействие железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы)).

Проведенный сравнительный анализ антитромботического действия на данной экспериментальной модели соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты выявил преимущество нового производного индола. Так, ED_{50} данного вещества было в 3,5 раза меньше ED_{50} ацетилсалициловой кислоты.

В качестве индуктора экспериментального артериального тромбоза на крысах широко распространено использование анодного тока [Niitsu Y., 2007].

[Введите текст]

Соединение Sbt-828 продемонстрировало высокую антитромботическую активность на данной модели превосходящую по ED₅₀ препарат сравнения в 1,8 раза.

Как видно из таблицы 8.1 ED₅₀ вещества Sbt-828 было практически равнозначным на этих двух моделях тромбозов.

Таблица 8.1.

Сравнение значений ED₅₀ соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на моделях артериальных тромбозов, индуцированных аппликацией раствора хлорида железа (III) и электрического тока на сонную артерию крыс.

Шифр Соединения	Тромбоз, индуцированный 50% р-ром хлорида железа (III)	Тромбоз, индуцированный, электрическим током
	ED ₅₀ , мг/кг	ED ₅₀ , мг/кг
Sbt-828	32,7	34,3
Ацетилсалициловая кислота	114,7	61,9

Соединение Sbt-828 уменьшало смертность белых мышей при системном тромбозе, вызванном введением смеси тромботических агентов коллагена и адреналина в хвостовую вену животных. Из литературных данных [Мурина М.А., 2002; Кучерявенко А.Ф., 2013] известно, что в данной модели причиной гибели животных является массивная окклюзия микрососудов легких тромбоцитарными агрегатами. Соединение Sbt-828 было изучено согласно методике DiMinno G. (1983). При введении вещества Sbt-828 после воздействия тромботических агентов выживаемость животных составила 90%. Полученный результат в 3 раза превысил эффект препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты.

Выраженная антитромботическая активность соединения Sbt-828 подтверждается и проведенными гистологическими исследованиями органов животных. Были обследованы микрососуды сердца, печени, почек и головного

[Введите текст]

мозга животных, которым вводились тромботические агенты. В результате установлено отсутствие тромбов в сосудах исследованных органов, что соответствует литературным данным [Мурина М.А., 2002].

Однако в образцах легких животных контрольной группы при электронно-микроскопическом исследовании в значительной части сосудов легких были выявлены белые тромбы, находящиеся в просвете сосуда. При гистологическом исследовании легких мышей, которым вводилось соединение Sbt-828 и ацетилсалициловая кислота, было выявлено достоверное снижение относительной и средней площади тромбов на срезе легкого по сравнению с контрольной группой. Так, по сравнению с контрольной группой изученное вещество снижало относительную площадь тромбов на срезе легкого на 33,7%, тогда как ацетилсалициловая кислота - на 18,6 %.

Таким образом, соединение Sbt-828 по своей антитромботической активности, проявленной на различных моделях артериальных тромбозов, превосходит препарат сравнения, что свидетельствует в пользу того, что данная активность, вероятно, связана с его влиянием на патогенетические звенья агрегации тромбоцитов.

При исследовании действия соединения Sbt-828 на время кровотечения из хвостовой вены мышей было выявлено удлинение данного параметра, что свидетельствует об ингибировании агрегации тромбоцитов. Однако, в сравнении с ацетилсалициловой кислотой, время кровотечения под действием соединения Sbt-828 было короче, что делает возможным предположить в будущем наличие слабовыраженных побочных эффектов в виде кровотечений.

Главной причиной смертности больных диабетом является сердечно-сосудистая патология и ее осложнения, нередко сопровождающиеся фатальным исходом [Madan R., 2010]. На сегодняшний день известно, что ключевую роль в развитии микроангиопатий при СД играет нарушение функциональной активности тромбоцитов [Lopes R., 2011].

Нарушение тромбоцитарной реактивности при СД связывают с дисбалансом в простаглицлин-тромбоксановой системе, т.е. с повышением
[Введите текст]

уровня проагреганта и вазоконстриктора TXA_2 и снижением концентрации антиагреганта и вазодилататора простаглицлина. Кроме того, существует большое количество данных, подтверждающих прямое и косвенное участие гемореологических факторов в развитии микрососудистых и атеросклеротических осложнений при СД [Tamariz L.J., 2008; Singh M., 2009]. Так, при данной патологии повышается агрегация эритроцитов и вязкость крови, снижается способность мембраны к деформации, увеличивается адгезия эритроцитов к эндотелиальным клеткам. В основе этих гемореологических нарушений лежит изменение структурно-функциональных свойств клеточной мембраны, а именно, дестабилизация липидного бислоя последней [Muravyov A.V., 2009].

Все вышеперечисленные нарушения гемостаза обуславливают ускоренное прогрессирование атеросклероза, что сопровождается риском возникновения тромбозов и микроциркуляторных нарушений [Hagedom I., 2010]. Поэтому, дополнительная антитромбогенная защита, помимо самостоятельного положительного эффекта коррекции гликемии, может и должна приниматься во внимание при лечении данной патологии [Natarajan A., 2008]. В связи с этим, были проведены исследования влияния соединения Sbt-828 на тромбоцитарно-сосудистый гемостаз при экспериментальном СД. Для этого во всех группах животных за два месяца до исследования была создана тяжелая форма аллоксановой интоксикации. Оценку эффективности действия вещества и препарата сравнения на гемостаз проводили после недельного внутрижелудочного введения животным с аллоксановой интоксикацией.

По сравнению с интактными животными уровень глюкозы у крыс с тяжелой формой аллоксанового диабета увеличивался в 3,7 раза. При этом соединение Sbt-828 после ежедневного семидневного введения не влияло на данный показатель.

Для оценки гемобиологической и антитромботической активности нового производного индола на животных с экспериментальным диабетом в качестве

препарата сравнения было выбрано эффективное пероральное противодиабетическое средство с антиагрегантными свойствами - гликлазид.

В группе животных с аллоксановой интоксикацией было выявлено достоверное повышение агрегации тромбоцитов по сравнению с интактными крысами. Соединение Sbt-828 достоверно снижало данный показатель на 41,2% и превосходило препарат сравнения в 1,8 раза.

Одними из механизмов антитромбоцитарного действия данного вещества при СД, возможно, является его способность оказывать влияние на баланс простаглицлина и тромбосана, а также достоверно подавлять агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ *in vitro* и *in vivo*. При сахарном диабете АДФ принадлежит одна из главных ролей в инициации процессов агрегации тромбоцитов, которая приводит к повышению поступления внеклеточного Ca^{2+} путем открытия АДФ-зависимых неселективных кальциевых каналов.

При сахарном диабете помимо повышения реактивности тромбоцитов также повышается синдром вязкости крови, на фоне которого могут изменяться гидродинамические факторы сосудистого тромбоза [Плотников М.Б., 2005]. Вязкость крови при различных скоростях сдвига неодинакова. Она характеризует кровоток в разных областях гемоциркуляции и суммарно отражает агрегатное состояние эритроцитов, их деформабильность, содержание фибриногена крови [Singh M., 2010]. В результате влияния соединения Sbt-828 на ВК у крыс с аллоксановым диабетом было выявлено достоверное снижение данного параметра при различных скоростях сдвига, превосходящее пентоксифиллин. Наибольшее действие исследованное вещество оказывало при низкосдвиговых значениях вязкости крови, которые отражают агрегацию эритроцитов в веноулярных отделах микроциркуляторного русла. Так, соединение Sbt-828 при скорости сдвига 10c^{-1} и 20c^{-1} уменьшало вязкость на 28,9 и 22,1 % соответственно, превосходя препарат сравнения пентоксифиллин. Активность исследуемого вещества в отношении влияния на вязкость крови при высоких скоростях сдвига, которые свидетельствуют о способности эритроцитов к деформации, оказалась меньше, чем при низких скоростях

[Введите текст]

сдвига. Таким образом, учитывая вышесказанное, можно предположить, что курсовое введение соединения Sbt-828 крысам с экспериментальным СД способно снижать вязкость крови, уменьшая агрегацию эритроцитов. Из литературы известно, что ацетилсалициловая кислота не оказывает влияния на гемореологические показатели, более того, данный препарат вызывает ухудшение деформируемости эритроцитов и при цереброваскулярных заболеваниях может повышать опасность развития инсульта [Saniabadi A.R., 1991; Плотников М.Б., 2005].

В связи с нарушением гемостаза при СД возникает прогрессирование атеросклероза, что может привести к возникновению тромбозов [Arikawa E., 2006]. В связи с этим была изучена антитромботическая активность вещества Sbt-828 на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, у крыс с экспериментальным диабетом. Была установлена высокая антитромботическая активность нового производного индола. Так вещество Sbt-828 пролонгировало время образования тромба у крыс с экспериментальным диабетом на 91,3%, тогда как гликлазид увеличивал это время на 61,2%.

Таким образом, изученное соединение улучшает состояние тромбогенного потенциала крови при СД.

