

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

На правах рукописи

СИРОТЕНКО ВИКТОР СЕРГЕЕВИЧ

**АНТИТРОМБОГЕННЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ТРИЦИКЛИЧЕСКИХ
ПРОИЗВОДНЫХ
ДИАЗЕПИНО[1,2-А]БЕНЗИМИДАЗОЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ,

доктор медицинских наук, профессор

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Кучерявенко Аида Фатиховна

ВОЛГОГРАД – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ГРУППЫ АНТИАГРЕГАНТОВ И МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	11
1.1. Фармакологическая коррекция тромботических состояний	11
1.2. Перспективные мишени для создания новых антитромбоцитарных средств	15
1.3. Спектр фармакологической активности производных бензимидазола .	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	22
2.1. Материалы исследований	22
2.2. Методы исследований.....	32
ГЛАВА 3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗЕПИНО[1,2-а]БЕНЗИМИДАЗОЛА	55
3.1. Поиск соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов <i>in vitro</i>	56
3.2. Зависимость антиагрегантной активности производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола от их химической структуры	62
3.3. Изучение антиагрегантного действия наиболее активного соединения под шифром ДАБ-15 в опытах <i>in vivo</i> .	69
3.4. Заключение	71
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-15 НА ПРОЦЕССЫ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ.....	73

4.1. Антитромботическое действие производного диазепино[1,2-а]бензимидазола соединения ДАБ-15	74
4.2. Исследование антитромботического действия соединения ДАБ-15 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс с экспериментальным инфарктом миокарда	90
4.3. Влияние соединения ДАБ-15 на время кровотечения.....	92
4.4. Заключение	94
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ДИАЗЕПИНО[1,2-а]БЕНЗИМИДАЗОЛА СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-15	98
5.1. Исследование влияния соединения ДАБ-15 на рецепторные пути активации тромбоцитов <i>in vitro</i>	99
5.2. Влияние производного диазепино[1,2-а]бензимидазола ДАБ-15 на тромбоксан-простациклиновый баланс в организме крыс	111
5.3. Влияние нового производного диазепино[1,2-а]бензимидазола на уровень кальция в тромбоцитах крыс	114
5.4. Влияние соединения ДАБ-15 на секрецию АТФ из гранул хранения тромбоцитов.	119
5.5. Влияние соединения ДАБ-15 на адгезивные свойства тромбоцитов	120
5.6. Заключение	121
ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	124
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	140
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОТНОШЕНИЙ	141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Сердечно-сосудистые заболевания несколько десятилетий занимают лидирующее положение в общей структуре заболеваемости и смертности во всем мире [Петров В.И., 2014; Шляхто Е.В., 2014; Чазов Е.И., 2001]. По данным Всемирной организации здравоохранения в 2016 году было зарегистрировано более 25 млн. осложнений, связанных с тромбообразованием, таких как ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром, ишемический инсульт, нарушение периферического кровообращения в конечностях, осложнения сахарного диабета и др. [Бокерия Л.А., 2014; Шимановский Н.Л., 2010; McFadyen J.D., 2018; Crea F., 2017]. Поэтому вопрос профилактики этой патологии является краеугольной проблемой в современной медицине.

Основными элементами, которым принадлежит ключевая роль в процессах тромбообразования, являются тромбоциты [Зиганшин А.У., 2017; Swieringa F., 2017]. Адгезия, активация, агрегация являются основными стадиями образования внутрисосудистого сгустка. Пусковым механизмом процесса тромбообразования служит взаимодействие тромбоцитов с эндогенными проагрегантными веществами и молекулами адгезии (фактор Виллебранда и коллаген) [Кубатиев А.А., 2016; Ghasemzadeh M., 2018].

В результате многоцентровых рандомизированных исследований была установлена высокая значимость антитромбоцитарной терапии в лечении и профилактике ишемической болезни, атеросклероза, цереброваскулярных, а также периферических сосудистых заболеваний [Hussain M.A., 2018]. Однако несмотря на эффективность и высокую степень доказательности современные лекарственные средства обладают рядом побочных явлений, ограничивающих их практическое применение. Среди них наиболее характерными являются гастротоксичность, риск кровотечений, развитие резистентности,

тромбоцитопении [Chen W.C., 2017; Guerrero C., 2018; Khodor S., 2016; Traby L., 2018].

Согласно литературным данным, производные бензимидазола способны подавлять процессы агрегации тромбоцитов [Chang Y., 2017; Yao W.C., 2017]. На кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ проведено большое количество исследований, демонстрирующих высокий фармакологический потенциал производных бензимидазола.

Исходя из вышеперечисленного, поиск новых соединений с антиагрегантной активностью в ряду производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола является актуальным.

Тема утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (протокол № 3 от 11.11.2015 г.) и включена в план НИР.

Степень разработанности. Антитромбоцитарная терапия несомненно занимает ведущую роль в вопросах профилактики ишемических нарушений [Arkhipov M.V., 2018]. В настоящее время применяется большой арсенал препаратов группы антиагрегантов, в основе разделения которых лежат принципы доказательной медицины, которые в полной мере учитывают эффективность этих средств и наличие побочных эффектов. Однако, наличие большого количества средств ограничивает их применение в практике из-за частых побочных эффектов. Среди последних наиболее характерными для группы антиагрегантов являются кровотечения, гастротоксичность, резистентность [D'Ascenzo F., 2015]. Терапия антитромбоцитарными средствами требует особого внимания и своевременного предотвращения нежелательных эффектов, а также возможного повтора тромботических состояний.

Цель исследования. Поиск ингибиторов агрегации тромбоцитов среди новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола и изучение их антитромбогенной активности.

Задачи исследования.

1. Выполнить поиск соединений, проявляющих высокую антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo* среди новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола.

2. Провести анализ влияния заместителей на уровень антиагрегантной активности в ряду производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола.

3. Изучить действие наиболее активного соединения на тромбогенный потенциал крови крыс в норме и при экспериментальной патологии.

4. Провести углубленное изучение влияния соединения-лидера на рецепторные и сигнальные механизмы активации тромбоцитов.

5. Исследовать величину острой суточной токсичности соединения-лидера, проявляющего наибольшую антиагрегантную активность, рассчитать его условно-терапевтический индекс.

Научная новизна исследования. Впервые было изучено влияние новых производных ряда 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола на процессы агрегации тромбоцитов. Впервые установлена взаимосвязь между структурой данных соединений и их способностью угнетать функциональную активность тромбоцитов.

Выявлено новое соединение под шифром ДАБ-15, проявляющее антиагрегантные свойства и получены данные о его влиянии на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз *in vitro* и *in vivo*. Впервые показано, что соединение ДАБ-15 оказывает антитромботическое действие на различных моделях артериальных и венозного тромбозов, а также при экспериментальном некоронарогенном инфаркте миокарда.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты установленной зависимости между антиагрегантной активностью новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола и их химической структурой могут служить основой для направленного поиска новых антиагрегантных соединений. Получены данные о наличии антитромботической активности у соединения ДАБ-15 на моделях экспериментальных тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и электрическим током в норме и при экспериментальном некоронарогенном инфаркте миокарда, на модели тромбоза легочных артерий, а также показана высокая антитромботическая активность соединения-лидера в отношении тромбоза глубоких вен. ДАБ-15 менее выражено влияет на время кровотечения относительно препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Установлено, что исследуемое вещество обладает комбинированным антитромбоцитарным механизмом действия.

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 самцы мышей и крыс. Исследование антитромбогенных свойств соединения ДАБ-15 проведено согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению антиагрегантной и антитромботической активности лекарственных средств [Миронов А.Н. , 2012] с использованием методов статистической обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола- перспективный класс соединений для поиска новых высокоэффективных антиагрегантных средств.
2. Соединение ДАБ-15 оказывает выраженную антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo*.
3. Вещество ДАБ-15 оказывает антитромботическое действие *in vivo* при моделировании артериальных тромбозов сонной артерии крыс (индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III), воздействием электрического тока), системного адреналин-коллагенового тромбоза на мышах и на модели тромбоза нижней поллой вены крыс.
4. Антиагрегантное действие соединения ДАБ-15 связано с ингибированием синтеза тромбоксана А₂, блокированием гликопротеина VI-рецептора к коллагену, а также с ингибированием уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах.

Внедрение результатов исследования. Полученные данные о способности новых соединений ингибировать процессы агрегации тромбоцитов, а также анализ влияния заместителей на уровень антиагрегантной активности в ряду производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола используется при синтезе новых веществ в НИИ ФОХ Южного Федерального университета (г. Ростов на Дону). В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, ГБУ Волгоградского медицинского научного центра, кафедры фармакологии и биоинформатики 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 и качеством выполненных исследований, проведенных на кроликах, мышах и крысах-самцах; использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с антитромбогенной активностью, а также критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XIX, XX и XXII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области; 73, 74, 75 и 76-й открытой научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2015, 2016, 2017, 2018гг.; на III-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения», Пятигорск, 2014; на Объединенном Конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 8-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии Москва, 2016; на XX Менделеевском съезде, Екатеринбург, 2016.

По теме диссертации опубликовано 15 работ (из них 7 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ).

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследуемой проблеме. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологической активности и механизма

антиагрегантного действия нового производного 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола – соединения ДАБ-15: решение поставленных задач и обсуждение результатов. Автору принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальных исследований. 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 158 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 36 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (главы 2-5), обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 31 отечественных и 138 зарубежных источника.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ГРУППЫ АНТИАГРЕГАНТОВ И МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Основными элементами, которым принадлежит ведущая роль в процессах тромбообразования, являются тромбоциты [Пантелеев М.А., 2014]. К их свойствам относят способность к адгезии, агрегации, реакции высвобождения содержимого гранул хранения, способность сорбировать и секретировать факторы плазмокоагуляции [Da Q., 2015]. Внутри кровяных пластинок имеется сложная система вторичных посредников для обработки сигналов, поступающих извне. Поддержание и регуляция активации и агрегации тромбоцитов осуществляется множеством рецепторов на поверхности тромбоцитов и соответственно они являются потенциальными мишенями воздействия для профилактики и лечения тромбозов. Большинство из них относится к семейству гликопротеиновых рецепторов (GP) [Gardiner E.E., 2014]. В тромбоците различают рецепторы для высокомолекулярных белков и для физиологических стимуляторов.

1.1. Фармакологическая коррекция тромботических состояний

В современной практике имеются различные лекарственные препараты, которые способны угнетать функции кровяных пластинок с помощью разных механизмов действия. Все эти лекарственные средства разделены на несколько групп по принципам доказательной медицины, учитывающим эффективность и наличие побочных действий [Сумароков А.Б., 2015; Фоякин А.В., 2014].

Первая группа, составляющая основу современной антитромбоцитарной терапии, — ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ): ацетилсалициловая кислота, которая признана стандартом антитромботической терапии для первичной и вторичной профилактики острых коронарных синдромов (ОКС) с уровнем доказательности: класс I, уровень A.

Вторая группа – блокаторы пуриновых P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов тиенопиридины, представленные тиклопидином, клопидогрелем, прасугрелем с уровнем доказательности: класс I, уровень A – для первичной и вторичной профилактики и нетиенопиридиновыми производными – тикагрелором и кангрелором. Также актуально назначение двойной антитромбоцитарной терапии – сочетание блокаторов P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов и ацетилсалициловой кислоты (класс I, уровень B)

Третья группа — блокаторы гликопротеиновых рецепторов (ГП-рецепторы) Пв/Ша для внутривенного применения при остром коронарном синдроме с уровнем доказательности: класс I, уровень A (в острый период ишемического инсульта применение данной группы не рекомендуется (класс III, уровень B)), а для вторичной профилактики ОКС с уровнем доказательности: класс II, уровень C (абциксимаб, эптифибатид, тирофибан, фрамон).

Четвертая группа – сочетание ацетилсалициловой кислоты с дипиридамолом замедленного высвобождения для лечения острого нарушения мозгового кровообращения (уровень доказательности класс I, уровень A).

Пятая группа - антитромбоцитарные препараты, применение которых не рекомендовано в практической кардиологии вследствие отсутствия достаточной доказательной основы преимуществ перед ацетилсалициловой кислотой, неэффективности и потенциальной опасности: сульфинпиразон, дипиридамолом (в качестве монотерапии), простациклин, блокаторы тромбосансинтетазы, антагонисты рецепторов тромбосана A₂, ингибиторы рецепторов Пв/Ша тромбоцитов для приема внутрь.

Применение указанных групп препаратов имеет высокую доказательную базу, однако степень выраженности побочных явлений ограничивает их практическое значение. Среди частых побочных эффектов наблюдаются кровотечения, гастротоксичность, резистентность, тромбоцитопения. Это обуславливает назначение дополнительных лекарственных препаратов из

других фармакологических групп с целью нивелирования возможных осложнений.

Эффективным в настоящее время признано назначение двойной антитромбоцитарной терапии. Комбинация ацетилсалициловой кислоты и блокаторов P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов эффективна в случае ишемических нарушений, несмотря на увеличение риска развития кровотечения [Veron-Esquivel D., 2018].

Наряду с перечисленными лекарственными средствами в настоящее время также используются ингибиторы фосфодиэстеразы тромбоцитов (дипиридамол), блокаторы PARs рецепторов тромбоцитов, находящиеся на стадии клинических испытаний (ворапаксар, атапаксар). Эти средства демонстрируют достаточную эффективность в профилактике процессов тромбообразования, однако недостаточно данных, позволяющих отнести их к тому или иному классу доказательности [Belova L.A., 2017; Gandhi D.M., 2018].

Ацетилсалициловая кислота была признана золотым стандартом в вопросах профилактики тромбозов [Agarwal A., 2017]. Основным механизмом действия ацетилсалициловой кислоты заключается в необратимом ингибировании ЦОГ тромбоцитов, что приводит к нарушению каталитических превращений арахидоновой кислотой. В результате происходит снижение синтеза физиологического стимулятора агрегации тромбоцитов тромбоксана. Помимо снижения синтеза тромбоксана прием ацетилсалициловой кислоты сопровождается уменьшением образования простаглицлина, обладающего сосудорасширяющим и антиагрегантным действием [Haastrup P., 2014]. Данный эффект является нежелательным, о чем свидетельствует то, что терапия ацетилсалициловой кислотой приводит к развитию гастропатий (эрозии слизистой оболочки, боли в эпигастрии, изжога и кровотечения) [Siau K., 2018]. Другое ограничение в применении ацетилсалициловой кислоты сводится к развитию у пациентов аспиринорезистентности, при которой наблюдается снижение антитромботического эффекта [Floyd C.N., 2014].

Другая группа препаратов представлена производными тиенопиридина - клопидогрелем и его предшественником тиклопидином (препарат третьего поколения), а также нетиенопиридиновыми производными тикагрелором и кангрелором [Tsoumani M.E., 2014; Weisshaar S., 2017]. Механизмом действия этой группы антиагрегантных средств является избирательное ингибирование влияния АДФ на рецепторы тромбоцитов и подавление активации гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов под действием АДФ [Kwon S.U., 2016]. Таким образом, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, которая блокирует только вторую фазу агрегации тромбоцитов, тиенопиридины предупреждают и агрегацию, и адгезию, обходя арахидоновый каскад. Такое действие не приводит к нарушению синтеза простаглицина в эндотелии сосудов. Однако одним из тяжелых побочных эффектов клопидогрела является развитие тромбоцитопенической пурпуры - механическое повреждение эритроцитов, почечная недостаточность и неврологические расстройства. Данное состояние требует немедленного переливания плазмы [Wang F., 2013]. Другим побочным действием клопидогрела является развитие резистентности у пациентов, связанной с рядом причин. Среди них выделяют полиморфизм рецепторов P2Y₁₂, полиморфизм CYP3A, связанный с особенностями метаболизма препарата и межлекарственными взаимодействиями, увеличение образования и высвобождения АДФ, альтернативные пути активации тромбоцитов.

Относительно новой группой антиагрегантных средств являются блокаторы IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов. Механизм действия этих средств заключается в торможении конечного этапа агрегации тромбоцитов – образование агрегатов посредством связывания активированных тромбоцитов молекулами фибриногена [Christen J.R., 2017; Jamasbi J., 2017]. Наряду с высокой эффективностью данная группа препаратов обладает выраженными нежелательными эффектами в виде кровотечений, брадикардии, АВ-блокады, гипотензии, диспепсии, спутанности сознания, нарушения зрения, тромбоцитопении, анафилактического шока, анемии, лейкоцитоза [Jbara M., 2017].

Ввиду наличия побочных эффектов имеющихся средств поиск и создание новых антитромбоцитарных препаратов является обоснованным.

1.2. Перспективные мишени для создания новых антитромбоцитарных средств

Важная роль в клеточном ответе тромбоцита на воздействие физиологических агонистов отводится вторичным посредникам: простаглицлин – тромбоксановой системе, внутриклеточному кальцию, производным фосфолипидов мембран, системе циклических нуклеотидов, семейству протеинкиназ, фосфодиэстераз [Shaturnyĭ V.I., 2014].

Активность фермента фосфолипазы A_2 приводит к образованию арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов, что ведет к образованию в тромбоцитах различных простаглицлинов (ПГ) D_2 , E_2 , F_{2A} , I_2 , G_2 и H_2 [Murakami M., 2017]. Последние способны оказывать двойственное влияние на процесс тромбообразования-стимулируя или угнетая его.

Простаглицлин I_2 (ПГ I_2) служит вазодилататором и угнетает агрегацию тромбоцитов [Zhang X.H., 2016].

Одним из наиболее мощных продуктов арахидонового каскада является простаглицлин тромбоксан A_2 , действие которого опосредуется через связанные с G- белком тромбоксановые рецепторы [Kassouf N., 2015].