На основании полученных результатов антиагрегантного и антитромботического действия нового производного индола возникла необходимость изучения его механизма антиагрегантного действия. На мембране тромбоцитов имеются рецепторы к различным индукторам агрегации тромбоцитов. Индукторы взаимодействуют со специфическими рецепторами на плазматической мембране тромбоцитов, что служит причиной дальнейших эффектов, приводящих к активации тромбоцитов. Агонисты, вызывающие агрегацию тромбоцитов представлены АДФ, коллагеном, адреналином, тромбином. Проагрегационное действие оказывают также арахидоновая кислота, простагландин TXA_2 , ФАТ и др. Такие индукторы, как АДФ и адреналин позволяют оценить влияние веществ на первую обратимую фазу

[Введите текст]

агрегации. Тромбин, коллаген, TXA_2 , ФАТ, АДФ в концентрации выше 2 мкМ способны вызывать необратимую агрегацию тромбоцитов, которая сопровождается реакцией выброса эндогенных биологически активных веществ из тромбоцитов.

Соединение Sbt-828 выражено блокировало агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ и адреналином. По механизму действия АДФ, связываясь с гликопротеиновыми рецепторами на плазматической мембране тромбоцита, ингибирует активность аденилатциклазы и тем самым снижает уровень цАМФ. В результате происходит высвобождение арахидоновой кислоты и образование мощного проагеганта и вазоконстриктора TXA_2 .

Адреналин по своему эффекту на тромбоциты действует слабее по сравнению с АДФ, так как вызывает агрегацию тромбоцитов без изменения дисковидной формы, взаимодействуя с α - адренорецепторами плазматической мембраны. При этом происходит ингибирование аденилатциклазы, однако, механизм действия адреналина не зависит от образования TXA_2 , реакции высвобождения, а связан с модуляцией мембран тромбоцитов и изменением их проницаемости к ионам Ca^{2+} [Адиб Ал-Амуш, 2006]. Таким образом, можно предположить, что Sbt-828 оказывает влияние на вторую фазу процесса агрегации тромбоцитов, во время которой происходит реакция высвобождения биологически активных веществ.

Необратимую агрегацию тромбоцитов стимулировали арахидоновой кислотой, тромбином, коллагеном и агонистом тромбоксановых рецепторов U46619.

Соединение Sbt-828 проявило наиболее выраженное дозозависимое действие в отношении агрегации тромбоцитов, вызванной арахидоновой кислотой. Арахидоновая кислота способна стимулировать агрегацию тромбоцитов в результате образования продуктов ее естественного метаболизма и, в первую очередь, TXA_2 , под действием фермента циклооксигеназы. Полученные данные EC_{50} соединения Sbt-828

свидетельствуют о его способности снижать синтез продуктов арахидонового каскада.

Механизм агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином, сопровождается активацией фосфолипазы С и включением фосфоинозитольного механизма активации. В результате происходит быстрое увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} . Вещество Sbt-828 дозозависимо ингибировало тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что дает возможность предположить либо его прямое влияние на ингибирование фосфоинозитольного пути активации тромбоцитов и снижения уровня цитозольного кальция, либо подавление этого пути через ингибирование арахидонового каскада.

Механизм действия коллаген-индуцированной агрегация тромбоцитов связан с активацией различных эффекторных систем в тромбоцитах. В начальной стадии активации тромбоцитов коллаген взаимодействует с рецепторами, приводя к активации фосфолипазы A_2 и последующему образованию в тромбоцитах активных метаболитов арахидоновой кислоты - TXA_2 и ФАТ. В промежуточной стадии происходит активация под действием TXA_2 и ФАТ фосфолипазы С, в результате чего образуются вторичные посредники ИФ_3 и ДАГ , что в дальнейшем приводит к повышению внутриклеточного уровня свободных ионов кальция, активации ПКС, секреции и высвобождению содержимого гранул. И, наконец, вышеперечисленные процессы приводят к конечному этапу, а именно, экспонированию гликопротеинового комплекса IIb/IIIa , служащего центрами связывания фибриногена, и образованию необратимых агрегатных комплексов. Соединение Sbt-828 дозозависимо ингибировало коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Согласно данным литературы активация тромбоцитов, индуцированная коллагеном в концентрации 20 мкг/мл, вызывает инициацию процесса межтромбоцитарного взаимодействия, главным образом, путем активации фосфолипазы A_2 с последующим высвобождением арахидоновой

кислоты и синтезом TXA_2 . Что также позволяет предположить влияние данного вещества на циклооксигеназную систему.

Другой индуктор агрегации тромбоцитов агонист тромбоксановых рецепторов U46619 вызывает изменение формы, агрегацию и секрецию тромбоцитов. В отношении данного индуктора соединение Sbt-828 также проявило дозозависимое достоверное ингибирующее действие. Концентрации, в которых вещество проявляло свою активность, дают возможность предположить о наличии слабого рецепторного действия в отношении тромбоксановых рецепторов.

В таблице 8.2 представлены значения EC_{50} антиагрегантной активности соединения Sbt-828 в отношении изученных индукторов агрегации тромбоцитов.

Таблица 8.2.

Влияние соединения Sbt-828 на агрегацию тромбоцитов кролика, вызванную различными индукторами.

N п/п	Индукторы агрегации тромбоцитов	Концентрация индуктора	EC_{50}, M
			Sbt-828
1.	АДФ	5 мкМ	$4,45 \times 10^{-5}$
2.	Адреналин	5 мкМ	$7,1 \times 10^{-5}$
3.	Арахидоновая кислота	50 мкМ	$1,1 \times 10^{-6}$
4.	Тромбин	0,5 ед/мл	$3,7 \times 10^{-5}$
5.	Коллаген	20 мкг/мл	$3,4 \times 10^{-5}$
6.	U46619	3 мкМ	$2,2 \times 10^{-5}$

Анализируя данные показатели необходимо отметить, что наибольшую активность вещество проявило в отношении индуктора арахидоновой кислоты, что позволяет нам предположить наличие влияния данного соединения на синтез продуктов метаболизма последней, в частности, на циклооксигеназный путь синтеза TXA_2 . Кроме того, в пользу данного механизма антиагрегантного действия свидетельствует подавление данным веществом коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, также выраженное блокирование агрегации тромбоцитов, вызванно агонистом тромбоксановых рецепторов. Подавление веществом агрегации тромбоцитов, вызванной тромбином, дает возможность, предположить способность данного соединения вмешиваться в регуляцию процессов синтеза вторичных посредников, особенно инозитолфосфатного пути активации тромбоцитов. Однако, возможно, это происходит через ингибирование образования тромбоксана A_2 , который вызывает активацию фосфолипазы C, запускающей этот путь активации кровяных пластинок. Наиболее низкую антиагрегантную активность соединение Sbt-828 проявило в отношении индуктора адреналина, что указывает на отсутствие прямого блокирующего действия на α - адренорецепторы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой способности соединения Sbt-828 в экспериментах *in vitro* ингибировать процессы агрегации тромбоцитов, вызванной широким спектром индукторов. Однако, можно предположить отсутствие избирательного рецепторного механизма действия, так как данное вещество не избирательно изменяет чувствительность различных рецепторов на тромбоците. В пользу этого свидетельствует тот факт, что при воздействии на мембранные рецепторные системы характерны более низкие концентрации веществ, необходимые для проявления их антиагрегационного действия. Следовательно, первичным местом воздействия соединения Sbt-828 не являются мембранные рецепторные системы. В пользу этого также свидетельствует тот факт, что новое производное индола не оказывает действие на P2Y_1 - рецепторы тромбоцитов.

[Введите текст]

Механизм активации $P2Y_1$ - рецепторов тромбоцитов осуществляется через взаимодействия АДФ с ионным каналом, оказывающим влияние на фосфолипазу C, что приводит к активации и изменению формы тромбоцитов. Исходя из этого, можно предположить, что соединение Sbt-828 не оказывает влияния на активацию тромбоцитов, сопровождающуюся изменением их формы.

$P2Y_{12}$ - рецептор тромбоцитов играет ключевую роль в агрегации тромбоцитов и продукции TXA_2 [Nawarskas J.J., 2011]. Соединение Sbt-828 проявило высокую ингибирующую активность в концентрации 1 мкМ в отношении агрегации тромбоцитов, вызванной активацией $P2Y_{12}$ -рецепторов. При этом новое производное индола превосходило эффект неселективного ингибитора этого подтипа АДФ-рецепторов вещества PPADS, что может указывать на способность вещества вызывать активацию аденилатциклазного пути.

Одним из важнейших механизмов агрегации тромбоцитов является изменение баланса продуктов метаболизма арахидоновой кислоты простациклина (PGI_2) и TXA_2 . TXA_2 является продуктом циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты с выраженными проагрегантными и вазоконстрикторными свойствами. При тромбозах происходит повышение количества TXA_2 , а PGI_2 быстрее инактивируется [Hanson J., 2005]. Обнаружение в тромбоцитах значительного количества МДА является доказательством повышения синтеза TXA_2 . При проведении экспериментов было показано, что вещество Sbt-828 достоверно снижало уровень МДА в тромбоцитах крыс, стимулированных тромбином, и превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 1,6 раза (табл. 8.3).

Таблица 8.3.

Влияние соединения Sbt-828 и ацетилсалициловой кислоты на изменение уровня МДА в тромбоцитах крыс, индуцированных тромбином. (25 ед/мл).

Название вещества	Дозы соединений, мг/кг	Уровень МДА в интактных тромбоцитах (отн. ед)	Уровень МДА в тромбоцитах после индукции тромбином (отн. Ед)
Контроль		$1,68 \pm 0,11$	$6,61 \pm 0,47$
Sbt-828	42	$1,63 \pm 0,1$	$1,93 \pm 0,11^*$
Аспирин	192	$1,45 \pm 0,5$	$3,02 \pm 0,46^*$

Примечание: *- $p < 0,01$ – изменения достоверны по отношению к группе контрольных животных

Известным фактом является то, что стенки сосудов артерий содержат значительно больше простагличина – мощного антиагрегационного фактора, чем другие ткани [Lyu D., 2010], который обладает высокой антитромбогенной активностью. Однако при нервном напряжении и стрессе в кровотоке выделяется адреналин, который повышает тромбогенный потенциал крови и является эндогенным ингибитором антиагрегационной активности простагличина [Moscardó A., 2011]. Поэтому, было изучено, влияние адреналина на способность аорты крыс угнетать процессы агрегации тромбоцитов и действие соединения Sbt-828 на антиагрегационную активность сосудистой стенки, сниженную адреналином. При поведении эксперимента было показано, что стенка аорты крыс высвобождает в инкубируемую среду фактор, который по действию подобен простагличину. При внутривенном введении адреналина уменьшалась антиагрегационную активность стенки аорты, что может увеличивать риск возникновения тромбоза.

Из литературных источников известно, что ацетилсалициловая кислота способна снижать синтез простагличина эндотелием сосудов [Лупанов, 2009]. В сравнении с ней вещество Sbt-828 не влияло на образование простагличина стенкой аорты интактных животных, но восстанавливало ее антиагрегационную

функцию, которая снижалась при введении адреналина. Полученные результаты подтверждают способность нового производного индола подавлять продукт циклооксигеназной реакции TXA_2 , не влияя при этом на простациклин, вырабатываемый сосудистой стенкой.

Результатом всех процессов, которые происходят при активации и агрегации тромбоцитов по различным механизмам действия, является повышение уровня кальция в тромбоцитах [Colomer J., 2010]. Важную роль в регуляции функции тромбоцитов играет внутриклеточный Ca^{2+} [Harper A.G., 2009]. При изменении его уровня происходит активация или ингибирование ферментов, которые регулируют адгезию и секреторную активность тромбоцитов [Bergmeier W., 2009]. Поэтому было изучено влияние соединения Sbt-828 на уровень внутриклеточного и мембраносвязанного Ca^{2+} с использованием флуоресцентных зондов. Перед проведением эксперимента была выполнена оценка хелатирующей способности изучаемого вещества в сравнении с ЭГТА. Было выяснено, что данное вещество в отличие от ЭГТА не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах.

Для определения влияния соединения Sbt-828 на уровень внешнего и внутреннего кальция эксперименты были выполнены в два этапа как в присутствии, так и в отсутствие физиологических концентраций Ca^{2+} .

Прирост флуоресценции Fura-2/AM под действием тромбина, в присутствии внеклеточного Ca^{2+} указывает на суммарное повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} как за счет входа в клетку, так и за счет мобилизации его из внутриклеточных депо. Увеличение флуоресценции Fura-2/AM, вызванное тромбином при отсутствии внеклеточного Ca^{2+} , указывает на высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В качестве препаратов сравнения был изучен антагонист ионов кальция верапамил и ацетилсалициловая кислота.

Соединение Sbt-828 дозозависимо подавляло концентрацию внутриклеточного кальция в тромбоцитах в присутствии физиологических концентраций Ca^{2+} . Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота не оказывала эффекта и уменьшала прирост уровня внутриклеточного кальция [Введите текст]

всего на 1,7 % по сравнению со значениями, полученными в контроле. Другой препарат сравнения антагонист ионов кальция верапамил снижал уровень внутриклеточного кальция, уступая при этом веществу Sbt-828. Полученный эффект указывает на способность данного вещества и верапамила уменьшать суммарный прирост ионов Ca^{2+} за счет входа в клетку и мобилизации из внутренних источников.

На втором этапе экспериментов было изучено действие нового производного индола только на уровень внутриклеточного кальция, который высвобождается из внутриклеточных депо. Соединение Sbt-828 и верапамил в данном тесте оказались неэффективными, так как уровень внутриклеточного Ca^{2+} в пробе с данными веществами соответствовали значениям, полученным в контроле.

При повышении содержания ионизированного кальция в плазме крови происходит увеличение доли связанного главным образом, с карбоксильными группами белков и кислыми фосфолипидами клеточной мембраны кальция. Также повышается вероятность входа ионов в клетку [Stefanini L., 2010].

Новое производное индола при изучении его влияния на уровень мембраносвязанного кальция в тромбоцитах не проявило активности в отношении данного показателя.

Поддержание физиологического состояния гомеостаза обеспечивается балансом двух систем крови — свертывающей и противосвертывающей. Влияние лекарственных препаратов на сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз не всегда оказывается однонаправленным. При повышении тромбогенного потенциала крови в результате различных патологий возникает активация свёртывающей системы. Поэтому изучение влияния вещества на показатели коагулограммы — тромбиновое время, протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, уровень фибриногена [Баркаган З.С., Момот А.П., 1999] дает полное представление о состоянии свертывающей системы крови. При однократном введении соединения Sbt-828 не было получено статистически достоверных

[Введите текст]

изменений показателей коагулограммы, а именно тромбинового, протромбинового времени и уровня фибриногена. Наблюдаемое достоверное изменение АПТВ в группах животных, получавших Sbt-828, не превышали норму – 25 – 38с.

Полученные данные свидетельствуют о незначительном сдвиге в системе агрегатного состояния крови в сторону гипокоагуляции. Однако уровень этих изменений является незначимым, что дает возможность сделать вывод об отсутствии прямого антикоагулянтного эффекта у соединения Sbt-828 и

подтверждает влияние его именно на тромбоцитарно-сосудистый гемостаз.

Однако соединение Sbt-828 проявило выраженную фибринолитическую активность. В изученной дозе вещество достоверно снижало данный вид активности на 57,9%, по сравнению с исходными данными. Наличие у вещества Sbt-828 фибринолитической активности подтверждает выраженное антитромботическое действие соединения на модели системного адреналин-коллагенового тромбоза.

В результате изучения общетоксических свойств соединения Sbt-828 при его однократном внутрибрюшинном введении установлено что, данное вещество во всех изученных дозах практически не оказывало влияние на эмоциональное поведение животных и не вызывало развитие таких побочных эффектов как птоз и экзофтальм.

Начиная с дозы Sbt-828 100 мг/кг, были выявлены обратимые признаки поражения только со стороны центральной нервной системы (двигательная координация) и высшей нервной деятельности (поведенческие реакции). В дозе 150 мг/кг у животных отмечались выраженные симптомы общетоксического эффекта опытного вещества. Это подтверждается признаками повреждения центральной (угнетение мышечной координации и реактивности), а так же нарушением работы периферической (снижение рефлексов) и вегетативной (урежение дыхания, снижение ректальной температуры и болевой чувствительности) нервных систем.

[Введите текст]

Таким образом, на основании вышеизложенного в исследованиях *in vitro* были выявлены два наиболее активных соединения Sbt-815 и Sbt-828. Однако, в связи с тем, что вещество Sbt-815 не проявило антиагрегантной активности в опытах *in vivo* для дальнейшего, глубокого изучения данного вида активности на моделях экспериментальной патологии и механизма ингибирования агрегации тромбоцитов было выбрано вещество Sbt-828.

В результате экспериментального изучения показана высокая антитромботическая активность данного вещества при различных видах артериальных тромбозов, а также при экспериментальном сахарном диабете.

Проведенный экспериментальный анализ механизма действия вещества Sbt-828 показал его положительное влияние на различные звенья патогенеза агрегации тромбоцитов и фибринолитическую активность. Однако, наиболее выраженное действие изученное вещество оказало на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, блокируя агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой и коллагеном, а также снижая синтез тромбоксана A_2 , что указывает на его способность вмешиваться в циклооксигеназный путь агрегации тромбоцитов. Согласно литературным данным производные индола являются ингибиторами фермента циклооксигеназы и синтеза тромбоксана A_2 [Bhana N., 2001; Barillà F., 2013]. Исходя из этого, а также на основании полученных нами экспериментальных данных можно предположить, что механизм антиагрегантного действия нового производного индола соединения Sbt-828 связан с ингибированием фермента циклооксигеназы и соответственно образования TXA_2 . Также вклад в механизм антиагрегантного действия может вносить способность данного вещества в концентрации 1 мкМ ингибировать $P2Y_{12}$ рецепторы тромбоцитов.