Все известные агонисты тромбоцитов так или иначе способствуют увеличению концентрации внутриклеточного кальция. Поэтому можно утверждать, что ионам кальция принадлежит центральная роль в процессах агрегации тромбоцитов [Juška A., 2012; Varga-Szabo D., 2009]. Обмен кальция в тромбоцитах осуществляется многокомпонентной системой, обеспечивающей сложную временную регуляцию пула ионов кальция через мембраны и его строго упорядоченное распространение в цитоплазме. Общее содержание кальция в тромбоцитах колеблется от 50 до 100 нмоль/10⁹ клеток или 10⁻⁷ моль/л, что в 1000 раз ниже, чем в плазме (10⁻³ моль/л). Значительное

количество этого иона содержится в тубулярной системе и плотных гранулах тромбоцитов.

цАМФ и цГМФ являются ключевыми внутриклеточными вторичными мессенджерами, обеспечивающими мощное ингибирование агрегации тромбоцитов [Decouture B., 2015]. Образование данных соединений происходит под действием фермента аденилатциклазы, локализованной на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, на мембранах плотной тубулярной системы и системы открытых канальцев [Jayakumar T., 2013; Signorello M.G., 2016].

Активированные рецепторы тромбоцитов действуют на G-белки, которые стимулируют аденилатциклазу, образуется цАМФ, активируются цАМФ-зависимые ферменты (протеинкиназы), катализирующие фосфорилирование небольшой группы тромбоцитарных белков [Raslan Z., 2014].

Другим вторичным посредником, влияющим на кальциевый обмен, является циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Внутриклеточный уровень цГМФ регулируется гуанилатциклазой (ГЦ) [Makhoul S., 2018].

Важнейшим эффектом цАМФ и цГМФ-зависимых протеинкиназ является угнетение фосфолипазы С и, как следствие, снижение внутриклеточной концентрации ИФ₃ и ДАГ [Cong Y., 2016]. Также происходит подавление высвобождения Ca²⁺ за счет активации Ca²⁺-АТФаз или посредством угнетения Ca²⁺-каналов [Albarrán L., 2013].

Также в тромбоцитах присутствуют протеинкиназы, регулируемые вторичными посредниками сигнала (цАМФ, цГМФ, Ca²⁺, ДАГ) – ПК А, С, G, кальмодулинзависимая ПК [Magwenzi S., 2015; Stavenuiter F., 2013].

Большое значение в регуляции уровня цАМФ и цГМФ осуществляют ферменты, которые не только обеспечивают синтез последних, но и их распад. Данной способностью обладает фермент фосфодиэстераза (ФДЭ), которая находится в цитоплазме тромбоцитов. Этот фермент расщепляет цАМФ или цГМФ до 5'-монофосфатного нуклеотида и таким образом участвует в регуляции внутриклеточного соотношения цАМФ и цГМФ [Fuentes E., 2014]. В

тромбоцитах представлена ФДЭ 2,3 и 5 типов с различной степенью сродства к цАМФ и цГМФ [Yan Y., 2016].

В тромбоцитах представлены три подтипа пуриновых рецепторов для АДФ: P2X₁, P2Y₁ и P2Y₁₂ [Suzuki T., 2015]. Активация P2X₁ рецепторов способствует быстрому накоплению ионов кальция внутрь тромбоцита, что приводит к изменению его формы, но не вызывает агрегацию [Jones S., 2014].

P2Y₁ и P2Y₁₂ представляют собой рецепторы, спаренные с гуанин-нуклеотид-связывающим G-белком [Rollini F., 2014]. Рецептор P2Y₁ посредством связи с G_q активирует фосфолипазу C, которая вызывает образование инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃) и последующую мобилизацию внутриклеточного кальция [Jones S., 2014]. Одновременная активация P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторов приводит к агрегации тромбоцитов. При стимуляции P2Y₁₂ рецептора активируется фосфоинозитид-3-киназа (ее изоформы α , β , γ , δ), которая еще сильнее генерирует внутриклеточные сигналы, ведущие к угнетению аденилатциклазы и снижению концентрации цАМФ. Кроме того, происходит активация фосфолипазы A₂, которая стимулирует высвобождение арахидоновой кислоты и образование из нее мощного физиологического проагреганта тромбоксана A₂.

Все больше внимания уделяется последнее время такому физиологическому индуктору агрегации тромбоцитов, как тромбин. Помимо ключевой роли в регуляции плазменного звена гемостаза он напрямую активирует тромбоциты, стимулируя специфические PARs рецепторы на поверхности клеточной мембраны кровяных пластинок [Jamal J., 2017].

PARs рецепторы тромбоцитов представлены четырьмя подтипами. На тромбоцитах тромбин расщепляет активируемые протеиназами рецепторы 1 (PAR1) и 4 (PAR4) и, тем самым инициирует агрегацию тромбоцитов. Стимуляция этих рецепторов приводит к активации фосфолипазы C. Активированный фермент катализирует синтез инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃) [Valet C., 2016; Zhang Q., 2017]. Второй путь, связанный также со стимуляцией PARs рецепторов тромбоцитов, нацелен на синтез

диацилглицерола (ДАГ), который в свою очередь активирует мембранную протеинкиназу С (ПКС). Последняя осуществляет поступление ионов Ca^{2+} из экстрацеллюлярного пространства внутрь тромбоцита [Beck S., 2017]. ИФ₃ действует на специфические рецепторы тубулярной системы кровяных пластинок и увеличивает таким образом внутриклеточный пул ионов Ca^{2+} [Wang Y., 2017]. Так, тромбоциты изменяют дискоидную форму на сферическую и выпускают псевдоподии, при этом индуцируется их агрегация и дегрануляция. Как следствие всех этих процессов происходит снижение уровня цАМФ и стимулируется каскад арахидоновой кислоты и освобождение метаболитов этого каскада [Wu H., 2012]. PARs рецепторы вносят существенный вклад в этиологию тромбообразования и поэтому представляют собой интересную мишень для антитромбоцитарной терапии.

Перспективным для рассмотрения, как потенциальной мишени для антитромбоцитарных средств, является процесс адгезии тромбоцитов. Существует два основных белка адгезии тромбоцитов: фактор фон Виллебранда (ФВ) и коллаген [Polgár L., 2018]. На поверхности тромбоцита имеется несколько рецепторов адгезии. Это комплекс GP Ib/IX/V, который является основным рецептором для ФВ, а также GP IIb/IIIa-рецептор, который также может связывать ФВ через последовательность Arg-Gly-Asp. Взаимодействие ФВ с GP Ib/V/IX незначительно, однако при воздействии высокой скорости кровотока происходит такое изменение конформации рецептора, при котором достигается максимальное мощное связывание [Bryckaert M., 2015; Fegghi S., 2016].

Гликопротеиновый рецептор GPVI играет основную роль при адгезии тромбоцитов к коллагену. Коллаген обладает высоким тромбогенным потенциалом. Его взаимодействие с GPVI запускает каскад внутриклеточной сигнальной системы тромбоцитов, приводящей к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} , который обеспечивает возникновение GPIIb/IIIa - зависимой агрегации [Gupta S., 2018]. Подавление активации тромбоцитов и их адгезии является важным в клинической практике при разрывах и эрозиях

атеросклеротических бляшек. GPVI высокоспецифичный рецептор, характерный только для тромбоцитов, следовательно ингибирование экспрессии данного подтипа гликопротеиновых рецепторов возможно с развитием минимальных побочных эффектов, либо их отсутствием. Кроме того, доказано, что активация этих рецепторов не затрагивает циркулирующие в крови кровяные пластинки, находящиеся в состоянии покоя, а только приводит к агрегации тромбоцитов в месте адгезии. Таким образом, это говорит о возможном отсутствии такого нежелательного эффекта, как кровотечение. Тем не менее, несмотря на вышеупомянутые потенциальные преимущества блокаторов GPVI для профилактики тромбозов, в настоящее время в клинической практике отсутствуют препараты с подобным механизмом действия [Jamal J., 2017].

1.3. Спектр фармакологической активности производных бензимидазола

На основе бензимидазола уже создано немало лекарственных препаратов, используемых в клинической практике. В известной Канадской базе данных DrugBank приведено около трех десятков лекарственных препаратов, относящихся к группе производных бензимидазола. В качестве примеров можно привести антигипертензивные препараты - дибазол, кандесартан, телмисартан, азилсартан [Лазуко С.С., 2014; Vorem L.M.A., 2018; Liu LL., 2017], противоопухолевое средство – бендамустин [Darwish M., 2015], ингибиторы протонного насоса для лечения кислотозависимых заболеваний желудочно-кишечного тракта - омепразол, пантопразол, лансопразол, рабепразол [Kuzin M., 2018], антигельминтные и антипаразитарные препараты - тиабендазол, альбендазол, триклабендазол, мебендазол [Pawluk S.A., 2015], антигистаминные препараты - астемизол, биластин, емедастин, антипсихотические средства – дроперидол [Khokhar M.A., 2016].

Согласно литературным данным, эти молекулы способны подавлять и процессы агрегации тромбоцитов [Chang Y., 2017; Spasov A.A., 2014].

Антиагрегантная активность дазоксибена, мидазогрела и ридогрела, содержащих в своей структуре имидазольное кольцо, связана со способностью подавлять активность тромбоксансинтетазы тромбоцитов, уменьшая, таким образом, функциональную активность красных кровяных телец [Sather P.C., 2014]. Производное бензимидазола транквилизирующее средство афобазол проявляет церебропротекторные свойства [Seredenin S.B., 2013].

Согласно литературным данным, производные бензимидазола оказывают влияние на самые различные патогенетические звенья процесса агрегации тромбоцитов. Так, описано, что ряд азотосодержащих гетероциклических соединений ингибируют фосфодиэстеразу цАМФ тромбоцитов, являются антагонистами тромбиновых рецепторов PAR1 и PAR4. Ингибитор тромбина—дабигатран также относится к классу бензимидазолов [Schiele F., 2013].

Антиагрегантная активность производных бензимидазола связана также с влиянием на цАМФ-зависимую ПКА тромбоцитов, ПКС [Isono A., 2016]. Производное бензимидазола DMAT (2-диметиламино-4,5,6,7-тетрабromo-1H-бензимидазол) проявляет свойства селективных ингибиторов ПКС [Kang N.I., 2011]. Описаны производные бензимидазола, угнетающие фактор активации тромбоцитов, проявляющие альфа-адреноблокирующую активность, которые являются миметиками циклического аденозинмонофосфата и циклического гуанозинмонофосфата, ингибируют ФДЭ III в тромбоцитах, например производные 3-[4-(1H-бензимидазол-2-ил)-1-фенил-1H-пиразол-3-ил]-2H-хромен-2-она [Kumbar M.N., 2016].

Учитывая возникновение эндотелиальной дисфункции, приводящей к повышению тромбогенного потенциала крови, необходимо отметить, что представители данного класса способны усиливать выделение сосудистой стенкой эндотелий-релаксирующего фактора (NO). Производные бензимидазола способны оказывать кардиопротекторное действие [Гурова Н.А., 2015].

За более чем 45-летний период исследовательской работы на кафедре фармакологии и в НИИ фармакологии Волгоградского государственного

медицинского университета среди производных бензимидазола были выявлены соединения с различными видами биологической активности. Кроме того, были выявлены и изучены виды активности, косвенно свидетельствующие о присутствии интересующих нас механизмов действия, а именно антиоксидантное действие [Косолапов В.А., 2013; Трегубова И.А., 2012], снижение агрегации тромбоцитов [Кучерявенко А.Ф., 2016], эритроцитов, улучшение деформабельности и снижение вязкости эритроцитов [Науменко Л.В., 2012], антисеротониновое действие [Яковлев Д.С., 2014]. Есть основания предполагать, что эти виды активности могут реализовываться, в том числе благодаря антиагрегантным механизмам действия веществ.

Все вышеизложенное послужило причиной для начала исследований антиагрегационных свойств нового класса производных бензимидазола.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы исследований

Было исследовано 19 новых соединений под лабораторным шифром ДАБ производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола.

Данные соединения синтезированы в Научно-исследовательском институте физической и органической химии Южного Федерального университета, к.х.н. Л.Н. Диваевой, к.х.н. В.А. Анисимовой¹. Структурные формулы изученных соединений представлены в таблице 2.1.

Исследование выполнено в соответствии с требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н. , 2012], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161) и согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 и Приказ МЗ РФ № 708Н от 23 апреля 2010 г.).

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

Экспериментальное исследование одобрено Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)) протокол №2022-2016 от 07.10.2015 г.

¹ Выражаем глубокую признательность сотрудникам НИИ ФОХ ЮФУ за предоставленные субстанции соединений

В работе были использованы следующие реактивы и приборы:

-реактивы: физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия); цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия); Динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (Sigma, США); диметилсульфоксид (ДМСО) (Татхимфармпрепараты, Россия); хлоралгидрат (Органика, Россия); хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия); бриллиантовый зеленый (ООО «ФАРМ-ПРОЕКТ», Россия); калия хлорид (ч.д.а., Реахим, Россия); магния хлорид (ч.д.а., Реахим, Россия); натрия гидрокарбонат (ч.д.а., Реахим, Россия); Перес (Sigma, США); глюкоза (ч.д.а., Реахим, Россия); бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США); натрия дигидрофосфат (Sigma, США); кальция хлорид (ч.д.а., «Мосреактив», Россия); арахидоновая кислота (Sigma, США); тромбин (Sigma, США); U46619 (Sigma, США); эпинефрин (Sigma, США); ФАТ (фактор активации тромбоцитов) (Sigma, США); коллаген (Sigma, США); PAR1 (Sigma, США); трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид («Мосреактив» Россия); натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) («ICN», США); (-)-Изопротеренол (Sigma, США); TXB2 ELISA kit (Enzo, США); 6-keto-PGF1 α ELISA kit (Enzo, США); флуоресцентный зонд Fura-2/AM (Sigma, США); люциферин-люцифераза ("Chronolog", США);

-приборы: аквадистиллятор ДЭ-4-2, №24994 (ЗАО Электромедоборудование», Россия, Саранск); облучатель рециркулятор медицинский («Armed», Китай); агрегометр Viola 220 LA (ООО НФП "Биола", Россия); кюветы стеклянные (ООО НФП "Биола", Россия); магнитные мешалки (ООО НФП "Биола", Россия); двухканальный анализатор агрегации тромбоцитов ChronoLog - 700 Lumi-Aggregometer ("Chronolog", США); кюветы стеклянные ("Chronolog", США); магнитные мешалки ("Chronolog", США); центрифуга Multi Centrifuge Elmi CM 6MT (Elmi, Латвия); электронные весы (Ohaus corporation, США); дозаторы автоматические переменного объема (Gilson, Франция); металлический гастральный зонд (ОАО «МИЗ-Ворсма», Россия); пластмассовый гастральный зонд (InstechLaboratories, Inc.

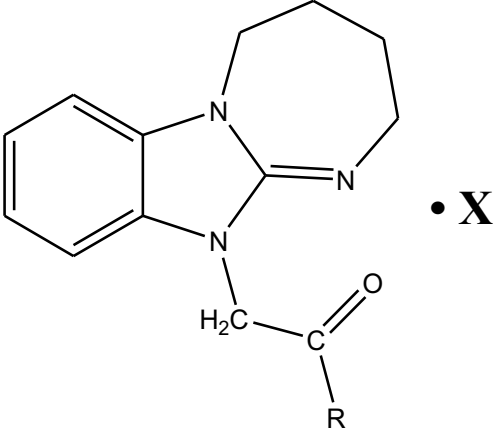
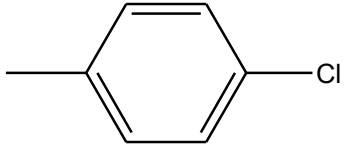
USA); стерильные одноразовые пластиковые шприцы объемом 1,0 мл, 5,0 мл (SFM Hospital Products GmbH, GERMANY); ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург); тепловая баня с ячейками для подогрева до 37°C (SOLAR, Беларусь); лазерный анализатор «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия); электронные термометр (AND, Япония); диагностический фонарик LittleDoctor (LittleDoctor, Сингапур); пинцет хирургический П-99 (МИЗ-Ворсма, Россия); корнцанг прямой (МИЗ им. В.И. Ленина, Россия); микроскоп AxioCamplus(CarlZeiss, Германия); цифровая камера AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия); термошейкер для планшетов, PST-60HL (Biosan, Латвия); многофункциональный микропланшетный ридер Infinite 200 PRO (Tecan, Австрия).

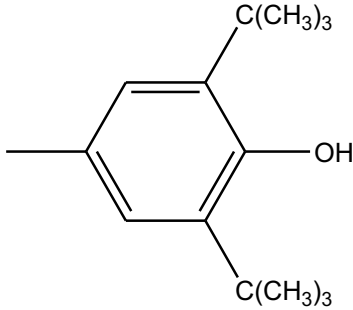
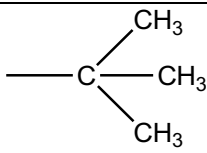
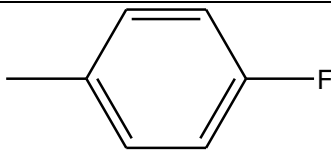
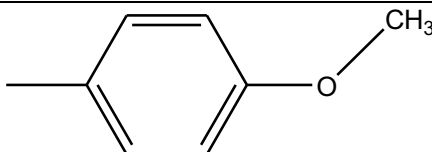
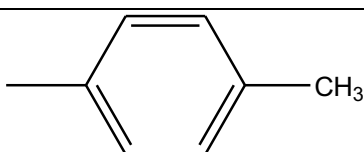
Для проведения исследований *in vitro* выбраны половозрелые кролики самцы породы «Шиншилла», а для проведения исследований *in vivo* – половозрелые нелинейные крысы-самцы, как виды, рекомендованные Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н. , 2012 г.] и общепринятые для данного этапа исследований.