Известные агнтиагрегантные средства такие, как, например, ацетилсалициловая кислота, клопидогрель и другие влияют только на один из путей активации тромбоцитов, поэтому их использование при артериальных тромбозах оказывается не всегда эффективным. В настоящее время на первое место в мире выступает концепция двойной антитромбоцитарной терапии, [Введите текст]

когда сочетают два препарата с различными механизмами действия. Поэтому влияние изученного соединения на две разные мишени патогенеза агрегации тромбоцитов, а также наличие у него фибринолитической активности может иметь важное значение для дальнейшего исследования фармакологических свойств соединения Sbt-828, что в будущем, возможно, приведет к изучению и созданию совершенно новых антиагрегантных средств с поливалентным механизмом действия.

ВЫВОДЫ

1. Производные индола в ряду замещенных амидов и аминокспиртов являются новым химическим классом антитромбогенных веществ.

2. В результате проведенного скрининга 29 соединений среди замещенных амидов и аминокспиртов ряда индола было выявлено высокоактивное соединение под шифром Sbt-828, превосходящее в исследованиях *in vitro* и *in vivo* препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту.

3. Антиагрегантная активность замещенных амидов ряда индола связана со строением заместителей и их сочетанием у атома углерода в положении 7. Наиболее высокую активность проявили соединения, имеющие в положении C⁷ диэтиламиноэтильный заместитель. У аминокспиртов ряда индола активность соединений определяется радикалами в положении N⁹. Наличие тиенилкарбоксиэтильного заместителя или его замена на метил-(n-бутил)-аминовый заместитель приводит к увеличению способности веществ ингибировать агрегацию тромбоцитов.

4. Наиболее активное соединение Sbt-828 по способности ингибировать процессы АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* превосходит препарат сравнения АСК в 16 раз и по условному терапевтическому индексу в 4,4 раза, а по влиянию на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов *in vivo* в 8,8 раза.

5. Вещество Sbt-828 оказывает выраженное антитромботическое действие на различных моделях артериальных тромбозов. На моделях тромбозов, индуцированных аппликацией хлорида железа(III) и электрического тока на сонную артерию крыс, соединение Sbt-828 - превосходит в 3,5 и 1,8 раза по активности ацетилсалициловую кислоту, а также предотвращает гибель 90% животных на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза на мышцах.

6. Соединение Sbt-828 при пероральном курсовом введении животным с экспериментальным аллоксановым диабетом оказывает антитромботическое

действие на модели артериального тромбоза, вызванное повреждением стенки артерий электрическим током, снижает вязкость крови, превосходя препарат сравнения пентоксифиллин.

7. Новое производное индола Sbt-828 в различной степени выраженности блокирует агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ, адреналином, арахидоновой кислотой, коллагеном, тромбином, агонистом тромбоксановых рецепторов U46619, оказывая наиболее выраженное действие в отношении агрегации, индуцированной арахидоновой кислотой.

8. Вещество Sbt-828 снижает уровень проагреганта и вазоконстриктора TXA_2 , превосходя препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, что подтверждается снижением количества МДА в условиях патологии *ex vivo*, вызванной тромбином, и не оказывает влияния на антиагрегационную активность сосудистой стенки.

9. Исследование общетоксикологических свойств соединения Sbt-828 показало, что начиная с дозы 100 мг/кг, наблюдались обратимые единичные признаки нарушения двигательной координации и поведенческих реакций. В максимально вводимой дозе соединения Sbt-828 (200 мг/кг) у животных регистрировались симптомы нейротоксического эффекта опытного вещества на дыхательный, терморегуляторный, болевой центры, а так же на нейродвигательную проводимость, что подтверждалось урежением дыхания, снижением ректальной температуры и болевой чувствительности, признаками угнетения мышечной координации и реактивности, а так же снижением рефлексов.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфорная кислота
АПТВ - активированное парциальное тромбопластиновое время
АСК - ацетилсалициловая кислота
АТФ - аденозинтрифосфорная кислота
АЦ - аденилатциклаза
ГП - гликопротеины
ДАГ - диацилглицерол
ИФ₃ - инозитол-1,4,5-трифосфат
МДА - малоновый диальдегид
ПГ - простагландины
ПГ₂ - простациклин
ПРВ - протромбиновое время
СД - сахарный диабет
ТБК - тиобарбитуровая кислота
ТВ - тромбиновое время
ТХУ - трихлоруксусная кислота
ТХА₂ - тромбоксан А₂
цАМФ - циклический аденозинмонофосфат
цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат
ЦОГ - циклооксигеназа
ФАТ - фактор активации тромбоцитов
ЭГТА - этиленгликольтетраацетат натрия
ЕС₅₀ - эффективная концентрация, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов на 50%
ЕD₅₀ - эффективная доза, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов на 50%
РАР - протеазо-активированные рецепторы
Sbt- лабораторный шифр соединения
U 46619 - агонист тромбоксановых рецепторов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адиб, Ал Амуш Влияние катионов на агрегацию тромбоцитов /Адиб Ал Амуш, Берест В.П., Гаташ С.В., Перский С.Е. //Вестник Харьковского национального университета.-2006.-3.-С.5-9.
2. Баркаган З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / Баркаган З.С., А.П. Момот //М.: «Ньюдиамед» – 1999. – 285с.
3. Бокарев, И.Н. Противотромбоцитарная терапия в клинической практике /Бокарев И.Н. //Методические рекомендации. Под ред. проф.И.Н.Бокарева.- Москва.-2007.-34с.
4. Бубнова, М.Г. Аспирин в профилактике атеротромбоза и коронарной болезни сердца /Бубнова, М.Г. //Российский кардиологический журнал.- 2010.-№4.-С.115-120.
5. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения /Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. //М: «Высшая школа» – 1991.–400с.
6. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Т.Л. Неробкова //Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ – 2-изд., перераб и доп. Под общ. ред. Р.У. Хабриева.– М.: Медицина – 2005. – С.277-295.
7. Воронина, Е.Н. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм /Воронина Е.Н., Филиппенко М.Л., Сергеевичев Д.С., Пикалов И.В. // Вестник ВОГиС.-2006.-Т10.-№3.-С.553-564.
8. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов /Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилова И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. //Лабораторное дело. - 1989. - №10. - С.15-18.
9. Гиляревский, С.Р. Альтернативные подходы к применению двухкомпонентной антиагрегантной терапии у больных с острым

- коронарным синдромом; доказательства, рекомендации и реальная практика/ Гиляревский С.Р., Орлов В.А., Кузьмина И.М., Ларин А.Г.// Рациональная фармакотерапия в кардиологии.- 2012.-№4.-С. 531-537.
10. Голухова, Е.З. Современные аспекты антиагрегантной терапии / Голухова Е.З.,Рябинина М.Н. //Креативная кардиология.-2013.-№1.-С.45-58.
 11. Грица, Г.В. Резистентность к аспирину у больных с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу /Грицан Г.В., Ольховский И.А., Столяр М.А., Косницкая Ю.В. // Сибирское медицинское обозрение.- 2013.- 4.-С.19-23.
 12. Дедов, И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнениях /Дедов И.И.// Сахарный диабет.- 2013.- № 3 (60).- С. 4-11.
 13. Дедов, И.И. Значимость результатов исследования ADVANCE для контроля Сахарного диабета в России /Дедов И.И., Шестакова М.В. // Журнал Сахарный диабет.-2009.-№2.-С.4-5.
 14. Добровольский, Н.А. Анализатор вязкости крови / Н.А. Добровольский, Ю.М. Лопухин, А.С. Парфенов и др. // Реологические исследования в медицине: Сб. науч. тр. - М.: НИЦХ РАМН, 1998. – С.45-51.
 15. Добровольский, А.В. Клопидогрел в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы /Добровольский, А.В. //Русский медицинский журнал.- 2009.-№8.-С.558-570.
 16. Дудченко, Г.П. Поиск и изучение антидиабетических веществ среди новых производных бензимидазола: дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н.: 14.03.06/ Дудченко Галина Петровна – Волгоград, 1989.- 169 с.
 17. Кадыков, А.С. Антиагрегантная терапия в первичной и вторичной профилактике ишемического инсульта /Кадыков А.С., Шахпаронова Н.В., Кадыков А.В.//Cardiosоматика.- 2013.- №3.-С.38-41.
 18. Козловский, В.И. Применение кишечнорастворимых форм ацетилсалициловой кислоты у пациентов с высоким риском:

- целесообразность и безопасность /Козловский В.И., Сероухова О.П., Дубас И.О., Селезнева О.М. //Кардиология в Беларуси.- 2012.- 1.- С.90-97.
19. Кубатиев, А.А. Нарушения тромбоцитарного гемостаза при артериальной гипертензии и возможности коррекции этих нарушений при помощи ИАПФ /Кубатиев А.А., Автандилов А.Г., Рудько И.А., Джамелашвили С.В. //Патогенез.- 2004.- Т. 2. -№ 2. -С. 12-17.
 20. Кудряшова, М.В. Коррекция реологических свойств крови и свободно-радикальных процессов у пациентов с инфарктом миокарда в комбинации с сахарным диабетом II типа /Кудряшова М.В., Довгалик Ю.В., Мишина Л.Е. и др. //Кардиология.-2010.-50(5).-С.9-12.
 21. Кучерявенко, А.Ф. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений /Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Косолапов В.А, Анисимова В.А. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2013.-Т.155.- №6.-С.740-743.
 22. Люсов, В.А. Метод графической регистрации агрегации тромбоцитов и изменения ее при ишемической болезни сердца /В.А. Люсов, Ю.Б. Белоусов //Кардиология. – 1971. - №8. – С.459-461.
 23. Макаров, В.А. Характеристика лекарственных средств для коррекции системы гемостаза /Макаров В.А., Дрозд Н.Н., Белозерская Г.Г., Петрухина Г.Н. /Очерки по производственной и клинической трансфузиологии //под. ред. А.И.Воробьева — М. : [Ньюдиамед].- 2006.-С. 374-382.
 24. Макаров, В.А. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М. и др. под общей редакцией Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012.- 944с.
 25. Мандель И. Д. Кластерный анализ / И. Д. Мандель. – М.: Финансы и статистика, 1988. – 176 с.
 26. Мельникова, Е. Патология гемостаза и системная воспалительная реакция у пациентов с ишемическим инсультом /Мельникова Е., Кадинская М.,

- Герасименко Д., Ефимова И., Шмонин А., Тишков А., Гладской А. //Врач.- 2011.- №14.-С.15-18.
27. Мирзоян, Р.С. Нимодипин и сочетанные нарушения мозгового и коронарного кровообращения в экспериментах /Мирзоян Р.С, Хайлов Н.А., Цорин И.Б., Ганьшина Т.С. //Эксперим. и клин. фармакол.- 2009.- №2.-С.24-28.
 28. Мишалов, В.Г. Антиагреганты в терапии хронической ишемии нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом (обзор рандомизированных исследований) /Мишалов В.Г., Литвинова Н.Ю.// Хирургия Украины.- 2012.-№2.-С.067-072.
 29. Муравьев, А.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови) /Муравьев А.В., Чепоров С.В.// Монография.-Ярославль: Изд.-во ЯГПУ.-2009.-178с.
 30. Мурина, М.А. Противотромботическая активность N,N-дихлортаурина in vivo на модели тромбоза у мышей /Мурина М.А. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2002.-Т.134.-№7.-С.44-47.
 31. Никонов, В.В. Тромбоцитарный гемостаз и антитромбоцитарная терапия при остром коронарном синдроме /Никонов В.В., Киношенко Е.И. //Медицина неотложных состояний.-2008.-№3.-С.109-120.
 32. Парфенов, В.А. Тиклопидин во вторичной профилактике ишемического инсульта /Парфенов В.А., Бутко Д.Ю., Белова А.Н., Котельникова Т.Н. //Consilium medicum.-2006.-№8.-С.46-49.
 33. Парфенов А.С. Анализатор крови реологический АКР-2. Определение реологических свойств крови (Метод. Рекомендации) /Парфенов А.С., Пешков А.В., Добровольский Н.А. //НИИ Физико-химической медицины. Москва.-1994.-С.15.
 34. Петров В.И. Фармакоэкономический анализ эффективности комплексной терапии Сахарного Диабета 2-го типа /Петров В.И. Рогова Н.В., Михайлова Д.О. //Вестник ВолГМУ.-2010.-Т.33.-№1.-С.28-32.

35. Плотников, М.Б. Влияние комплекса ацетилсалициловой кислоты и диквертина на агрегацию тромбоцитов и гемореологические параметры у крыс с ишемией головного мозга /Плотников М.Б., Ямкин А.В., Алиев О.И., Тюкавкина Н.А. //Экспериментальная и клиническая фармакология.-2005.- Т.68.-№2.-С33-35.
36. Рока-Мойя, Я.М. Новые аспекты агрегации тромбоцитов /Рока-Мойя Я.М., Билоус В.Л., Жерносеков Д.Д., Гриненко Т.В. // Biopolymers and cell.-2014.-№1.-С.10-15.
37. Сакаев, М.Р. Изучение влияния некоторых синаптотропных веществ на тромбоцитарную активность: дис. канд. биол. наук: 14.00.25 /Сакаев Марат Рустамович. – СПб., 2000. – 115с.
38. Саноцкий, И. В. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений /И. В. Саноцкий, И. П. Уланова //М.: «Медицина» – 1975. – 328 с.
39. Скотников, А.С. Кардиомагнил — золотой стандарт профилактики в кардиологии /Скотников А.С., Прохорович Е.А., Петрик Е.А. // Врач скорой помощи.- 2011.- 2.-С.5-10.
40. Спасов, А.А. Синтез и биологическая активность 9-диалкиламиноэтил-2-окси(диокси)фенилимидазо-[1,2-а]бензимидазола /Спасов А.А., Косолапов В.А., Анисимова В.А. и др. //Химико-фармацевтический журнал.-2006.- №10.-С3-10.
41. Спасов, А.А. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений/ Спасов А.А., Кучрявенко А.Ф., Косолапов В.А., Анисимова В.А.// Бюлл. Экспериментальной биологии и медицины.-2013.-Т.155.-№6.- С.740-742.
42. Спасов, А.А. Кальций-зависимый механизм антиагрегантного действия соединения РУ-891 /Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А.// Экспериментальная и клиническая фармакология.-2014.-№3.-С.16-19.
43. Сулимов, В.А. Клиническая значимость резистентности к антитромбоцитарным препаратам при стентировании коронарных артерий

- /Сулимов В.А., Мороз Е.В. //Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.- 5.- 2012.- 3.-С.9-12.
44. Суслина, З.А. Влияние ацетилсалициловой кислоты в комплексе с липидными наноструктурами различного состава на агрегацию тромбоцитов человека /Суслина З.А., Прохоров Д.И., Шилова А.Г., КаплунА.П., и др. //Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2011.-№ 5.-С.31-34.
 45. Толпыгина, С.Н. Применение ацетилсалициловой кислоты с целью первичной и вторичной профилактики у пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений /Толпыгина С.Н., Марцевич С.Ю., Киселева Н.В., Хосева Е.Н. //Сердце: журнал для практикующих врачей.- 2011.- 6 -С.358-365.
 46. Тюренков, И.Н. Влияние лизиноприла на вазодилатирующую и антитромбическую функцию эндотелия при сахарном диабете /Тюренков, И.Н., Воронков А.В. //Врач. – 2011. - №2. – С. 35-37.
 47. Тюренков, И.Н. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета /Тюренков И.Н., Воронков А.В., СлиецансА.А. //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2013.- № 2.- С. 80-84.
 48. Фролова, Н.С. Резистентность к клопидогрелу у больных с острым коронарнымсиндромом /Фролова Н.С., Шахнович Р.М., Сироткина О.В., Добровольский А.Б., Руда М.Я. //Терапевтический архив.- 2010.- 8.-С.4-20.
 49. Фролова, Н.С. Резистентность к аспирину у больных с острым коронарным синдромом. Часть2 /Фролова Н.С., Шахнович Р.М., Казначеева Е.М., Сироткина О.В., Добровольский А.Б.// Кардиоваскулярная терапия и профилактика.-2011-2.-С.47-52.
 50. Чазов, Е.И. Пути снижения смертности от сердечно-сосудистых заболеваний/ Чазов Е.И. // Терапевтический архив.-2008.- № 8.-С.11.
 51. Чарная, М.А. Современные антиагрегантные препараты и их применение в клинике/ Чарная М.А.,Морозов Ю.А // Болезни аорты и ее путей.-2009.-№1.- С.34-40.