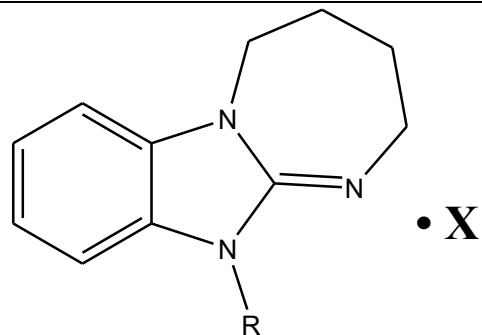
Для изучения острой токсичности использовали грызунов (половозрелых мышей) согласно действующему «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н. , 2012 г.].

Эксперименты были выполнены на 24 кроликах самцах породы "Шиншилла" массой 2,5-3,0 кг, 312 белых беспородных крысах-самцах массой 250,0-300,0 г, 130 белых половозрелых беспородных мышах-самцах массой 20,0-25,0 г и 12 донорских образцах цельной крови (договор №7 от 3 марта 2017 г. с ГБУЗ "Волгоградский областной центр крови").

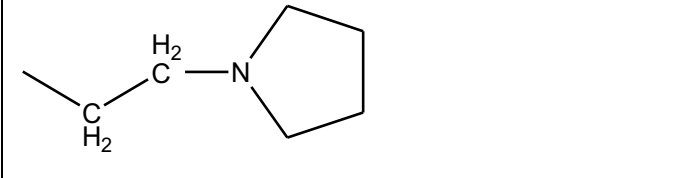
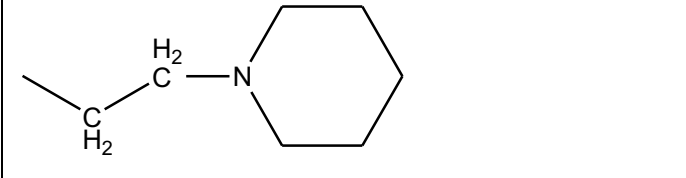
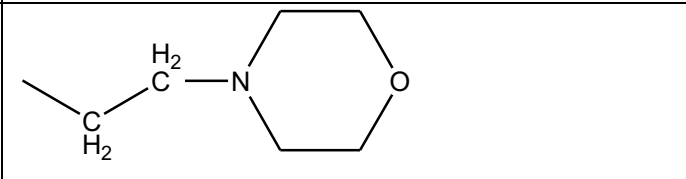
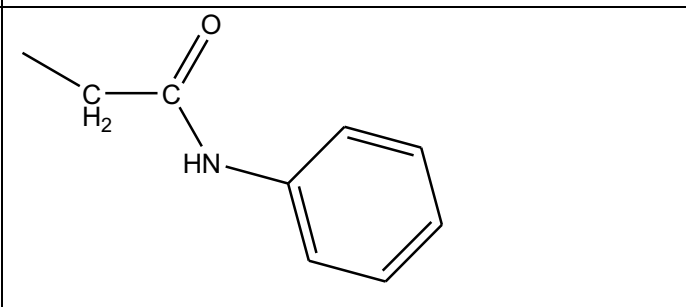
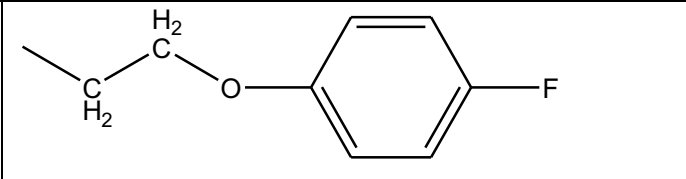
Таблица 2.1. Химическое строение соединений класса 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола

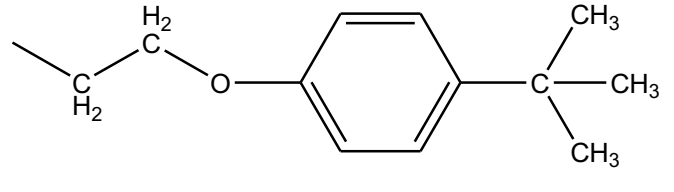
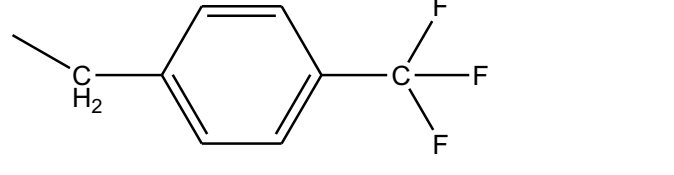
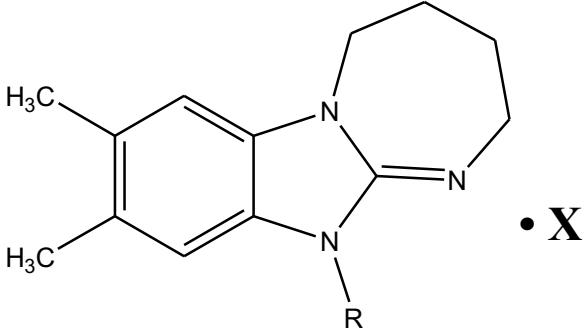
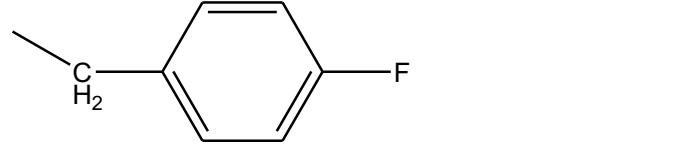
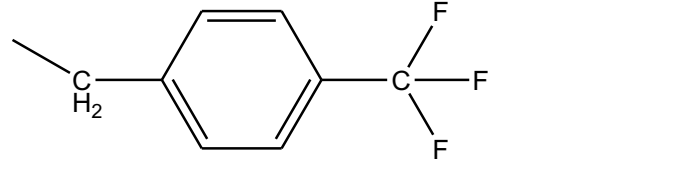
Тестируемые образцы	Структура заместителя	Название заместителя	Солевой компонент ($\cdot X$)	Брутто формула	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6
					
1	2	3	4	5	
ДАБ-4		-4-хлорфенил	HBr	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O	420,76

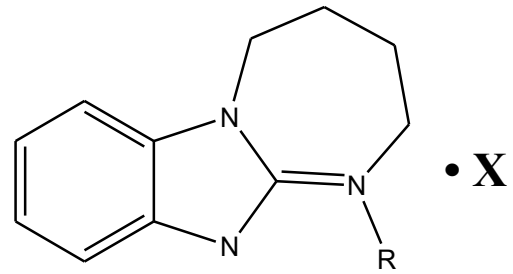
ДАБ-5		-3,5-дитретбутил- 4-гидроксифенил	HBr	$C_{27}H_{35}N_3O_2$	514,53
ДАБ-7		-третбутил	HBr	$C_{17}H_{23}N_3O$	366,32
ДАБ-8		-4-фторфенил	HBr	$C_{19}H_{18}FN_3O$	404,303
ДАБ-9		-4-метоксифенил	HBr	$C_{20}H_{21}N_3O_2$	416,34
ДАБ-12		-4-метилфенил	HBr	$C_{20}H_{21}N_3O$	400,34



1	2	3	4	5	6
ДАБ-13		-4-хлор-1- этоксифенил	HCl	C ₁₉ H ₂₀ ClN ₃ O	378,32
ДАБ-14		-4-метокси-1- этоксифенил	HBr	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	418,35
ДАБ-15		-4-фтор-1- метилфенил	HCl	C ₁₈ H ₁₈ FN ₃	331,813
ДАБ-20		- диэтиламиноэтил	2HCl	C ₁₇ H ₂₆ N ₄	359,36

ДАБ-21		-1- этилпирролидин	2HCl	C ₁₇ H ₂₄ N ₄	357,34
ДАБ-22		-1- этилпиперидин	2HCl	C ₁₈ H ₂₆ N ₄	371,37
ДАБ-23		-1-этилморфолин	2HCl	C ₁₇ H ₂₄ N ₄ O	373,34
ДАБ-24		-N- фенилацетамид	HCl	C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O	356,87
ДАБ-25		-4-фтор-1- этоксифенил	HCl	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O	361,86

ДАБ-26		-4-третбутил-1-этоксифенил	HBr	$C_{23}H_{29}N_3O$	444,43
ДАБ-27		-4-трифторметил-1-метилфенил	HCl	$C_{19}H_{18}F_3N_3$	381,82
					
1	2	3	4	5	6
ДАБ-28		-4-фтор-1-метилфенил	HCl	$C_{20}H_{22}FN_3$	359,87
ДАБ-29		-4-трифторметил-1-метилфенил	HCl	$C_{21}H_{22}F_3N_3$	409,88



1	2	3	4	5	6
ДАБ-30	<p>Chemical structure of a 4-fluorophenylmethyl group.</p>	-4-фтор-1-метилфенил	HCl	$C_{18}H_{18}FN_3$	331,81

Животные подвергались карантину в течение 14 дней (крысы) и 21 дня (кролики) в условиях отдельных боксов вивария кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. В течение карантинного периода не менее чем 2 раза (1 и 14 день у крыс) и не менее 3 раз (1, 14 и 21 день у кроликов), проводили измерение массы тела. Ежедневно осуществляли контроль клинического состояния путем визуального осмотра в группах. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы не включались.

Животных распределяли по экспериментальным группам рандомизированно, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на $\pm 10\%$.

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

кормовой, соль), зерно-продукты и сочные корма (овощи и травы). Замена воды в поилках производилась ежедневно.

Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам с водой, соответствующей ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82 и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток вода из централизованных систем питьевого водоснабжения».

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

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

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

2.2. Методы исследований

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

Эксперименты выполнены на 6 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. Все исследованные соединения растворялись в дистиллированной воде. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота

растворялась в 30 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим добавлением дистиллированной воды до необходимого объема. Влияние тестируемых образцов на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* изучали согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ViolaLA-220. Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971). Для этого венозную кровь, забранную из ушной краевой вены кролика, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин на центрифуге Multi Centrifuge CM 6M (Elmi, Латвия). В основе данной методики лежит оптический метод детекции степени изменения светопропускания плазмы богатой тромбоцитами (PRP), при добавлении веществ, стимулирующих процессы агрегации (в условиях постоянного перемешивания). Обязательным условием для протекания процессов агрегации является механическое перемешивание плазмы при 800 об/мин, которое проводится с помощью магнитной мешалки, прилагаемой к агрегометру. Перед началом исследования необходимо выполнение подсчета тромбоцитов в агрегометре в течение 2 минут при помощи стандартного раствора ZA. Каждая проба должна содержать не менее 280 тыс./мкл и не более 330 тыс./мкл тромбоцитов. Калибровка прибора проводится по дистиллированной воде, согласно инструкции. При этом светопропускание дистиллированной воды принимается за 100%.

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

Для изучения антиагрегантной активности исследуемых соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляется 10 мкл раствора

тестируемого образца в определенной концентрации. Проба инкубируется в специализированной ячейке агрегометра при поддержании постоянной температуры 37°C в течение 5 минут, после чего пробу переносят в регистрирующую ячейку и производят запись агрегатограммы. На 10 секунде процесса в кювету добавляется индуктор агрегации АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Запись агрегатограммы производится в течение 5 минут, при перемешивании пробы магнитной мешалкой (800 об/мин). Также, в другой кювете исследуют активность остальных тестируемых образцов.

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

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

A-степень агрегации тромбоцитов крови кроликов без изучаемых соединений;

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

Исследуемые соединения под шифром ДАБ и препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в диапазоне концентраций 1×10^{-4} – 1×10^{-6} , М (100-1 мкМ). Для веществ с наиболее высокой антиагрегантной активностью и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты рассчитывали величину IC_{50} (концентрация, ингибирующая агрегацию тромбоцитов на 50%).

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

Изучение влияния вещества на функциональную активность тромбоцитов *ex vivo* проводили согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ViolaLA-220. Тестируемыми образцами являлась PRP 72 беспородных половозрелых крыс самцов массой 250,0-300,0 г, которым за 2 часа до исследования внутривенно с помощью металлического атравматического зонда вводили соединение лидер ДАБ-15, проявившее наиболее высокую антиагрегантную активность *in vitro*, ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 5мкМ. Перед началом исследования выполняется подсчет тромбоцитов. Каждая проба должна содержать 800-900 тыс./мкл тромбоцитов.

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

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

Для получения результатов опытной пробы в кювету агрегометра вносили 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы животного, которому вводили тестируемый образец, и после включения записи агрегатограммы на

10 секунде процесса в кювету добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 5мкМ.

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

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

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

A-степень агрегации тромбоцитов крови крыс без изучаемых соединений;

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

Соединение ДАБ-15 было изучено в дозе 2 мг/кг (доза, эквимолярная IC_{50} , полученной в опытах *in vitro*) и в возрастающих дозах 4, 9 и 17 мг/кг, препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 19 (доза, эквимолярная IC_{50} , полученной в опытах *in vitro*), 28 и 38 мг/кг. Клопидогрел был изучен в дозе 44 мг/кг (доза, эквимолярная дозе ацетилсалициловой кислоты -19 мг/кг) и в убывающих дозах 22, 11 и 5,5, мг/кг (т.к. в дозе 44 мг/кг препарат проявил высокий уровень активности). Для всех тестируемых образцов рассчитывали величину ED_{50} методом регрессионного анализа (эффективная доза, в которой вещество ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

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

Исследование проводили на 60 беспородных половозрелых крысах-самцах массой 250,0-300,0 г. Антитромботическое действие соединения

ДАБ-15 и препаратов сравнения было изучено с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990]. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Соединение ДАБ-15 и препараты сравнения вводились крысам внутрижелудочно однократно за 2 часа до инициации тромбообразования. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутривентриально), затем послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. На участок длиной около 1 см накладывали ватный диск размером 2x8 мм, пропитанный 50% раствором хлорида железа (III) (0,025 мл). Для изолирования окружающих тканей под сонную артерию подкладывали парафиновую бумагу. Ультразвуковой датчик аппарата «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург) устанавливали на расстоянии 1 см от ватного диска по ходу кровотока в сонной артерии (Рис. 2.1.). Регистрация кровотока проводилась до полной окклюзии сосуда тромбом.

Соединение ДАБ-15 и клопидогрел были исследованы в эквимольных ацетилсалициловой кислоте (19 мг/кг) дозах, которые составили 33 и 44 мг/кг соответственно. В дальнейшем соединение ДАБ-15 было изучено в дозах 9 и 17 мг/кг. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота исследовалась в дозах 19, 100 и 150 мг/кг, клопидогрел вводили в дозах 44, 88 и 122 мг/кг. Оценку антитромботического действия тестируемых образцов проводили по показателю времени образования тромба. Далее производили расчет показателя ED₅₀ (эффективная доза, в которой обеспечивается пролонгирование времени окклюзии сонной артерии на 50%) с использованием метода регрессионного анализа.

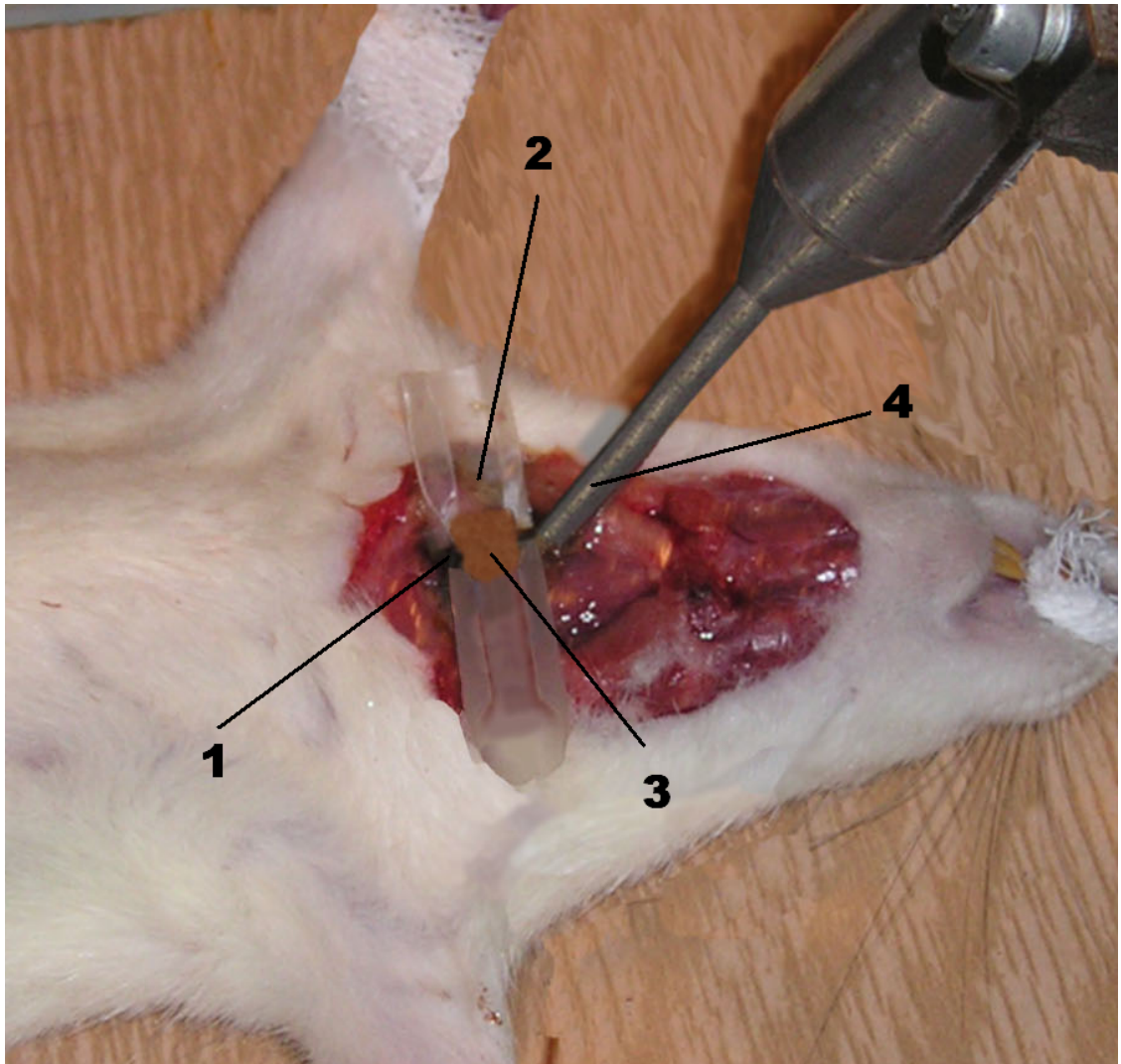


Рис. 2.1 - Моделирование артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III).

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

2.2.4. Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.

Моделирование тромбоза проводили 72 беспородным крысам самцам массой 250,0-300,0 г. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Воспроизведение данной модели тромбоза выполняли спустя 2 часа после внутрижелудочного однократного

введения тестируемых образцов [Guglielmi G. 1991; Zhao X., 2016]. Наркотизацию животных проводили хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно), затем послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. К участку сосуда длиной 1 см подводили титановые электроды, на место их контакта с артерией наносили акустический гель. Для изолирования окружающих тканей под сонную артерию подводили парафиновую бумагу. На расстоянии 1 см от данного участка по ходу кровотока устанавливали датчик аппарата «Минимакс-Допплер-К» («СП Минимакс», Санкт-Петербург, Россия) с рабочей частотой ультразвукового зондирования 25 МГц (Рис. 2.2.).

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

Исследуемое соединение ДАБ-15 исследовали в дозах 4, 9, 17 и 33 мг/кг. Препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 19, 25, 50 и 100 мг/кг, клопидогрел – 5,5, 11 и 22 мг/кг.

В качестве параметра, характеризующего антитромботические свойства исследуемых веществ, используется интервал времени от момента начала электростимуляции до полной окклюзии каротидной артерии. Далее производили расчет показателя ED₅₀ (эффективная доза, в которой обеспечивается пролонгирование времени окклюзии сонной артерии на 50%) с использованием метода регрессионного анализа.

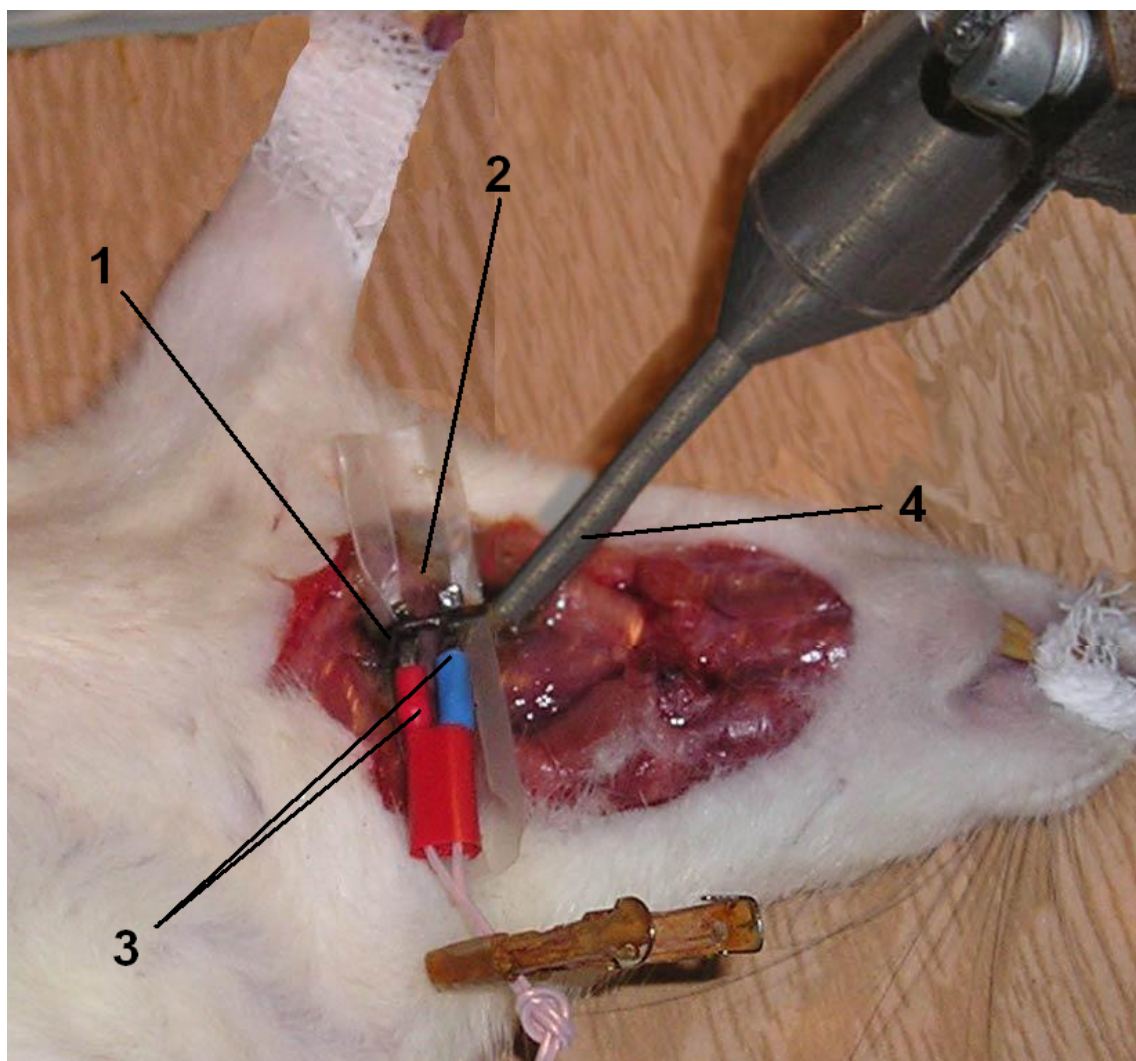


Рис. 2.2. - Моделирование артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.

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

2.2.5. Метод исследования антитромботической активности на модели адреналин-коллагенового тромбоза.

Исследование проводили на 40 половозрелых беспородных белых мышах-самцах массой 20,0-25,0 г. Мышей фиксировали в специализированном боксе со свободным доступом к хвосту. Хвост окунали в теплую воду для расширения хвостовых вен. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных

вводился растворитель в эквивалентном объеме. В хвостовую вену инсулиновым шприцом струйно вводили смесь эпинефрина (0,06 мг/кг) и коллагена (0,5 мг/кг), растворенную в физиологическом растворе [DiMinno G., 1983]. У умерших и выживших животных (после наркотизации хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг внутривенно) производили забор внутренних органов: головной мозг, легкие, сердце, почки, печень, селезенку, желудок для проведения гистологической оценки. Тестируемое соединение ДАБ-15, препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел вводили внутривенно пластиковым атравматическим зондом за 2 часа до начала эксперимента. Соединение ДАБ-15, ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел исследовали в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности, полученных в опытах *in vivo* и которые составили 5,6, 27 и 7,4 мг/кг соответственно.

Извлеченные органы мышей помещали в 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) на 24 часа. С момента извлечения органов из раствора формалина до погружения образца ткани в фиксатор должно пройти менее 2 мин. После фиксации производили вырезку материала. В дальнейшем исследование проводили по общепринятой гистологической методике через батарею спиртов возрастающей концентрации, хлороформ и заливали в парафин. Далее на роторном микротоме изготавливали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стекла. Проводили окрашивание гематоксилином и эозином по общепринятым гистологическим методикам (депарафинизация в ксилоле, проводка по спиртам убывающей концентрации до воды, окраска гематоксилином Гарриса, дифференцировка солянокислым спиртом, окраска эозином, проводка по спиртам возрастающей концентрации до абсолютного этанола, просветление в кислоте, заключение в монтирующую среду под покровное стекло) [Саркисов Д.С., 1996 г.].

Для анализа морфологических показателей производили² микрофотосъемку цифровой камерой AxioCam 105 color (CarlZeiss, Германия, 5 мегапикселей) на базе микроскопа AxioCamPlus (CarlZeiss, Германия) с использованием объектива x10; x40 и окуляра x10. При морфологическом исследовании оценивали наличие признаков тромбообразования в кровеносных сосудах органов. С помощью морфометрического метода исследования (с использовали программы «ZEN Pro 2012», (CarlZeiss, Германия) определяли среднюю площадь (мкм²), относительную площадь (%) и периметр тромбов [Автандилов Г.Г., 2002], как критерий антитромботического действия тестируемых образцов. Также в качестве критерия активности веществ производили оценку выживаемости мышей.

2.2.6. Модель Global Thrombosis Test (по Горогу).

Эксперименты выполнены на 12 белых беспородных крысах-самцах весом 250-300 г. Соединение ДАБ-15 растворяли в дистиллированной воде и вводили внутривенно за 2 часа до начала проведения эксперимента в дозе 5,6 мг/кг (ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo*). Контрольным животным вводился растворитель в эквивалентном объеме. Затем проводили наркотизацию животных (хлоралгидрат 400 мг/кг внутривенно), послойную лапаротомию и осуществляли забор крови из брюшной аорты шприцем объемом 5 мл, содержащим 20 мкМ АДФ [Yamamoto J., 2014]. Далее кровь немедленно помещали в пробирку Горога (рис. 2.1) без использования стабилизаторов и консервантов крови. В качестве критерия оценки антитромботического действия исследуемого соединения фиксировали время окклюзии и время лизиса при помощи программного обеспечения GTTDraw2.3.

² Выражаем глубокую признательность заведующему кафедрой патологической анатомии ВолгГМУ, д.м.н., профессору Смирнову А.В.

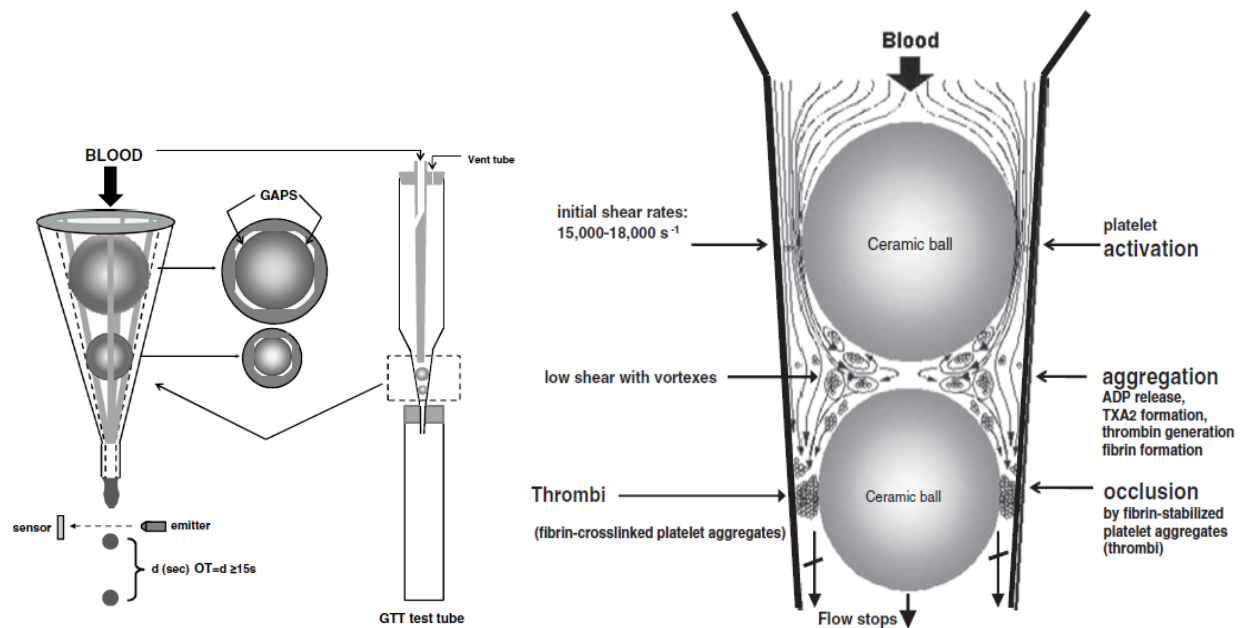


Рис. 2.1-строение пробирки Горога и принцип метода.

2.2.7. Модель тромбоза глубоких вен.

С целью изучения антитромботического действия соединения ДАБ-15 и препаратов сравнения в отношении венозной системы была выбрана модель перевязки нижней полой вены крыс [Henke P.K., 2007]. Эксперименты были выполнены на 30 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г. У крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно), проводили послойную лапаротомию, отеснение кишечника, разделение нижней полой вены и аорты, и осуществляли перевязку нижней полой вены на 1 см выше места бифуркации. Брюшная часть аорты при этом должна быть незатронутой. Затем брюшную полость ушивали и через 24 часа крыс повторно наркотизировали и производили лапаротомию с последующим извлечением тромбов из нижней полой вены. Тромбы взвешивали. Все исследованные образцы растворяли в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Тестируемое соединение ДАБ-15 и препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел вводили

внутрижелудочно за 2 часа до осуществления перевязки нижней полой вены, в дозах 5,6, 27 и 7,4 мг/кг соответственно (ED_{50} антиагрегантной активности *in vivo*). Для чистоты эксперимента включали группу ложно-оперированных животных, которой проводили лапаротомию и ушивание брюшной полости, с целью исключения влияния хирургической манипуляции на образование тромба или гибель животных.

2.2.8. Метод изучения влияния тестируемого соединения на время кровотечения.

Исследование выполнялось на 24 белых беспородных мышах самцах массой 20-25 г. У мышей, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) отсекали 3 мм с кончика хвоста. Хвост быстро помещали в пробирку с физиологическим раствором, температуру которого ($37^{\circ}C$) поддерживали с помощью термостата и регистрировали время от момента отсекания кончика хвоста до момента прекращения вытекания крови из хвостовой вены [Greene Т.К., 2010]. После прекращения кровотечения кончик хвоста обрабатывали раствором бриллиантового зеленого. Все исследованные образцы растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Исследуемое соединение ДАБ-15 и препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел вводились пластмассовым атравматическим зондом внутрижелудочно за 2 часа до начала эксперимента. Соединение ДАБ-15, ацетилсалициловая кислота и клопидогрел были изучены в дозах ED_{50} антиагрегантной активности, полученных в опытах *in vivo*, которые составили 5,6; 27 и 7,4 мг/кг соответственно.

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

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

Соединение ДАБ-15 растворялось в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. Введение раствора тестируемого образца крысам начинали не ранее, чем через 24 часа после последней инъекции изопротеренола. Через 2 часа после введения тестируемого образца проводили исследование антитромботического действия с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990].

2.2.10. Исследование влияния соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами.

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

Для отмывания тромбоцитов богатую тромбоцитами плазму дважды центрифугировали с буфером (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,4 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM глюкозы и 0,35 бычьего альбумина, pH 6,7), а затем отмытые тромбоциты ресуспензировали в финальном буфере с вышеуказанным составом, но с pH 7,35.

Соединение ДАБ-15 растворяли в дистиллированной воде. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота растворялась в 30 мкл ДМСО с последующим добавлением дистиллированной воды до необходимого объема. Влияние соединения ДАБ-15 и препаратов сравнения на процессы агрегации тромбоцитов, вызванной различными индукторами, изучали в диапазоне концентраций 1×10^{-4} – 1×10^{-7} М. Тестируемые образцы добавляли за 5 минут до инициации процесса агрегации. Концентрации индукторов составляли: для АДФ и адреналина – 5 мкМ, арахидоновой кислоты - 50 мкМ, коллагена - 4 мкг/мл, U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов) - 3 мкМ, PAR1-агониста – 30 мкМ, ристоцетина – 1,25 мг/мл, фактора активации тромбоцитов – 10 мкМ. Влияние ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, адреналином, арахидоновой кислотой, коллагеном, фактором активации тромбоцитов, ристоцетином было изучено на богатой тромбоцитами плазме кролика. Действие ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистом PAR1-рецепторов, изучалось на богатой тромбоцитами плазме здоровых доноров. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную U46619, исследовали на суспензии отмытых тромбоцитов кролика. Для оценки активности соединений определяли $\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов и величину IC_{50} .

2.2.11. Метод изучения влияния соединения ДАБ-15 на активацию P2Y₁-рецепторов и P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов.

Исследование проводили на плазме, богатой тромбоцитами, 6 кроликов-самцов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг и 18 крысах-самцах массой 250-300 г. Активацию P2Y₁-рецепторов тромбоцитов проводили в безкальциевой среде, с добавлением 5 мМ ЭДТА, в кальциевой среде в случае P2Y₁₂-рецепторов. В качестве индуктора активации данных рецепторов использовали АДФ в концентрации 70 нМ и 200 нМ для изучения влияния на P2Y₁₂-рецепторы [Сакаев М.Р., 2000].

Активацию тромбоцитарных P2Y₁-рецепторов проводили в безкальциевой среде, в буфере, содержащем трис-HCl - 0,472 г., натрия хлорида - 2,456 г., ЭДТА - 0,504 г. Навеску доводили до 300 мл дистиллированной водой с измерением pH раствора (pH=7,8). Активацию тромбоцитарных P2Y₁₂-рецепторов проводили в кальциевой среде, в буфере, содержащем трис-HCl - 0,472 г., натрия хлорида - 2,456 г., ЭДТА - 0,504 г., CaCl₂ -1 мМ. Навеску растворяли в 300 мл дистиллированной воды с измерением pH раствора (pH=7,8).

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

При изучении антиагрегантной активности соединений в кювету с 7 мл буфера и 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляли 100 мкл раствора исследуемого соединения в определенной концентрации. Кювету помещали в ячейку и начинается запись агрегатограммы. Проба прописывали в течение 5 минут, после чего в кювету добавляли индуктор агрегации АДФ в концентрации 70 нМ (200 нМ). Запись агрегатограммы производили в течение 5 минут, при перемешивании пробы магнитной мешалкой (800 об/мин). Аналогичным способом в другой кювете исследовали антиагрегантную активность остальных тестируемых образцов. Влияние соединения ДАБ-15 на P2Y₁-рецепторы тромбоцитов оценивали в концентрации 1 мкМ. В аналогичной концентрации проводили исследование вещества сравнения MRS-2179 (высоко селективный блокатор P2Y₁-рецепторов тромбоцитов). В случае изучения влияния тестируемых образцов на P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов в качестве препарата сравнения был использован клопидогрел. Соединение ДАБ-15 и клопидогрел вводились за 2 часа до проведения эксперимента внутривенно.