52. Adewall, S. Oral antiplatelet agents in ACS: from pharmacology to clinical difference /Adewall S., Badimon L., Drouet L. [et al.] //Fundam. Clin. Pharmacol.- 2011.-25(5).-P.564-71.
53. Anisimova, V.A. Synthesis and pharmacological activity of amides of 2-amino-3-indolylacrylic acid /Anisimova V.A., Spasov A.A., Yakovlev D. S., Suzdalev K. F., Kosolapov V. A. [et al.] //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2013.- №10.- P.584-590.
54. Arikawa, E. Effects of endothelin receptor blockade on hypervasoreactivity in streptozotocin-diabetic rats: vessel-specific involvement of thromboxane A2 /Arikawa E, Cheung C., Sekirov I. [et al.] //Can.J Physiol.Pharmacol.-2006.-84(8-9).-P.823-833.
55. Aror, R.R. Antiplatelet intervention in acute coronary syndrome / Arora R.R., Rai F. //Am. J. Therapy.- 2009.- №5.-P.29-40.
56. Barillà, F. Clopidogrel plus indobufen in acute coronary syndrome patients with hypersensitivity to aspirin undergoing percutaneous coronary intervention /Barillà F., Pulcinelli F.M., Mangieri E. [et al.]//Platelets.- 2013.-24(3).-P.183-8.
57. Baruch, D. Platelet-vessel wall interactions / Baruch D. //Therapie.-2006.-5.-P.371-378.
58. Bassand, J.P. Novel oral anticoagulants in acute coronary syndrome: re-evaluating the thrombin hypothesis /Bassand J.P. //EuroIntervention.- 2014.- 9(11).-P.1333-41.
59. Bell, M.R. Antihypertensive activity of 7-azoindole-3-acetamidoxime and indole-1-acetadoxime /Bell M.R., Hoppe J.O., Lape H.E. [et al.] //Cellular and molecular life science.-1967.- 23(4).-P. 295-297.
60. Bergmeier, W. Novel molecules in calcium signaling in platelets / Bergmeier W., Stefanini L. //J. Thromb Haemost.-2009.-1.-P. 187-190.
61. Bernlochner, I. Thienopyridines and other ADP-receptor antagonists / Bernlochner I., Sibbing D. //Handb. Exp. Pharmacol.- 2012.- (210).-P.165-98.

62. Bhana, N. Indobufen: an updated review of its use in the management of atherothrombosis /Bhana N., McClellan K.J. //Drugs Aging.- 2001.-18(5).-P.369-88.
63. Biswal, S. Indole: The molecule of diverse biological activities /Biswal S.,Sahoo U., Setty S. Kumar H.K.S., Banerjee M. //Asian J. Pharm. Clin. Res.- 2012.-15(1).-P. 1-6.
64. Bluteau, D., Lordier L., Di Stefano A., Chang Y., Raslova H., Debili N., Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation /Bluteau D., Lordier L., Di Stefano A., Chang Y., Raslova H., Debili N., Vainchenker W. //J. Thromb. Haemost.-2009.-7.-P.227-34.
65. Brass, L.F. Novel therapeutic targets at the platelet vascular interfase /Brass L.F., Zhu L, Stalker T.J. //Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.-2008.-P.43-50.
66. Broos, K. Platelets at work in primary hemostasis / Broos, K., Feys H.B., De Meyer S.F //Blood Rev.-2011.-25(4).-P155-67.
67. Caen, J. Blood platelets /Caen J., Bellucci S. //Bull Acad. Natl. Med.-2014.-197(2).- P.343-7.
68. Caswell, A.H. Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate /Caswell A.H., Hutchison J.D. //Biochem. Biophys. Res Commun.-1971.-43(3).-P. 625-30.
69. Cattaneo, M. Resistance to anti-platelet agents /Cattaneo M. //Thromb Res.-2011.-3.-P.61-63.
70. Chougale, A. Optimization of alloxan dose is essential to induce stable diabetes for prolonged period /Chougale A., Panascar S., Gurao P. [et a.] //Asian J. of Biochemistry.-2007.-2.-P.402-408.
71. Coccheri, S. Antiplatelet drugs-do we need new options? With a reappraisal of direct thromboxane inhibitors, /Coccheri S., //Drugs.-2010.-7.-P.887-908.
72. Colomer, J. Identification and inhibitory properties of a novel Ca^{2+} /Calmodulin antagonist /Colomer J., Allison A., Schmitt E. [et al.] // Biochemistry.-2010.-49.-P.4244-4254.

73. Cosemans, J.M. Key role of glycoprotein Ib/V/IX and von Willebrand factor in platelet activation-dependent fibrin formation at low shear flow /Cosemans J.M., Schols S.E., Stefanini L. [et al.] //Blood. – 2011.-117(2).-P.651-60.
74. Coughlin, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology /Coughlin, S.R. //J. Thromb. Haemost.- 2005.-3.-P.1800–1814.
75. Cryer, B. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment /Cryer B., Mahaffey K.W. //J. Multidiscip Healthc.- 2014.-7.-P.137-46.
76. De Luca, G. Risk profile and benefits from Gp IIb-IIIa inhibitors among patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty: a meta-regression analysis of randomized trials /De Luca G., Navarese E., Marino P. //Eur. Heart J.-2009.-30(22).-P.2705-2713.
77. DiMinno, G. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol / DiMinno G., Silver M.J.// J. Pharmacol. Exp. Ther. -1983.- 225(1).- P.57-60.
78. Dogne, J.M. Pharmacological characterization of N-tert-Butyl-N-[2-(4-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-5730, a novel Thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time / Dogne J.M., Hanson J., Leval X. [et al.] //J. of Pharmacol. And Exp. Therap.- 2004.-309.- P.498-505.
79. Dragani, A. The contribution of cyclooxygenase-1 and -2 to persistent thromboxane biosynthesis in aspirin-treated essential thrombocythemia: implications for antiplatelet therapy /Dragani A., Pascale S., Recchiuti A. [et al.] //Blood.- 2010.-5.-P.1054-1061.
80. Dubey, P.K.. Synthesis of indole derivatives as potential COX-2 inhibitors / Dubey P.K., Kumar V.T. //Ind J. Chem. – 2006.- 45B.-P. 2128-2132.
81. Duerschmied, D. The role of serotonin in haemostasis /Duerschmied D., Bode C.// Hamostaseologie. -2009.-29(4).-P.356-359.

82. Elenga, A. The role of salt regime and modulation hemorheological effects trental in experimental heart failure /Elenga A., Strigol S.Y., Nazarov D.B., Nanaimo K. //Experimental and clinical pharmacology.- 2002.- 65(1).-P.37-40.
83. Fiedler, K.A. Randomised, double-blind trial on the value of tapered discontinuation of clopidogrel maintenance therapy after drug-eluting stent implantation. Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: CAUTION in Discontinuing Clopidogrel Therapy - ISAR-CAUTION /Fiedler K.A., Mehilli J., Kufner S., Schlichting A., [et al.] //Thromb. Haemost.-2014.- 111(6).-P.1041-9.
84. Floyd, C.N. Mechanisms of aspirin resistance /Floyd C.N., Ferro A. //Pharmacol. Ther.- 2014.-141(1).-P.69-78.
85. Frederich, M. Potential antimalarial activity of indole alkaloids /Frederich M., Tits M., Angenot L. //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.-2008.- 102.-P 11—19.
86. Gachet ,C. Regulation of platelet functions by P₂ receptors /Gachet C. //Annual Review of Pharmacology and Noxicology.-2006.- Vol.46.-P. 277-300.
87. Garcia, A. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in platelet aggregation and thromboxane A₂ generation mediated by Gi signaling pathways /Garcia A., Kim S., Bhavaraju K. [et al.] // Pharmacology.-2010.-429 (2).-P.369-367.
88. Geraldo, R.B. Antiplatelet activity and structure-activity relationship study of Pyrazolopyridine Derivatives as potential series for treating thrombotic/ Geraldo R.B., Bello M.L., Dias L.R. [et al.] // J. Atheroscler. Throb.-2010.-17(7).-P.730-739.
89. Gratacap, M. The new tyrosine-kinase ingibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo /Gratacap M., Martin V., Valera M. [et al.] //Blood.-2009.-№9.-P.1884-1892.
90. Gudipati, R. Synthesis, characterization and anticancer activity of certain 3-{4-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazole-2-yl)phenylimino}indolin-2-one derivatives /Gudipati R., Anreddy R.N., Manda S. //Saudi Pharm. J.- 2011.-19(3).-P:153-8.

91. Guglielmi, G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience /Guglielmi G, Viñuela F, Dion J, Duckwiler G. //J. Neurosurg. -1991.- 75(1).- P.8-14.
92. Guidetti, G.F.. The Gi-coupled P2Y₁₂ receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets /Guidetti G.F., Lova P., Bernardi B. [et al.] //J Biol Chem.- 2008.-43.-P.28795-28805.
93. Gupta, A.K. Synthesis and in vitro antioxidant activity of new 3-substituted-2-oxindole derivatives /Gupta A.K., Kalpana S., Malik J.K. //Indian J. Pharm. Sci. - 2012.- 74(5).-P:481-6.
94. Hagedom, I. Arterial thrombus formation. Novel mechanisms and targets / Hagedom I., Vogtle T., Nieswandt B. //Hemostaseologie.-2010.- 30(3).- P.127-135.
95. Hanson, J. In vitro and in vivo pharmacological characterization of BM-613, a novel dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist /Hanson J.,Rolin S.,Reynaud D. [et al.] //J. Pharmacol. Exp. Ther.-2005.- 313(1).-P.293-301.
96. Harper, A.G. A key role for dense granule secretion in potentiation of the Ca²⁺ signal arising from store-operated calcium entry in human /Harper A.G., Mason M.J., Sage S.O. //Cell Calcium.-2009.-45.-P.413-420.
97. Harrison, P. Platelet alpha-granules /Harrison P., Cramer E.M. // Blood Rev.- 1993.-7(1).-P.52-62.
98. Hass, W.K. A randomized trial comparing ticlopidin hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high risk patients /Hass W.K., Easton J.D., Adams HPJ. // N. Eng. J. Med.- 1989.- 321.-P.501-507.
99. Hiari-Al, Y. Synthesis and antibacterial activity of some substituted 3-aryl and 3-heteroaryl indole /Hiari-Al Y., Qaisi M A., Abaddah-El M. //Monatshefte fur Chemical.-2006.-137.-P. 243-248.
- Jennings, L.K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis /Jennings L.K. //Thromb Haemost.-2009.- 102(2).-P.248-57.