Степень активации P2Y₁ и P2Y₁₂ - рецепторов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Расчёт ингибирующего влияния на активацию тромбоцитов ($\Delta\%$) изучаемых соединений производили по формуле:

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

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

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

2.2.12. Метод исследования влияния соединения ДАБ-15 на баланс тромбоксана В₂ и 6-кето простагландина (PGF1 α).

Эксперименты были выполнены на 36 крысах самцах массой 250-300 г. Влияние соединения ДАБ-15 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на уровень тромбоксана В₂ (ТхВ₂) и 6-кето простагландина (PGF1 α) осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов ELISA kit (Enzo, США) на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200, который воспроизводили спустя 2 часа после однократного внутрижелудочного введения тестируемых образцов [Rao M.L., 2014]. Соединение ДАБ-15 и ацетилсалициловая кислота растворялись в дистиллированной воде. Контрольной группе животных вводился растворитель в эквивалентном объеме. В качестве биоматериала для исследования производили забор крови из брюшной аорты крыс, с последующим получением плазмы, богатой тромбоцитами, по ранее описанному методу. Исследуемое соединение и препарат сравнения были изучены в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности

in vivo, которые составили для соединения ДАБ-15 5,6 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты - 27 мг/кг.

2.2.13. Измерение уровня внутриклеточного кальция в тромбоцитах кролика.

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

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

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

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

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

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

где

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

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

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

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

Исследуемое соединение ДАБ-15 было изучено в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ с последующим вычислением значения IC₅₀, препарат сравнения верапамил был исследован в концентрации 100 мкМ.

2.2.14. Метод исследования секреции из плотных гранул тромбоцитов.

Эксперименты были выполнены на цельной крови 12 здоровых добровольцев доноров с использованием люмиагрегометра Chronolog 700 (Chronolog, США) [Ambrosio A.L., 2017]. Исследуемое соединение ДАБ-15 изучали в концентрации 200 мкМ, что в пересчете на человека соответствует дозе 5,6 мг/кг (ED₅₀ антиагрегантной активности соединения, полученной в опытах *in vivo* на крысах). Влияние тестируемых образцов на уровень секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов оценивали люминисцентным методом с помощью реактива люциферин-люцифераза (Chronolog Corp., США), который инкубировали совместно с соединением ДАБ-15 в пробе. Проводили стандартизацию каждого образца. Для этого 900 мкл разбавленной (1:1) физиологическим раствором цельной крови, предварительно прогретой в инкубационной ячейке, помещали в канал для измерения. Добавляли 100 мкл Chrono-Lume и данную смесь инкубировали 2 минуты, после чего вносили в пробу 5 мкл АТФ-стандарта. Проводили

наблюдение за люминисценцией. При этом сигнальный максимум должен лежать между 60% и 20%.

При исследовании влияния соединения ДАБ-15 на секрецию АТФ из плотных гранул тромбоцитов помещали кюветы с 450 мкл физиологического раствора и 450 мкл крови в инкубационную ячейку на 5 минут. В прогретую кювету с образцом крови добавляли раствор исследуемого соединения и инкубировали 5 мин. Затем помещали кювету с исследуемым образцом в тестовую ячейку, вносили 100 мкл Chrono-Lume, помещали осторожно в кювету электроды и закрывали дверцу. Проводили инкубацию в течение 2 минут, после чего добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ в конечной концентрации 5 мкМ и проводили запись агрегатограмм. Как только сигналы АТФ начинали уменьшаться останавливали тест. Люминисцентный метод с использованием реактива люциферин-люцифераза позволил количественно оценить уровень секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов, а значение импеданса дало возможность оценить антиагрегационную активность тестируемых образцов.

2.2.15. Изучение влияния соединения ДАБ-15 на адгезию тромбоцитов

Эксперименты были выполнены на цельной крови 6 кроликов самцов массой 2,5-3,0 кг. Адгезию тромбоцитов индуцировали с помощью коллагена в конечной концентрации 50 мкМ. В указанной концентрации происходят именно процессы адгезии кровяных пластинок на микрофибриллах коллагена [Mangin P.H., 2018]. Указанный процесс детектировали по значению импеданса на люмиагрегометре Chronolog-700. Соединение-лидер было изучено в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ. Для этого тестируемый образец ДАБ-15 (10 мкл) добавляли в кювету с цельной кровью, разведенной физиологическим раствором NaCl (1:1), после чего пробу инкубировали 5 мин. Далее кювету помещали в специальное отделение агрегометра и

опускали в пробу импедансные электроды. Затем запускали процесс записи агрегатограммы. На 10 секунде записи в пробу вносили 10 мкл индуктора коллагена в конечной концентрации 50 мкМ.

Оценку снижения адгезивных свойств оценивали по степени снижения амплитуды агрегатограммы. Для соединения ДАБ-15 методом регрессионного анализа была рассчитана величина IC_{50} .

2.2.16. Исследование острой токсичности (LD_{50})

Перед введением исследуемого соединения ДАБ-15, животные были лишены корма на 12 часов. Объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывали исходя из массы тела. Тестируемый образец ДАБ-15, растворенный в дистиллированной воде в возрастающих дозах 50, 100, 150 и 200 мг/кг, вводили мышам-самцам внутривентрально.

После введения соединения-лидера ДАБ-15 за животными было установлено наблюдение с целью выявления смертности или токсических признаков в течение 14 дней исследования. В первые сутки на протяжении 6 часов после введения вещества регистрировали сроки развития интоксикации и гибель животных [Миронов А.Н., 2012; Саноцкий И.В., 1975], в последующие дни - 2 раза в день (утром и вечером).

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

Начиная с группы животных, получавших дозу, предшествующую той, при введении которой наблюдалась гибель хотя бы одного животного и у всех последующих групп с возрастанием дозы производили оценку параметров негативного влияния на неврологический статус: наличие

тремора, судорожного синдрома, изменения подвижности, двигательной активности, стереотипного поведения, седации.

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

По результатам гибели животных рассчитана величина LD_{50} исследуемой субстанции соединения ДАБ-15 по методу Литчфилда и Уилкоксона, с использованием регрессионного анализа (Microsoft Excel 2007) [Миронов А.Н., 2012]. Также установлена принадлежность соединения-лидера ДАБ-15 к классу токсичности лекарственных средств [Березовская И.В., 2003; Саноцкий И.В., 1975].

2.2.17. Статистическая обработка данных

Статистические расчеты проводили с помощью встроенных функций программы Microsoft Excel 2007 из пакета Office XP (Microsoft, США) (среднее арифметическое значение, стандартная ошибка средней арифметической), программы «Graph.Pad.Prism5.0» (США). Для статистической обработки данных скрининга использовали непараметрический метод сравнения независимых групп с помощью критерия Манна-Уитни (критерий нормальности распределения Колмогорова-Смирнова) («Graph.Pad.Prism5.0»).

Достоверность эффективности соединения-лидера ДАБ-15 относительно исследуемых препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела определяли с помощью критерия множественного сравнения one-way ANOVA с поправкой Бонферрони («Graph.Pad.Prism5.0»). Статистическую обработку данных, полученных при гистологических исследованиях, проводили с использованием программы «Видео Тест Морфо-4. Достоверность выживаемости животных при моделировании

генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза оценивали с помощью критерия Фишера («Graph.Pad.Prism5.0»).

ГЛАВА 3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗЕПИНО[1,2-*a*]БЕНЗИМИДАЗОЛА

Ключевая роль активации тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в патогенезе ишемических нарушений в различных органах определяет целесообразность использования антиагрегантных средств и других методов для их лечения и профилактики [Fuetnes M., 2017; Zhang Y., 2018]. Но, несмотря на это, антитромбоцитарные средства не всегда проявляют необходимую активность и имеют побочные эффекты [MoralesVidal S.G., 2013; Simon J., 2017]. Исходя из этого, необходимо проводить поиск новых антиагрегантных средств с более выраженной активностью и с наименьшими побочными эффектами. При этом первым этапом исследования является выявление высокоактивных субстанций в опытах *in vitro* [Миронов А.Н. , 2012].

Однако более полно учесть суммарное влияние различных факторов на процесс образования агрегатов кровяных пластинок в сосудистом русле, а также точнее оценить антиагрегационный эффект исследуемых соединений по сравнению с исследованиями *in vitro*, можно только при выполнении опытов в условиях целого организма *in vivo* [Gao W., 2017].

Успешное применение нового потенциального антиагрегантного средства в клинической практике возможно при наличии данного вида активности, превосходящего известные антиагрегантные препараты [Миронов А.Н., 2012]. Поэтому для характеристики особенностей действия исследуемых соединений и их активности, вызываемые ими эффекты должны быть сравнены с эталонными препаратами, по возможности близкими по механизму действия к изучаемому средству. Поэтому целью настоящих исследований явился поиск высокоактивных соединений в ряду производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazepино[1,2-*a*]бензимидазола в опытах *in vitro*, а также оценка антиагрегантного действия наиболее активной

субстанции в условиях целого организма животного *in vivo* на модели АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов.

Установление величины острой токсичности позволит определить показатель условного терапевтического индекса соединения-лидера.

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

Проведенное исследование по влиянию 19 новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола под шифром ДАБ позволило оценить уровень их антитромбоцитарной активности в концентрации 100 мкМ на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (табл. 3.1). В ходе данного исследования препаратом сравнения выступала ацетилсалициловая кислота, как антиагрегантное средство с доказанной активностью.

Антитромбоцитарная активность препарата сравнения в концентрации 100 мкМ составила 52,1%.

Из исследуемых соединений наибольшую активность в отношении АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов проявили образцы под шифрами ДАБ-9, ДАБ-4, ДАБ-15 и ДАБ-13. Антиагрегантное действие этих соединений было достоверно и в исследуемой концентрации составило 69,8; 72,2; 81,2; 81,6 и 87,3% соответственно. При этом ДАБ-15 и ДАБ-13 статистически значимо превосходили по данному эффекту препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,5 и 1,6 раза соответственно. Антиагрегантный эффект соединений ДАБ-7, ДАБ-12, ДАБ-25 и ДАБ-26 был сравним с эффектом ацетилсалициловой кислоты. Другие исследуемые соединения, а именно образцы под шифрами ДАБ-29, ДАБ-30, ДАБ-8, ДАБ-23, ДАБ-20, ДАБ-27, ДАБ-24, ДАБ-28, ДАБ-21, ДАБ-22 и ДАБ-5 проявили достоверное антиагрегантное действие относительно значений, полученных в контроле, однако, по антитромбоцитарному эффекту они уступали препарату сравнения.

Таблица 3.1. Влияние производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* (M±m) (n=6).

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов в концентрации 100 мкМ (M±m)
1.	ДАБ-5	32,8±3,2*
2.	ДАБ-29	34,4±4,0*
3.	ДАБ-30	39,7±6,4*
4.	ДАБ-8	40,3±4,3*
5.	ДАБ-23	41,0±4,4*
6.	ДАБ-20	44,5±3,8*
7.	ДАБ-27	45,7±3,0*
8.	ДАБ-24	46,6±4,1*
9.	ДАБ-28	47,7±3,1*
10.	ДАБ-21	47,7±7,1*
11.	ДАБ-22	49,3±5,9*
12.	ДАБ-12	50,8±5,3*
13.	ДАБ-26	51,0±5,3*
14.	ДАБ-7	54,3±3,7*
15.	ДАБ-25	59,5±8,5*
16.	ДАБ-9	69,8±3,1*#
17.	ДАБ-4	72,2±6,4*#
18.	ДАБ-15	81,2±4,1*#
19.	ДАБ-13	81,6±7,4*#
20.	Ацетилсалициловая кислота	52,1±4,2*

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

#-данные достоверны по отношению к препарату сравнения, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Примечание: n-число проб в группе

В результате проведенных исследований по влиянию 19 производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов было выявлено 8 соединений, ингибирующих данный процесс более, чем на 50%. У дозозависимой

активности с целью расчета IC_{50} (эффективная концентрация, в которой тестируемый образец ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

Высокоактивные тестируемые образцы также были изучены в концентрациях 10 и 1 мкМ. Так, соединение ДАБ-15 в концентрации 10 мкМ ингибировало агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ, на 48,1%, а в концентрации 1 мкМ – на 35,4% и (табл.3.2). IC_{50} антиагрегантной активности данной субстанции при этом составила 6,1 мкМ.

Далее методом регрессионного анализа были установлены значения IC_{50} для соединений под шифрами ДАБ-13, ДАБ-12, ДАБ-4, ДАБ-25, ДАБ-9, ДАБ-7 и ДАБ-26, которые составили 7, 11, 13, 19, 21, 73 и 120 мкМ соответственно.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в концентрации 10 мкМ угнетала процесс агрегации тромбоцитов, индуцированный АДФ, на 20,8 %, а в концентрации 1 мкМ-на 4,6% (табл.3.2). Значение IC_{50} препарата сравнения составило 104 мкМ.

Таким образом, по показателю IC_{50} все исследованные соединения превосходили ацетилсалициловую кислоту, за исключением ДАБ-26.

Наиболее высокую активность проявило соединение под шифром ДАБ-15, которое по показателю IC_{50} превосходило препарат сравнения в 17 раз.

Таблица 3.2. Ингибирующая концентрация (IC₅₀) новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола на модели АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов кролика *in vitro* (M±m) (n=6).

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		Исследуемая концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	ДАБ-15	81,2±4,1 ^{*#}	48,1±3,6 ^{*#}	35,4±5,3 ^{*#}	6,1
2.	ДАБ-13	81,2±7,4 ^{*#}	41,7±2,1 ^{*#}	37,1±4,6 ^{*#}	7,0
3.	ДАБ-12	50,8±5,3 [*]	30,4±4,3 [*]	20,5±2,9 ^{*#}	11,0
4.	ДАБ-4	72,2±6,4 ^{*#}	39,5±3,1 ^{*#}	30,9±4,9 ^{*#}	13,0
5.	ДАБ-25	59,5±8,5 [*]	46,7±3,1 ^{*#}	32,2±4,8 ^{*#}	19,0
6.	ДАБ-9	69,8±3,1 ^{*#}	33,2±6,2 [*]	24,3±3,1 ^{*#}	21,0
7.	ДАБ-7	54,3±3,7 [*]	31,5±4,1 [*]	21,2±3,2 ^{*#}	73,0
8.	ДАБ-26	51,0±5,3 [*]	38,3±2,9 ^{*#}	34,7±3,6 ^{*#}	120,0
9.	Ацетилсалициловая кислота	52,1±4,2 [*]	20,8±3,5 [*]	4,6±1,7	104,0

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

#-данные достоверны по отношению к препарату сравнения, критерий Манна-Уитни (p<0,05)

Примечание:

n-число проб в группе

Исходя из полученных данных, наиболее активное соединение ДАБ-15 было выбрано для дальнейшего изучения величины острой токсичности

(LD₅₀) и исследования на предмет антиагрегантной активности в условиях целого организма.

При исследовании острой токсичности было установлено что введение соединения ДАБ-15 в дозе 50 мг/кг не вызывало гибели мышей-самцов. Состояние животных было в норме, изменений в поведенческом статусе не наблюдалось. При увеличении дозы до 100 мг/кг реакция на звуковые и тактильные раздражители сохранялась, но при этом состояние животных было несколько заторможенным. В данной дозе через 10-15 минут после введения тестируемого образца наблюдалась гибель 40% животных. При визуальном осмотре внутренних органов погибших мышей установлено, что их анатомический рисунок сохранен. Органы брюшной полости, головной мозг были без изменений. Легкие красноватого цвета с участками диапедезного кровоизлияния во всех долях. Печень полнокровна. Слизистая желудка без изменений.

Дальнейшее увеличение вводимой дозы до 150 мг/кг приводило к появлению более выраженных токсических эффектов. При этом наблюдалась заторможенность, снижение реакции на звуковые и тактильные раздражители, тонические судороги и гибель 60% животных через 7-10 минут после введения вещества.

В дозе 200 мг/кг наблюдалась гибель 100% животных. При макроскопическом исследовании внутренних органов было отмечено, что анатомический рисунок органов сохранен. Органы брюшной полости без изменений. Головной мозг имел розоватое окрашивание и признаки полнокровия сосудов. Легкие темного цвета с диапедезными кровоизлияниями во всех долях. Печень полнокровна. Визуальных изменений со стороны желудка не наблюдалось.

При наблюдении за выжившими мышами в последующее 2 недели после введения тестируемого образца ДАБ-15 изменений в поведении не отмечалось, животные реагировали на звуковые и тактильные раздражители. Отдаленной гибели не наблюдалось.

На рисунке 3.1 представлена зависимость количества погибших мышей (%) от логарифма дозы ДАБ-15 через 14 суток после однократного внутрибрюшинного введения.

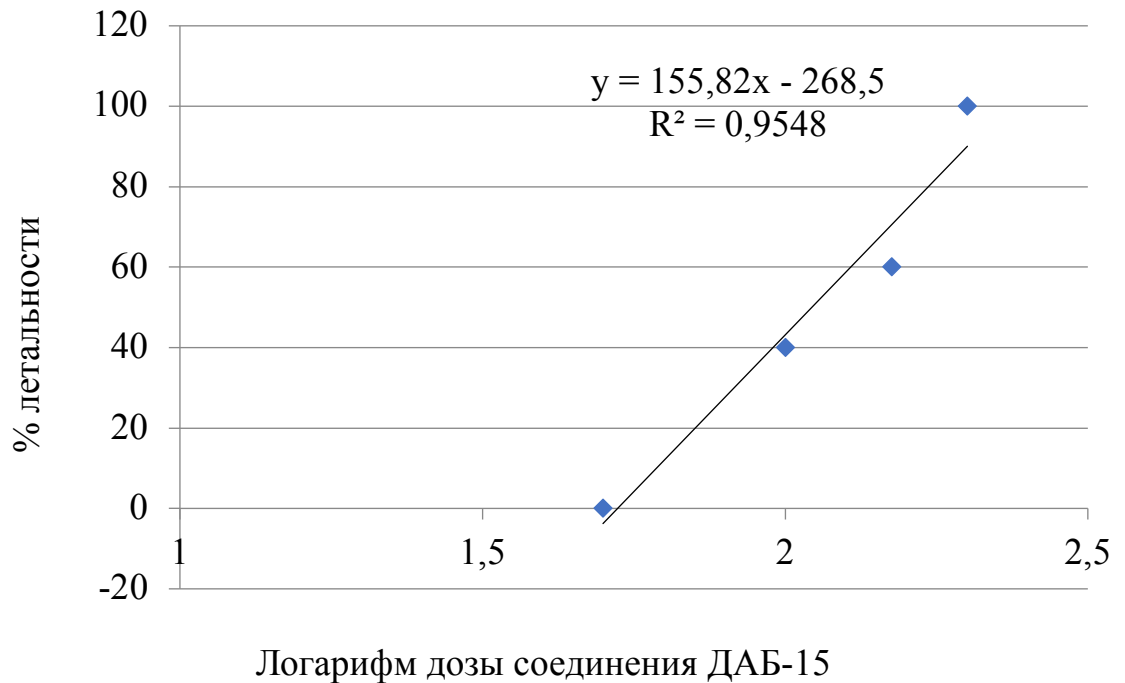


Рис. 3.1. Гибель мышей самцов через 14 суток после однократного внутрибрюшинного введения соединения ДАБ-15.

Значение LD_{50} для вещества ДАБ-15 составило 118 мг/кг. Исходя из величины острой токсичности при внутрибрюшинном пути введения тестируемого соединения и согласно классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 его можно отнести к 3 классу умеренно-токсичных веществ [Березовская И.В., 2003; Саноцкий И.В., 1975].

Наличие данных исследований *in vitro* и острой суточной токсичности позволили в дальнейшем рассчитать условную широту терапевтического действия (условный терапевтический индекс (УТИ)) (табл. 3.3.). Исследуемое соединение ДАБ-15 по значению УТИ превосходило ацетилсалициловую кислоту в 3,6 раза.

Таблица 3.3. Антиагрегантная активность (IC_{50}), величина острой суточной токсичности (LD_{50}), и условный терапевтический индекс (УТИ) ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты.

№ п/п	Тестируемые образцы	IC_{50} , мкМ	IC_{50} , мг/кг	LD_{50} , мг/кг	УТИ LD_{50}/EC_{50}
1.	ДАБ-15	6,1	2,0	118	59
2.	Ацетилсалициловая кислота	104	18,8	310	16,48

3.2. Зависимость антиагрегантной активности производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола от их химической структуры

Так как все исследуемые соединения, в той или иной степени, проявили антиагрегантный эффект, то можно заключить, что определенный вклад в активность производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола вносит базовая структура. Введение дополнительных заместителей в положения 8 и 9 базовой структуры приводит к резкому снижению антиагрегантной активности. Так, соединение ДАБ-15 и ДАБ-28 имеют одинаковый заместитель в положении N¹¹, но уровень активности образца под шифром ДАБ-28 практически в два раза ниже, что может быть обусловлено дополнительным включением двух метильных радикалов в положения 8 и 9 базовой структуры. Аналогичная зависимость наблюдается у соединений под шифрами ДАБ-27 и ДАБ-29 (табл. 3.4.).

Большой вклад в активность соединений вносит комбинация структуры цепи радикала R₁ и атома галогена в пара-положении. Так, в случае наличия в 4 положении атома фтора, в пара-положении должна присутствовать короткая цепь - метильный мостик, как у соединения ДАБ-15, обладающего наиболее выраженной антиагрегантной активностью. Удлинение цепи

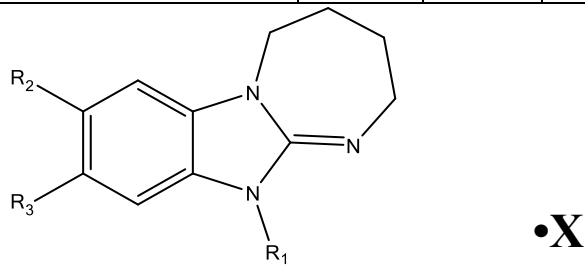
заместителя (-4-фтор-1-этоксифенил) приводит к потере активности (соединение ДАБ-25) (табл. 3.4.).

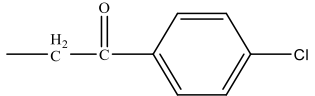
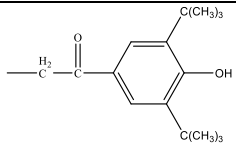
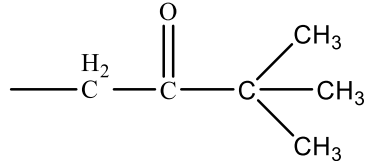
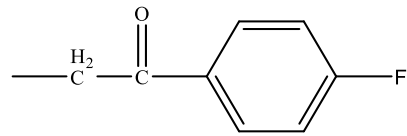
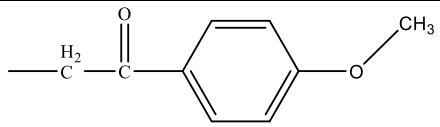
Так же важным условием является наличие радикала R_1 именно в положении N^{11} . Перемещение радикала в положение N^1 приводит к значительной потере антиагрегантной активности (табл. 3.4.).

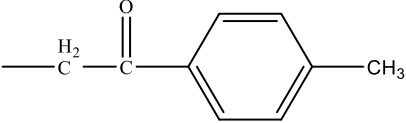
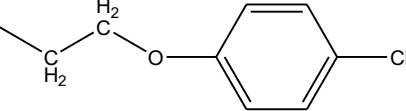
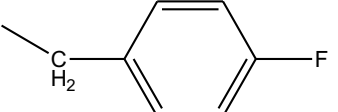
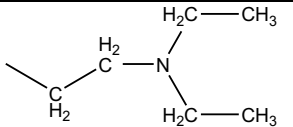
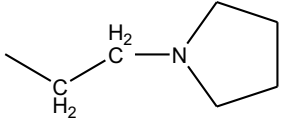
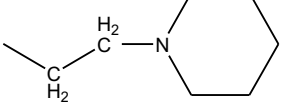
Включение в структуру заместителя гетероциклических фрагментов так же приводит к значительному снижению антиагрегантной активности. Наряду с этим и наличие алифатического заместителя так же нежелательно. Так, соединение ДАБ-20 с диэтиламиноэтильным радикалом не имеет выраженной антиагрегантной активности (табл. 3.4.).

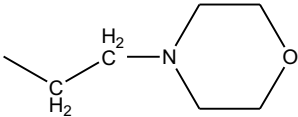
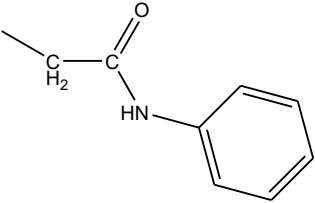
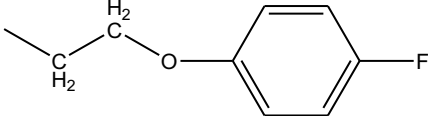
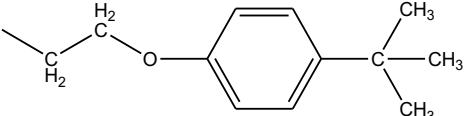
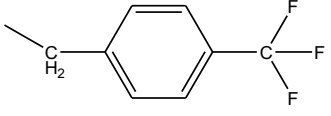
Включение в структуру заместителя пространственно сложных радикалов приводит к потере активности более чем в 2 раза. Так, при наличии в пара-положении бензольного кольца заместителя трехзамещенного атома углерода активность снижается на 35%. Наименьшую активность исследуемые соединения проявляют в случае наличия в химической структуре заместителя фрагмента экранированного фенола. Так, в положении R_1 у образца под шифром ДАБ-5 имеется заместитель -1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-этан-1-он, антиагрегантная активность вещества при этом составила 32,8% (табл. 3.4.).

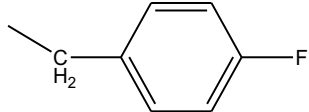
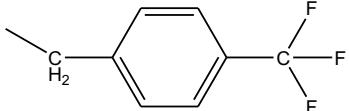
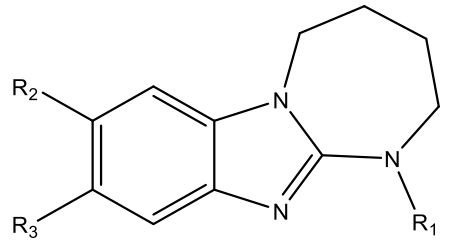
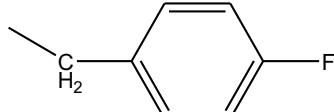
Таблица 3.4. Зависимость антиагрегантной активности от химического строения производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола

Тестируемые образцы	Структура заместителя			Солевой компонент (•X)	Антиагрегантная активность (подавление АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов), Δ% (M±m) (n=6)
	R1	R2	R3		
1	2	3	4	5	6
 <p>11-(2-пропанон)-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-<i>a</i>]бензимидазолы</p>					
1	2	3	4	5	6

ДАБ-4	 -1-(4-хлорфенил)-этан-1-он	-Н	-Н	HBr	-72,2±6,4*#
ДАБ-5	 -1-(3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил)-этан-1-он	-Н	-Н	HBr	-32,8±3,2
ДАБ-7	 -2,2-диметилбутан-3-он	-Н	-Н	HBr	-54,3±3,7*
ДАБ-8	 -1-(4-фторфенил)-этан-1-он	-Н	-Н	HBr	-40,3±4,3
ДАБ-9	 -1-(4-метоксифенил)-этан-1-он	-Н	-Н	HBr	-69,8±3,1*#

ДАБ-12	 -1-(4-метилфенил)-этан-1-он	-Н	-Н	HBr	-50,8±5,3*
ДАБ-13	 -4-хлор-1-этоксифенил	-Н	-Н	HCl	-81,6±7,4*#
ДАБ-15	 -4-фтор-1-метилфенил	-Н	-Н	HCl	-81,2±4,1*#
ДАБ-20	 -диэтиламиноэтил	-Н	-Н	2HCl	-44,5±3,8*
ДАБ-21	 -1-этилпирролидин	-Н	-Н	2HCl	-47,7±7,1*
ДАБ-22		-Н	-Н	2HCl	-49,3±5,9*

	-1-этилпиперидин				
ДАБ-23	 -1-этилморфолин	-Н	-Н	2HCl	-41,0±4,4*
ДАБ-24	 -N-фенилацетамид	-Н	-Н	HCl	-46,6±4,1*
ДАБ-25	 -4-фтор-1-этоксифенил	-Н	-Н	HCl	-59,5±8,5*
ДАБ-26	 -4-третбутил-1-этоксифенил	-Н	-Н	HBr	-51,0±5,3*
ДАБ-27	 -4-трифторметил-1-метилфенил	-Н	-Н	HCl	-45,7±3,0*

ДАБ-28	 -4-фтор-1-метилфенил	-CH ₃	-CH ₃	HCl	-47,7±3,0*
ДАБ-29	 -4-трифторметил-1-метилфенил	-CH ₃	-CH ₃	HCl	-34,4±4,0*
 1-замещенные 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2- <i>a</i>]бензимидазолы					
1	2	3	4	5	6
ДАБ-30	 -4-фтор-1-метилфенил	-H	-H	HCl	-39,7±6,4*

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

#-данные достоверны по отношению к препарату сравнения, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Примечание: n-число проб в группе

Таким образом, в ходе проведенного анализа зависимости антиагрегантной активности от химической структуры производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazепино[1,2-*a*]бензимидазола установлено, что высокий уровень активности обуславливает наличие заместителя только в положении N¹¹. Структура заместителя должна содержать бензольное кольцо с атомом галогена в пара-положении и не должна быть пространственно усложнена.

3.3. Изучение антиагрегантного действия наиболее активного соединения под шифром ДАБ-15 в опытах *in vivo*.

Для дальнейшего более глубокого изучения было выбрано соединение ДАБ-15 (рис. 3.1.).

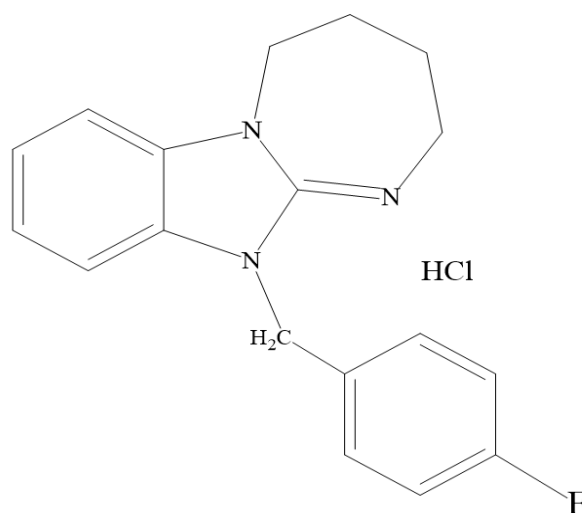


Рис. 3.1. Структурная формула соединения ДАБ-15 (11-(4-фторбензил)-2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazепино[1,2-*a*]бензимидазола гидрохлорид)

Проведенные эксперименты позволили установить, что соединение ДАБ-15 обладает выраженным дозозависимым антиагрегантным действием при однократном внутривенном введении крысам. Уровень агрегации в группе контрольных животных составил 33,1 отн. ед. (табл. 3.5.). Соединение ДАБ-15 в дозе 2 мг/кг (доза, соответствующая значению IC₅₀ антиагрегантной активности *in vitro*) достоверно относительно контрольных значений снижало агрегацию тромбоцитов до 19,4 отн. ед., что

соответствовало ингибированию агрегации тромбоцитов на 36,7% (табл. 3.5.). С целью расчета ED₅₀ (эффективная доза, в которой соединение ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%) исследованные дозы были увеличены до 4; 9 и 17 мг/кг. Так в дозе 4 мг/кг соединение ДАБ-15 блокировало АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 45,8%, а в дозах 9 и 17 мг/кг - на 63,2 и 85,1% соответственно. ED₅₀ антиагрегантной активности соединения ДАБ-15 составила 5,6 мг/кг (табл. 3.5.).

Таблица 3.5. Антиагрегантная активность соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при однократном внутривенном введении белым беспородным крысам самцам на модели АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов *in vivo*, (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень агрегации тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль		33,1±2,5		
2.	ДАБ-15	17	4,6±1,2	85,1±4,1*	5,6
		9	11,3±0,7	63,2±2,3*	
		4	16,6±1,3	45,8±4,3*	
		2	19,4±1,8	36,7±5,8*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	19	21,5±1,6	29,7±8,1*	27
		28	13,1±0,5	57,3±4*	
		38	10,9±0,8	64,4±5,5*	
4.	Клопидогрел	44	2,2±0,5	93,7±1,4*	7,4
		22	7,4±1,0	79,3±2,8*	
		11	14,1±0,9	60,4±2,6*	
		5,5	20,8±2,6	41,5±7,3*	

*-данные достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни, p≤0,05)

Примечания: n-число животных в группе

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе, соответствующей значению IC₅₀ антиагрегантной активности *in vitro*- 19 мг/кг, ингибировала агрегацию тромбоцитов на 29,7%. В дозах 28 и 38 мг/кг препарат сравнения приводил к снижению агрегации тромбоцитов на 57,3 и 64,4%

соответственно. Значение ED_{50} ацетилсалициловой кислоты при этом составило 27 мг/кг (табл. 3.4.).

В качестве препарата сравнения также было изучено другое антиагрегантное средство - клопидогрел. В дозе 44 мг/кг (доза, эквимолярная дозе 19 мг/кг ацетилсалициловой кислоты) клопидогрел достоверно снижал агрегацию тромбоцитов на 93,7%. При дальнейшем исследовании дозы препарата сравнения были снижены до 22; 11 и 5,5 мг/кг, в результате чего клопидогрел угнетал процессы агрегации тромбоцитов на 79,3; 60,4 и 41,5% соответственно. Значение ED_{50} для клопидогрела составило 7,4 мг/кг.

Таким образом, вещество ДАБ-15 при однократном внутрижелудочном введении в опытах *in vivo* оказалось активным в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов крыс и по ED_{50} превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 4,8 раза, а препарат сравнения клопидогрел-в 1,3 раза.

3.4. Заключение

В результате проведенного исследования 19 новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола *in vitro* было выявлено 8 высокоактивных соединений и рассчитана их IC_{50} . По полученным значениям было выбрано самое активное соединение под шифром ДАБ-15, превосходящее по IC_{50} препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 17 раз, а по значению УТИ в 3,6 раза.

При исследовании тестируемого соединения на предмет острой токсичности (LD_{50}) было выявлено, что при внутрибрюшинном пути введения тестируемого соединения в возрастающих дозах согласно классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 его можно отнести к 3 классу умеренно-токсичных веществ [Березовская И.В., 2003; Саноцкий И.В., 1975].

Изучение антиагрегантной активности ДАБ-15 в условиях целого организма *in vivo* на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов также продемонстрировало достоверно высокую эффективность. По значению ED₅₀ соединение ДАБ-15 превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 4,8 и 1,3 раза соответственно.