100. Holinstat, M. Protease-activated receptors differentially regulate human platelet activation through a phosphatidic acid-dependent pathway /Holinstat M., Voss B., Bilodeau M.L., Hamm H.E. //Mol. Pharmacol.-2007.-3.-P.686-694.
101. Irwin, S. Determination of variability in drug response / S. Irwin // Psychosomatics. – 1964. – V.5. – P. 174 -179.
102. Ishii, H. Platelets, coagulation, and fibrinolysis in atherosclerosis formation / Ishii H, Yoshida M. //Nippon Rinsho.-2011.- 69(1).- P.50-54.
103. Jennings, L.K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis /Jennings L.K. //Thromb. Haemost.-2009.- 102(2).-P.248-57.
104. Jensen, B.O. Dipyridamole synergizes with nitric oxide to prolong inhibition of thrombin-induced platelet shape change /Jensen B.O., Kleppe R., Kopperud R. [et al.] //Platelets.-2011.-22(1).-P.7-18.
105. Kastrati, A. Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR(React 2 randomized trial /Kastrati A., Mehilli J., Neumann F.J., [et al.] // JAMA. - 2006.- 295 (13).-P.1531-1538.
106. Kenngott, S. Clopidogrel and proton pump inhibitor (PPI) interaction: separate intake and a non omeprazole PPI the solution /Kenngott S., Olze R., Kolmer M. [et al.] //Eur. J. Med. Res.-2010.-5.-P.220-224.
107. Kim, S. P2Y₁₂ receptor in platelet activation /Kim S, Kunapuli S.P. //Platelets.- 2011.-1.-P.54-58.
108. Krotz, F. Antiplatelet drugs in cardiological practice: Established strategies and new developments / Krotz F., Sohn H.Y.,Klauss V. //Vasc. Health. Risk Manag.- 2008.-4(3).-P.637-645.
109. Kuo, H.L. NP-184[2-(5-methyl-2-furyl benzimidazole], a novel orally active antithrombotic agent with dual antiplatelet and anticoagulant activities /Kuo H.L., Lien J.C., Chang C.H. [et al.] //Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.-2010.- 6.- P.495-505.

110. Kurz, K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride / Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E. //Thromb.Res. -1990. -15.- P.269-280.
111. Lanas, A. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations /Lanas A, Garcia-Rodrigues L.A. Arroyo M.T. [et al.] //Gut-2006.-12.-P.1731-1738.
112. Laube, M. Carbaborane-3-phenyl-1H-indoles--synthesis via McMurry reaction and cyclooxygenase (COX) inhibitionactivity /Laube M., Neumann W., Scholz M., Lönnecke P., Crews B. [et al.] //Chem. Med. Chem.- 2013.-8(2).-P:329-35.
113. Legrand, V. Platelet reactivity and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in patients with stable coronary artery disease: the Stent Thrombosis In Belgium (STIB) trial /Legrand V., Cuisset T., Chenu P. [et al.] //EuroIntervention. -2014.-10(2).-P.204-11.
114. Lenoc, L. Mathematical model of PAR1-mediated activation of human platelets /Lenoci L., Duvemay M. Satchell S. [et al.] //Mol. Biosyst.-2011.-7(4).-P.1129-37.
115. Li, G. Feasibility of monitoring clopidogrel resistance with flow cytometric analysis of platelet vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation /Li G., Luo Y., Luo Y., Lin T. [et al.] //Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.- 2014.-34(3).-P.434-7.
116. Lombo, B. Ticagrelor: the evidence for its clinical potential as an oral antiplatelet treatment for the reduction of major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndromes /Lombo B., Díez J.G. //Core Evid.- 2011.-6.-P.31-42.
117. Lopes, R. Antiplatelet agents in cardiovascular disease /Lopes R. //J. Thromb. Thrombolysis.-2011.-3.-P.306-309.
118. Lyu, D. The role of prostanoid receptors in mediating the effects of PGE(20 on human platelet function /Lyu D., Glenn J.R., White A.E. [et al.] //- 2010.-5.-P.329-342.

119. Ma, T.K. Impact of genetic and acquired alteration in cytochrome P450 system on Pharmacologic and clinical response to clopidogrel /Ma T.K., Lam Y.Y., Tan V.P. [et al.] //Pharmacol. Ther.-2010.-2.-P.249-259.
120. Ma, H. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3) /Ma H., Hara A., Xiao C.Y. [et al.] //Circulation .-2001.-104.-P.1176-1180.
121. Madan, R. Coagulation profile in diabetes and its association with diabetic microvascular complications / Madan R., Gupta B., Saluja S. [et al.] //JAPI.-2010.-58.-P.481-484.
122. Maloney, S.F. P2Y₁₂ or P2Y₁ inhibitors reduce platelet deposition in a microfluidic model of thrombosis while apyrase lacs efficacy under flow conditions /Maloney S.F., Brass L.F., Diamond S.L. //Integr.Biol.-2010.-2(4).-P.183-192.
123. Mahaut-Smith, M.P., Evans R.J. The P2X₁ receptor and platelet function /Mahaut-Smith M.P., Evans R.J. //Purinergic Signal.-2011.- 7(3).-P.341-56.
124. Maree, A.Q. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease / Maree A.Q. , Fitzgerald D.J. //Circulation.-2007.-115.-P.2196-2207.
125. Margarucci, L. Collagen stimulation of platelets induces a rapid spatial response of cAMP and cGMP signaling scaffolds /Margarucci L, Roest M, Preisinger C et al. //Mol Biosyst.-2011.-7(7).-P.2311-2319.
126. Marino, M. Cangrelor: Review of the Drug and the CHAMPION Programme (Including PHOENIX) /Marino M., Rizzotti D., Leonardi S. //Curr. Cardiol. Rep.-2014.-6.-P.493.
127. Mashayekhi, V. Synthesis of novel indole hydrazone derivatives and evaluation of their antiplatelet aggregation activity /Mashayekhi V., Haj Mohammad Ebrahim Tehrani K., Amidi S., Kobarfard F. //Chem. Pharm. Bull (Tokyo).- 2013.-№2.-P:144-50.
128. McNicol, A., Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis /McNicol A., Israels S.J. //Thromb. Res.- 1999.-95(1).-P.1-18.

129. Mehta, D.S. Synthesis and biological screening of some new indole derivatives /Mehta D.S., Sikotra K.H., Shah H.V. // Ind. J. Chem. -2005.- 44.-P:2594-2597.
130. Meyer, D. von Willebrand factor: structure and function /Meyer D., Piétu G., Fressinaud E., Girma J.P. //Mayo Clin. Proc.-1991.-66(5).-P.516-23.
131. Michelson, A.D. Platelet function testing in cardiovascular diseases/ Michelson A.D. //Circulation.-2004.-110.-P.489–493.
132. Morel O., Kessler L., Ohimann P. Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis /Morel O., Kessler L., Ohimann P. // Atherosclerosis.-2010.-2.-P.367-376.
133. Morini, S. Does dual antiplatelet therapy always require gastroprotection? Gastroprotection with proton pump inhibitors is advisable for all patients who need dual antiplatelet therapy /Morini S., Zollo A. //G. Ital . Cardiol (Rome).- 2010.-6.-P.488-492.
134. Moscardó, A. Residual cyclooxygenase-1 activity and epinephrine reduce the antiplatelet effect of aspirin in patients with acute myocardial infarction /Moscardó A, Santos MT, Fuset MP, Ruano M, Vallés J. //Thromb.Haemost.- 2011.-105(4).-P.663-669.
135. Muravyov, A.V. Hemorheology (experimental and clinical aspects of blood rheology) /Muravyov A.V., Cheporov S.V. //Monograph.-Yaroslavl: Ed.-in YSPU. 2009 (in Russian).Natarajan, A. Platelet hyperactivity n type 2 diabetes: role of antiplatelet agents /Natarajan A.,Zaman A.G. Marshal S.M. //Diab.Vasc. Dis Res.-2008.-5(2).-P.138-144.
136. Nagy, B. Jr. Contribution of the P2Y₁₂ receptor-mediated pathway to platelet hyperreactivity in hypercholesterolemia /Nagy B. Jr., Jin J., Ashby B., Reilly M.P., Kunapuli S.P. //J Thromb Haemost.- 2011.- 9(4).-P.810-819.
137. Natarajan, A. Platelet hyperactivity n type 2 diabetes: role of antiplatelet agents / Natarajan A., Zaman A.G. Marshal S.M. //Diab.Vasc. Dis Res. 2008; 5 (2):138-144.
138. Nawarskas, J.J. Ticagrelor: a novel reversible oral antiplatelet agent /Nawarskas J.J., Nawarskas J.J., Clark S.M. //Cardiol. Rev.- 2011 -2.-P.95-100.