Таким образом, в связи с наличием у нового производного 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола под лабораторным шифром ДАБ-15 высокой способности подавлять процессы агрегации тромбоцитов *in vitro* и *in vivo* является обоснованным его дальнейшее углубленное исследование специфической фармакологической активности на различных моделях тромбозов в норме и при экспериментальной патологии.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-15 НА ПРОЦЕССЫ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ.

Артериальные тромбозы являются важным фактором, который определяет исход заболеваний сердечно-сосудистой системы, формируются при высокой скорости кровотока в результате повреждения сосудистой стенки и состоят преимущественно из скоплений тромбоцитов, фиксированных между собой фибриновыми нитями (белые тромбы) [Quillard T., 2017]. Поэтому в рамках изучения специфической активности необходимо исследовать антитромботическое действие потенциальных антиагрегантных средств на моделях артериальных тромбозов у интактных животных и животных с экспериментальной патологией.

Патологические процессы, связанные с тромбообразованием также затрагивают систему нижней полой вены, поскольку анатомически это самый крупный сосуд в организме человека, и он играет главную роль в кровоснабжении правого предсердия. Чаще всего именно в нижней полой вене возникает тромб [Antonio A.Z., 2017; Aviña-Zubieta A.J., 2017]. Поэтому необходимо изучить антитромботическую активность соединения ДАБ-15 на модели венозного тромбоза.

Время кровотечения - это промежуток времени между повреждением сосуда, появлением первой капли крови и полной остановкой кровотока. Увеличение этого промежутка может наблюдаться при приеме антиагрегантных и антикоагулянтных средств [Alfredsson J., 2017; Jones W.S., 2018].

4.1. Антитромботическое действие производного диазепино[1,2-*a*]бензимидазола соединения ДАБ-15

Тромбоцитам отводится ключевая роль в развитии таких патологических состояний, как артериальные и венозные тромбозы. Последние являются ведущей причиной развития ишемического инсульта, инфаркта миокарда, тромбоэмболий [Курка D., 2018]. В связи с этим возникает необходимость исследования потенциальных антиагрегантных средств на различных моделях тромбоцит-зависимых артериальных и венозных тромбозах.

4.1.1. Исследование антитромботического действия соединения ДАБ-15 на модели Global Thrombosis Test (по Горогу)

На 12 белых беспородных крысах самцах была проведена оценка антитромботического и тромболитического действия исследуемого соединения при однократном внутрижелудочном введении крысам с дальнейшим исследованием биологического материала *ex vivo*.

В качестве критерия оценки антитромботической активности использовали время наступления окклюзии, а для оценки тромболитической активности - время лизиса в тест-системе Горога.

В группе контроля среднее время окклюзии составило 93,6 с. Соединение ДАБ-15 приводило к достоверному увеличению времени окклюзии до 162,6 с (табл. 4.1.). Время лизиса под действием тестируемого образца было сравнимо с контролем и составило 617,5с. (табл. 4.1.).

Таблица 4.1. Антитромботическая активность соединения ДАБ-15 на модели Global Thrombosis Test (по Горогу) в дозе ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время окклюзии, с	Время лизиса, с
1.	Контроль		93,6±2,1	628,8±29,0
2.	ДАБ-15	5,6	162,6±23,1*#	617,5±4,7
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	117,5±4,1*	629,3±15,7
4.	Клопидогрел	7,4	150,0±4,0*	631,5±17,1

Примечания: n-число животных в группе

*-данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

#- данные достоверны относительно ацетилсалициловой кислоты, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Таким образом, данная модель позволяет сделать вывод о наличии антитромботических свойств соединения ДАБ-15.

4.1.2. Изучение антитромботической активности соединения ДАБ-15 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс

Эксперименты были выполнены на 60 нелинейных крысах-самцах массой 250-300 г.

Как видно из таблицы 4.2. среднее время полной окклюзии сонной артерии крыс контрольной группы, которым вводился растворитель (вода дистиллированная), составило 19,4 мин.

Соединение ДАБ-15 в дозе 33 мг/кг достоверно пролонгировало время образования тромба до 31,5 мин, что на 62,3% ($p < 0,05$) выше значений контроля. Далее, с целью установления значения ED_{50} , тестируемый образец ДАБ-15 был изучен в дозах 17 и 9 мг/кг. В указанных дозировках происходило достоверное увеличение времени окклюзии до 27,3 и 21,0 мин соответственно. Величина ED_{50} для соединения ДАБ-15 при этом составила 23,4 мг/кг (табл. 4.2.).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в исходной дозе 19 мг/кг увеличивала время окклюзии на 16,8% ($p < 0,05$). В дозах 100 и 150 мг/кг ацетилсалициловая кислота пролонгировала время образования тромба на 35,7 ($p < 0,05$) и 68,4% ($p < 0,05$) соответственно. Значение ED_{50} для ацетилсалициловой кислоты составило 119 мг/кг (табл. 4.2.).

Второй исследуемый препарат сравнения клопидогрел в дозе 44 мг/кг, увеличивал время образования тромба в сонной артерии крыс на 12,5% ($p < 0,05$). Дальнейшее увеличение дозы до 88 и 122 мг/кг показало, что клопидогрел увеличивает время полной окклюзии на 35,7 ($p < 0,05$) и 54,6% ($p < 0,05$) соответственно. ED_{50} для клопидогрела при этом составила 113,9 мг/кг (табл. 4.2.).

Таблица 4.2. Влияние соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	$\Delta\%$ продолгования времени образования тромба	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль		19,4±0,4		
2.	ДАБ-15	9	21,0±0,6*	8,2±2,9*	23,4
		17	27,3±1,0*	40,4±5,3*	
		33	31,5±0,6*	62,3±3,3*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	19	20,8±1,3*	16,8±6,2*	119
		100	26,3±1,4*	35,7±7,5*	
		150	32,7±3,2*	68,4±16,4*	
4.	Клопидогрел	44	21,8±0,6*	12,5±3,3*	113,9
		88	26,3±0,6*	35,7±3,3*	
		122	30,0±0,4*	54,6±2,1*	

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

Примечания: n-число животных в группе

Таким образом, на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III), соединение ДАБ-15 продемонстрировало выраженную антитромбогенную активность.

4.1.3. Исследование антитромботического действия соединения ДАБ-15 на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током

Исследования выполнены на 72 беспородных крысах самцах массой 250-300 г. Среднее время окклюзии каротидной артерии в контрольной группе составило 15,2 мин. Исследуемое соединение ДАБ-15 в дозе 33 мг/кг достоверно увеличивало время образования тромба на 165,4% ($p < 0,05$). Далее доза вещества была уменьшена до 17 мг/кг, в которой соединение ДАБ-15 оказало антитромботический эффект на 86,4% ($p < 0,05$). Для расчета величины ED_{50} соединение ДАБ-15 было изучено дополнительно в дозах 9 и 4,5 мг/кг. Время образования тромба в сонной артерии при этом увеличивалось на 51,3% ($p < 0,05$) и 39,8% ($p < 0,05$) соответственно. ED_{50} для тестируемого соединения ДАБ-15 составила 7,9 мг/кг (табл. 4.3.).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 19 мг/кг достоверно увеличивала время окклюзии на 38,2% ($p < 0,05$). Также, данный препарат был изучен в дозах 25, 50 и 100 мг/кг, в которых увеличивал время образования тромба в сонной артерии на 62,3% ($p < 0,05$), 107,2% ($p < 0,05$) и 142,3% ($p < 0,05$) соответственно. Значение ED_{50} антитромботической активности ацетилсалициловой кислоты при этом составило 21,4 мг/кг (табл. 4.3.).

Другой референсный препарат клопидогрел в дозе 22 мг/кг приводил к достоверному увеличению времени окклюзии на 113,8% ($p < 0,05$). Дальнейшее снижение дозы до 11 и 5,5 мг/кг показало, что клопидогрел оказывает антитромботическое действие на 68,9% ($p < 0,05$) и 37,1% ($p < 0,05$) соответственно. Эффективная доза ED_{50} для клопидогрела составила 7,7 мг/кг (табл. 4.3.).

Таблица 4.3. Влияние соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	$\Delta\%$ пролонгирования времени образования тромба	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль		15,2±0,4		
2.	ДАБ-15	4,5	21,3±0,4*	39,8±2,5*	7,9
		9	23,0±0,4*	51,3±2,5*	
		17	28,3±0,6*	86,4±3,7*	
		33	40,3±1,4*	165,4±9,1*	
3.	Ацетилсалициловая кислота	19	21,0±0,5*	38,2±3,8*	21,4
		25	24,6±0,4*	62,3±2,8*	
		50	31,5±0,7*	107,2±4,7*	
		100	36,8±0,9*	142,3±6,2*	
4.	Клопидогрел	5,5	20,8±0,6*	37,1±4,0*	7,7
		11	25,7±1,0*	68,9±6,3*	
		22	32,5±1,1*	113,8±7,0*	

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

Примечания: n-число животных в группе

Проведенные исследования позволяют заключить, что соединение ДАБ-15 обладает выраженной антитромботической активностью на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током. При

сравнительной оценке антитромботической активности соединения ДАБ-15 и известных антиагрегантных средств ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела оказалось, что на данной модели тромбоза тестируемый образец ДАБ-15 превосходит по значению ED_{50} ацетилсалициловую кислоту в 2,7 раза и был сравним с клопидогрелем (рис. 4.1.).

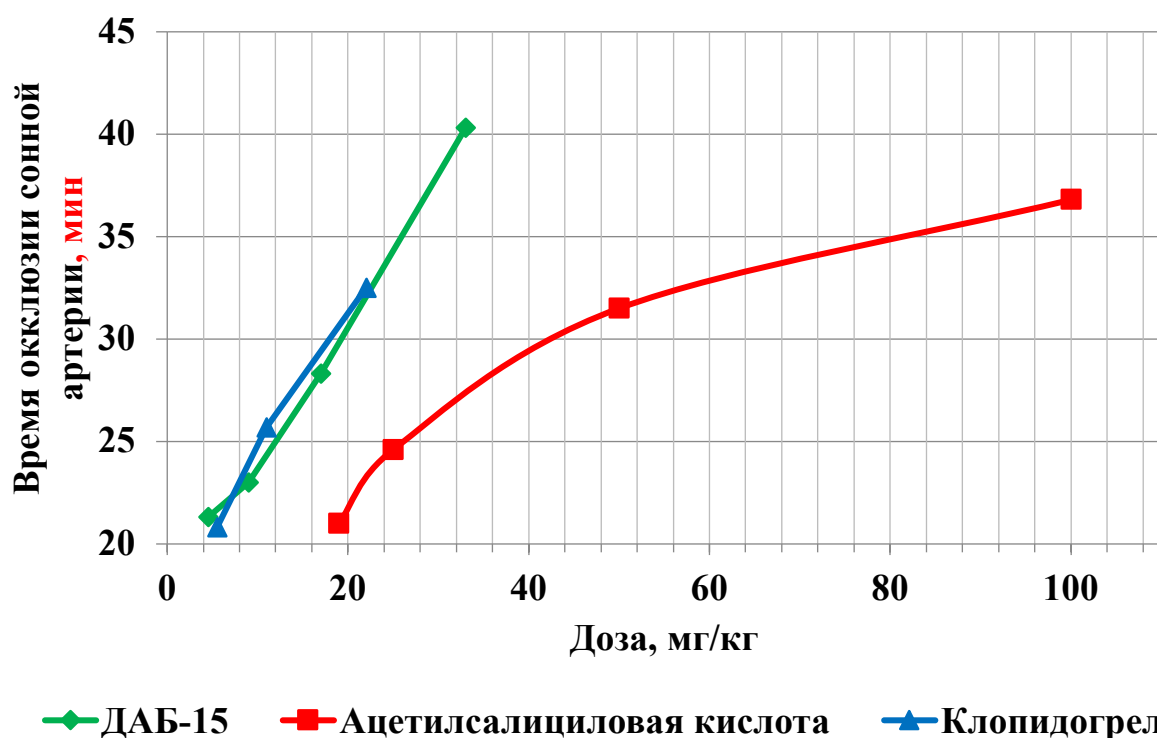


Рис. 4.1. Антитромботическая активность соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током.

4.1.4. Влияние соединения ДАБ-15 на выживаемость мышей при моделировании генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза

Эксперименты были выполнены на 40 белых беспородных мышамсамцах. Согласно литературным данным при моделировании данного вида тромбоза в группе контрольных животных наблюдается гибель 95-100% животных [Kim J.H., 2016]. Так, в ходе проведенного исследования было установлено, что в группе контроля гибель животных составила 100%. При этом у животных наблюдалась выраженная асфиксия, характер дыхания был поверхностный, учащенный. Картина смерти также сопровождалась тоническими судорогами и выраженным экзофтальмом, парезом задних конечностей. Смерть наступала от удушья в течение 1 минуты после внутривенного введения смеси адреналина с коллагеном.

Однократное внутрижелудочное введение тестируемого образца ДАБ-15 в дозе 5,6 мг/кг приводило к выживанию 90% животных (рис. 4.2.). При этом у выживших мышей наблюдалось учащенное дыхание, которое полностью восстанавливалось спустя 5-10 минут. У погибших животных наблюдались признаки асфиксии, которые проявлялись в значительно меньшей степени по сравнению с контрольной группой. Смерть наступала спустя 10-15 минут, при этом наблюдалось более активное поведение животного в сравнении с группой контроля.

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота увеличивала выживаемость животных до 60% (рис. 4.2.).

Исследование второго препарата сравнения клопидогрела позволило заключить, что по влиянию на выживаемость мышей клопидогрел был сравним с соединением-лидером ДАБ-15. Уровень выживаемости мышей в группе клопидогрела также составил 90% (рис. 4.2.).

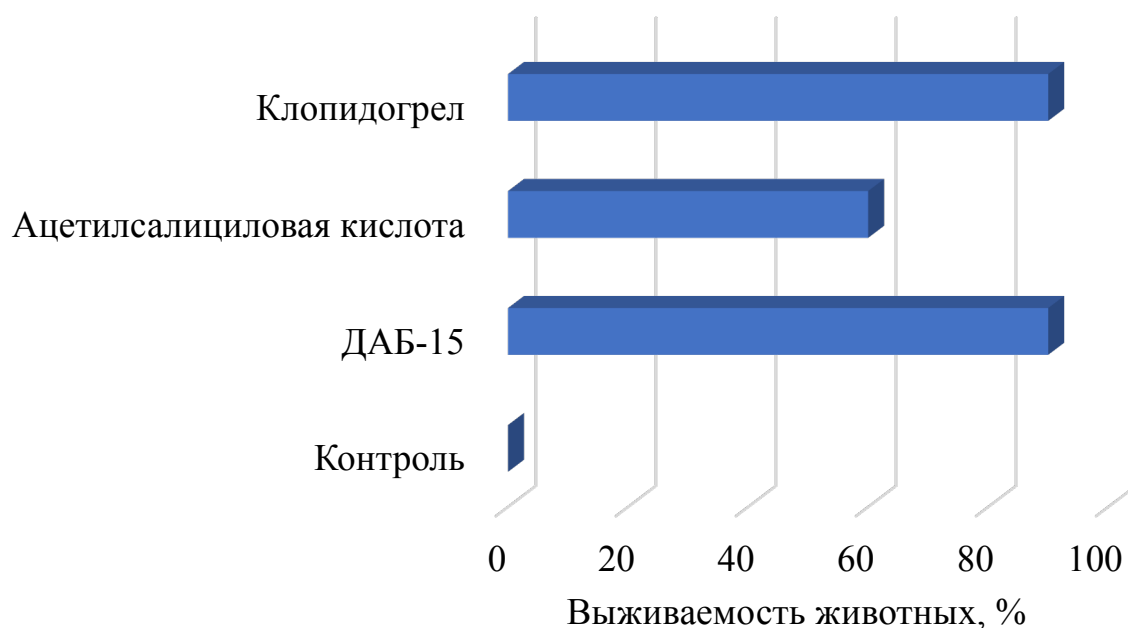


Рис. 4.2. Влияние соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на выживаемость белых беспородных мышей на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза

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

#-данные достоверны относительно препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты, критерий Фишера ($p < 0,05$)

Гистологическая оценка внутренних органов позволила заключить, что тромбоэмболии подверглись только легкие животных, в то время как в других органах тромбы отсутствовали, что соответствует результатам, полученным другими исследователями [DiMinno G., 1983].

Критерием оценки антитромботического действия тестируемых образцов также были морфометрические параметры тромбов в сосудах легких мышей, а именно площадь тромбов на срезе легкого и периметр тромбов.

В образцах легких контрольных животных преобладали альвеолы средних размеров, в значительной части сосудов микроциркуляторного русла были обнаружены тромбы, адгезированные к сосудистой стенке и

находящиеся в просвете сосуда. В отдельных артериолах обнаруживались смешанные тромбы (рис. 4.3.).