139. Niitsu, Y. Repeat oral dosing of prasugrel, a novel P2Y₁₂ receptor inhibitor, results in cumulative and potent antiplatelet and antithrombotic activity in several animal species / Niitsu Y., Sugidachi A., Ogawa T. //Europ. J. of Pharmacol.-2007.-28.-P.276-282.
- Nilsson, T. Mass spectrometry in high-throughput proteomics ready for big time /Nilsson T., Mann M., Aebersold R. [et al.] //Nature Methods.-2010.-№9.-P.681-685.
140. Nishiya, Y. Comparison of mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1C19 by ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel /Nishiya Y., Hagihara K., Kurihara A. [et al.] //Xenobiotica.-2009.-11.-P.836-843.
141. Nofal, Z.M. Novel benzimidazole derivatives as expected anticancer agents / Nofal Z.M., Soliman E.A., Abd El-Karim S.S. [et al.] //Acta Pol. Pharm.-2011.-68(4).-P.519-534.
142. Palomo, I. The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis (Review) /Palomo I., Toro C., Alarcón M. //Mol. Med. Rep.- 2008.-1.-P.179–184.
143. Pellaton, C. Cardiology. Platelet function testing for clinicians /Pellaton C., Eeckhout E., Silvain J. [et al.] //Rev. Med. Suisse.- 2014.-10.-P.24-31.
144. Pinon, J.F. In vivo study platelet aggregation in rats /Pinon J.F. //J. Pharmacol. Meth. 1984. Vol.12. P.79-84.
145. Postula, M. Factors responsible for «aspirin resistance» - can we identify them? /Postula M., Tarchaiska-Krynska B., Filipiak K.L. //Kardiol. Pol.- 2010.-№4.-P.403-411.
146. Prakasam, T. Synthesis and anti-inflammatory activity of indole derivatives / Prakasam T., Mahalaxmi S., Perumal P.T. //J. Chem. Sci.- 2010.- 122(6).- S.819-832.
147. Randal J. Murine Models of Vascular Thrombosis / Randal J. Vestrick, Mary E. Winn, Daniel T. Eitzman // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.-27.-2007.-P.2079-2093.
148. Rangé, G. Thrombotic and bleeding events after coronary stenting according to clopidogrel and aspirin platelet reactivity: VerifyNow French Registry

- (VERIFRENCHY) /Rangé G., Yayehd K., Belle L., Thuairé C. [et al.] //Arch Cardiovasc Dis.-2014.-107(4).-P.225-35.
149. Rendu, F. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions /Rendu F., Brohard-Bohn B. //Platelets.-2001.-12(5).-P.261-73.
150. Resl, M. Diabetes and cardiovascular complications /Resl M., Clodi M. // Wien Med. Wochenschr.-2010.-160(1-2).-P.3-7.
151. Rivera, J. Platelets receptors and signaling in the dynamics of thrombu /Rivera J., Lozano M.L, Navarro-Nunes L. [et al.] // Hematologica .-2009.-94(5).-P.700-711.
152. Rivera, J. Platelets receptors and signaling in the dynamics of thrombus /Rivera J., Lozano M.L., Navarro-Nunes L. [et al.] //Hematologica .-2009.-94(5).-P.700-711.
153. Saluk, J.The formation, metabolism and the evolution of blood platelets /Saluk J., Bijak M., Ponczek M.B., Wachowicz B. //Postepy Hig Med. Dosw (Online).-2014.-10.-P.384-92.Saniabadi, A.R. Effect of dipyridamole alone and in combination with aspirin on whole blood platelet aggregation, PGI₂ generation, and red cell deformability ex vivo in man. / Saniabadi A.R. Fisher T.C., McLaren M. [et al.] //Cardiovasc. Res. -1991.-25(2).-P.177-183.
154. Sawy-El, R.E. Synthesis and biological activity of some new 1-benz yl and 1-benzoyl-3-heterocyclic indole derivatives /Sawy-El R.E., Bassyouni F.A., Abu-Bakr S.H., Abdlla S.A. //Acta Pharm.- 2010.- 60.-P:55-71.
155. Sengpracha, W. Synthesis of biologically active indole-fused heterocyclic derivatives /Sengpracha W. //University of Wollongong thesis collection. Australlia- 2005.-[http: //ro. Uow. Edu.su/279](http://ro.uow.edu.au/279).
156. Serebruany, V.L. Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192,036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials /Serebruany V.L., Steinhubl S.R., Berger P.B., [et al.] //Thromb Res Am J Cardiol.- 2005.-10.-P.1218-1222.

157. Sharma, P.P. Synthesis and anticonvulsant activity of some novel isatin schiff's bases /Sharma P.P., Pandeya S.N., Roy R.K., Anurag V. K. //Int. J. Chem. Tech. Res.- 2009.- 1(3).-P.758-763.
158. Sikka, P. Newer antithrombotic drugs /Sikka P., Bindra V.K. //Indian J. Crit Care Med.-2010.- 14(4).-P.188-195.
159. Sinhal, A.R. New antiplatelet agents and the role of platelet function testing in acute coronary syndromes /Sinhal A.R., Aylward P.E. //Clin Ther.-2013.-35(8).-P.:1064-8.
160. Singh, M. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: A brief review /Singh M., Shin S. //Indian Journal of experimental biology.-2009.-47.-P.7-15.
161. Stefanini, L. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation /Stefanini L, Roden RC, Bergmeier W. //Blood.-2009.-114(12).-P.2506-14.
162. Steg, G. Antiplatelet agents /Steg G. //Bull Acad. Natl. Med.- 2014.-197(2)-P.375-87.
163. Tamariz, L.J. Blood viscosity and hematocrit as risk factors for type 2 diabetes mellitus the atherosclerosis risk in communities study /Tamariz L.J., Young J.H., Pankow J.S. [et al.] //Am. J. Epidemiol. 2008; 10: 1153-1160.
164. Tobelem, G. Interactions between the platelets and the vessel wall. Part 1: Physiology /Tobelem G, Drouet L, Caen J.// Nouv Presse Med.-1980.- 9(13).-P.949-54.
165. Tucker, K. L. A dual role for integrin-linked kinase in platelets:regulating integrin function and α -granule secretion / Tucker K. L., Sage T., Stevens J.M. //Blood.-2008.-Vol.112.-№12.-P.4523-4531.
166. Tunbridge, G. A. Design, synthesis and antiproliferative activity of indole analogues of indanocine /Tunbridge G. A., Oram J., Caggiano L. //Med. Chem. Commun.- 2013- 4.- P. 1452–1456.
167. Udell, J.A. Prasugrel Versus Clopidogrel in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction According to Timing of Percutaneous Coronary

- Intervention: A TRITON-TIMI 38 Subgroup Analysis (Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolysis In Myocardial Infarction 38 / Udell J.A., Braunwald E., Antman E.M. [et al.] //JACC Cardiovasc. Interv.- 2014.- 7(6).-P.604-12.
168. Ueno, M. Role of Platelets and Antiplatelet Therapy in Cardiovascular Disease /Ueno M., Kodali M., Tello-Montoliu A. [et al.] //J. Atheroscler. Thromb. – 2011.- 18(6).-P.431-42.
169. Valgimigli, M. Comparisone of angioplasty with infusion of tirofiban or abciximab and with implantation of sirolimus-eluting or ancoated stents for acute myocardial infarction. The MULTISTRATEGY randomized trial /Valgimigli M., Campo G., Percoco G., [et al.] //JAMA.-2008.-299(15).-P.1788-1799.
170. Vishnevetsky, D. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease /Vishnevetsky D., Kiyanista V.A., Gandhi P.J. //Ann Pharmacother.- 2004.-38(9).-P.1500-8.
171. Wiisanen, M.E. Platelet protease-activated receptor antagonism in cardiovascular medicine /Wiisanen M.E., Moliterno D.J. //Coron. Artery Dis.- 2012.- 23(6).- P.375-9.
172. Yuhki, K. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases /Yuhki K., Kashiwagi H., Kojima F. // Int. Angiol.-2010.- 29(2).- P.19-27.
173. Zakarija, A. Ticlopidine- and clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura(TTP): review of clinical, laboratory, epidemiological, and pharmacovigilance findings (1989-2008) /Zakarija A., Kwaan H.C., Moake J.L., [et al.] //Kidney Int. Suppl.-2009.- 112.-P.20-24.
174. Zhao, W. Soluble CD40 ligand is associated with angiographic severity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndrome /Zhao W., Zhang F., Li Z.[et al.] //Chin. Med. J. (Engl).- 2014.-127(12).-P.2218-21.
- 175.