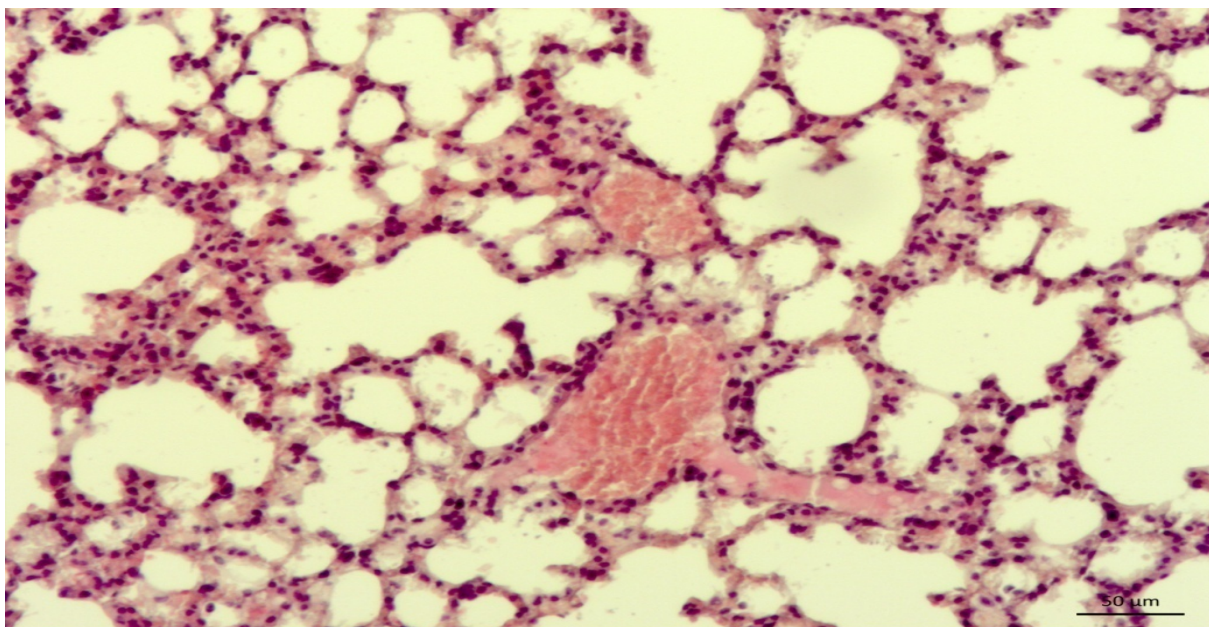


Рис. 4.3. Гистологический срез легкого животного контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Об. X 10.

Отмечалось выраженное расширение тромбированных капилляров межальвеолярных перегородок. В ряде случаев подобные изменения сопровождались очаговыми повреждениями сосудистой стенки капилляров и респираторного эпителия. В венах и венулах обнаруживались красные тромбы. При проведении морфометрического исследования выявлено, что относительная площадь тромбов на срезе легкого составила 8,4%, средняя площадь тромбов – 13684,6 мкм², периметр тромбов – 537,6 мкм (табл. 4.3.).

В группе животных, получавших соединение ДАБ-15, преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Выявлялись небольшие единичные тромбы, преимущественно, в сосудах венозного типа (рис. 4.4.). Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия, обнаружены участки умеренно выраженных кровоизлияний, явления диапедеза эритроцитов в

межалвеолярные перегородки и просветы альвеол. В отдельных случаях обнаруживались гемосидеробласты и скопления гемосидерина. Средняя и относительная площадь тромбов при этом составили $918,5 \text{ мкм}^2$ и $3,2\%$ соответственно. Периметр тромбов равнялся $218,2 \text{ мкм}$ (табл. 4.4.).

Выявленные изменения морфометрических параметров в целом соответствуют качественным структурным изменениям в сосудах легких и свидетельствуют о выраженных протективных свойствах соединения ДАБ-15.

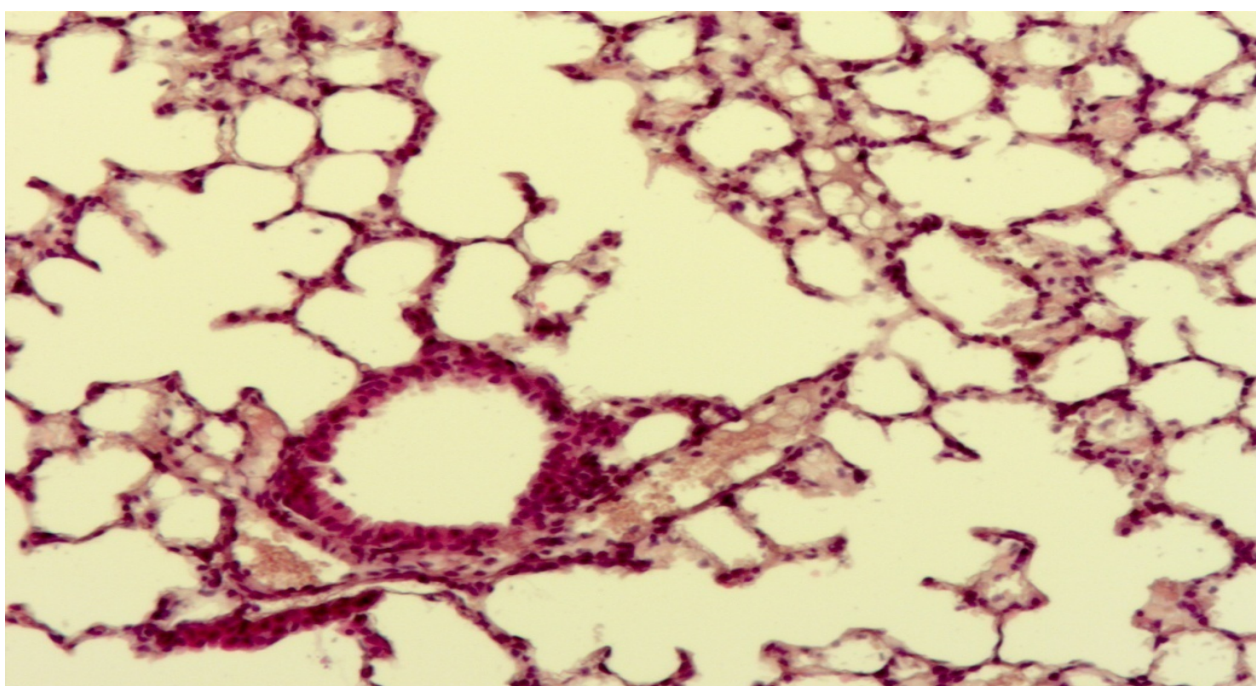


Рис. 4.4. Гистологический срез легкого животного, получавшего соединение ДАБ-15

Окраска гематоксилином и эозином. Об. X 10.

При гистологическом исследовании легких животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, встречались альвеолы средних размеров, а также участки чередования эмфизематозно – расширенных альвеол и альвеол меньших размеров с выраженным полнокровием капилляров межалвеолярных перегородок. У половины животных отмечались небольшие очаги кровоизлияний в межалвеолярные перегородки и просветы

альвеол, а также наблюдалось полнокровие капилляров. Выявлялась единичные тромбы в венах и в артериях микроциркуляторного русла (рис. 4.5.).

У четверти животных преобладали нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок и других сосудов микроциркуляторного русла. Выявлялись небольшие единичные тромбы, преимущественно, в сосудах венозного типа. Отмечалось утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия.

У другой четверти животных наблюдались выраженные нарушения кровообращения, множественные кровоизлияния в межальвеолярные перегородки и просветы альвеол, полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок. В сосудах выявлялась единичные тромбы, адгезированные к сосудистой стенке. Наблюдалось выраженное расширение тромбированных капилляров межальвеолярных перегородок.

Отмечалось снижение относительной площади тромбов на срезе легкого до 4,9% у животных, получавших ацетилсалициловую кислоту. При исследовании средней площади тромбов на срезе определялось снижение данного параметра до 4582,1 мкм². Периметр тромбов составил 408,1 мкм (табл. 4.4.).

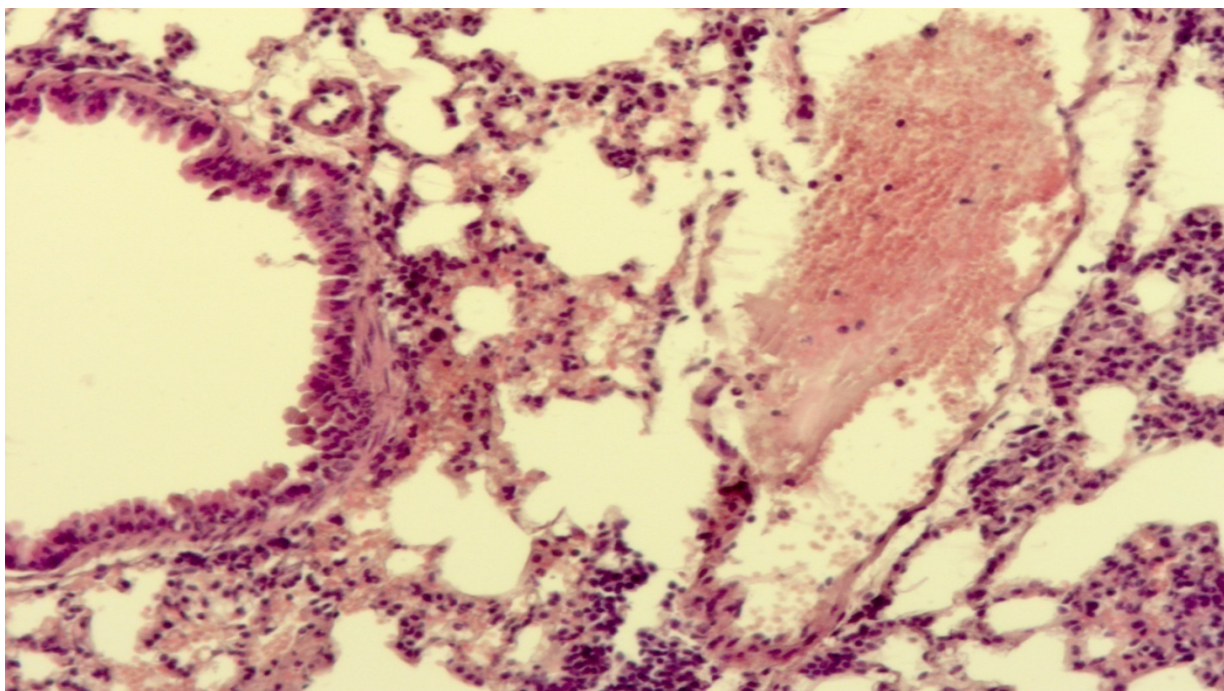


Рис. 4.5. Гистологический срез легкого животного, получавшего ацетилсалициловую кислоту

Окраска гематоксилином и эозином. Об. X 10.

При исследовании препарата сравнения клопидогрел отмечалось разнообразное по выраженности нарушение кровообращения. У большинства животных выявлялись единичные тромбы в венах, как правило, адгезированные к сосудистой стенке (рис. 4.6.). Наблюдались множественные кровоизлияния в межальвеолярные перегородки, просветы альвеол, в интерстиций перибронхиальных отделов. Тромбы практически отсутствовали. Отмечены периваскулярные кровоизлияния, единичные тромбы в венах. Обнаружено наличие умеренно выраженной перибронхиальной лимфоидной инфильтрации, а также единичные тромбы в венах.

Средняя площадь тромбов на срезах легких мышей, получавших клопидогрел, составила $3249,9 \text{ мкм}^2$, периметр - $320,2 \text{ мкм}$, относительная площадь - $4,0\%$ (табл. 4.4.)

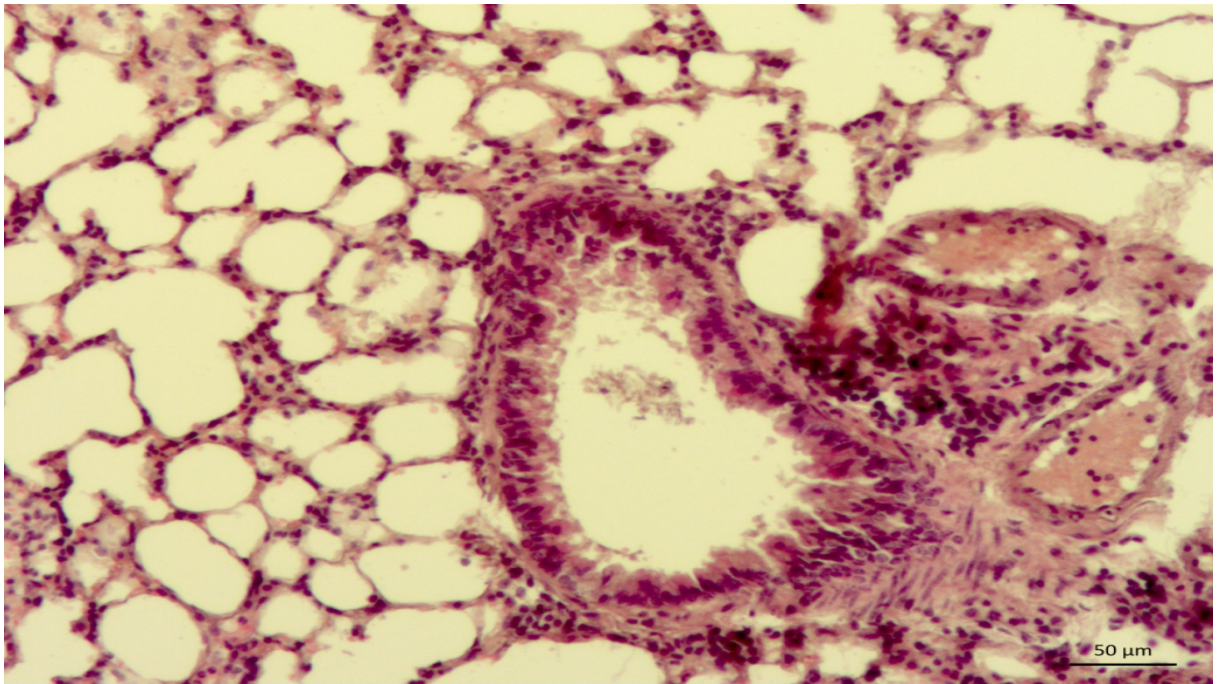


Рис. 4.6. Гистологический срез легкого животного, получавшего клопидогрел

Окраска гематоксилином и эозином. Об. X 10.

Таблица 4.4. Влияние соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo*, на изменение некоторых морфометрических параметров тромбов в сосудах легких мышей (M±m) (n=10)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Средняя площадь тромбов, мкм ²	Периметр тромбов, мкм	Относительная площадь тромбов, %
1.	Контроль		13684,6±3662,9	537,6±110,7	8,4±1,3
2.	ДАБ-15	5,6	918,5±135,7*	218,2±40,0*	3,2±0,5*
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	4582,1±742,2*	408,1±87,1	4,9±0,4*
4.	Клопидогрел	7,4	3249,9 ±424,2*	320,2±59,9	4,0±0,6*

Примечание: n-число животных в группе

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

Таким образом, проведенное исследование позволило заключить, что соединение ДАБ-15 обладает выраженной антитромботической активностью на модели системного адреналин-коллагенового тромбоза у мышей. По критерию выживаемости соединение ДАБ-15 в 1,5 раза превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и сравнимо с препаратом клопидогрел. По изученным морфометрическим показателям исследуемое соединение значительно превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения. Так, по показателю средней площади тромбов на срезах легких мышей соединение-лидер превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 5 и 3,5 раза соответственно.

Также соединение ДАБ-15 приводило к снижению периметра тромбов на срезах в 1,9 раза по отношению к ацетилсалициловой кислоте, и в 1,5 в отношении препарата сравнения клопидогрел. В ходе гистологического исследования также наблюдалось снижение относительной площади тромбов на срезах легких мышей, получавших тестируемый образец ДАБ-15. По данному показателю исследуемое соединение превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,5 и 1,2 раза соответственно.

4.1.5. Изучение антитромботической активности соединения ДАБ-15 на модели венозного тромбоза, инициированного перевязкой нижней полой вены крыс

Эксперименты выполнены на 30 белых беспородных крысах самцах согласно описанному методу [Henke P.K., 2007]. В группе ложнопериорированных животных тромбы в системе нижней полой вены обнаружены не были, что говорит об отсутствии влияния хирургических манипуляций на тромбообразование (табл. 4.5.).

Средняя масса тромбов, извлеченных из нижней полой вены контрольных крыс, составила 91,2 мг (табл. 4.5.). Однократное внутрижелудочное введение соединения ДАБ-15 приводило к достоверному снижению массы тромбов на 51,2% ($p < 0,05$), что составляло 44,5 мг (табл. 4.5.).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота достоверно уступала по активности соединению ДАБ-15. Средняя масса тромбов, извлеченных из вен крыс, получавших данный препарат сравнения, составила 68,6 мг, что на 24,8% достоверно ($p < 0,05$) ниже показателя группы контроля (табл. 4.5.).

Клопидогрел приводил к снижению массы тромбов до 59,2 мг (табл. 4.5.).

Таблица 4.5. Антитромботическая активность соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на модели тромбоза нижней полой вены крыс в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Масса тромба, мг
1.	ЛО		0
2.	Контроль	-	91,2±4,9
3.	ДАБ-15	5,6	44,5±1,2 ^{*#}
4.	Ацетилсалициловая кислота	27	68,6±2,83 [*]
5.	Клопидогрел	7,4	59,2±1,64 [*]

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

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

Примечания: n-число животных в группе; ЛО-ложнооперированные животные

4.2. Исследование антитромботического действия соединения ДАБ-15 на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс с экспериментальным инфарктом миокарда

Важной составляющей доклинического изучения потенциальных антиагрегантных средств является изучение их специфической активности не только на интактных животных, но и на животных с экспериментальным инфарктом миокарда.

В группе животных с экспериментальным некоронарогенным инфарктом миокарда тромб в сонной артерии образовывался уже через 14,5 мин, что свидетельствует о повышении тромбогенного потенциала крови в условиях данной патологии. В период 1-6 дней постинфарктного периода возрастает риск развития тромбозов, так как происходит активация и увеличение агрегационной активности циркулирующих в крови тромбоцитов [Shi P., 2017]. При этом соединение ДАБ-15 при однократном внутрижелудочном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда достоверно пролонгировало время наступления полной окклюзии сосуда на 86,2% по сравнению с контрольными животными.

Таблица 4.6. Антитромботическая активность соединения ДАБ-15 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50% р-ром хлорида железа (III) в условиях некоронарогенного инфаркта миокарда (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% пролонгирования времени образования тромба
1.	Контроль (без патологии)		19,4±0,4	
2.	Контроль (инфаркт)		14,5±0,7	
3.	ДАБ-15	5,6	27,0±1,0* [#]	86,2±6,7*
4.	Ацетилсалициловая кислота	27,0	17,5±0,6*	22,4±3,9*
5.	Клопидогрел	9,0	20,7±0,9*	44,5±6,2*

*-данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

#-данные достоверны относительно препаратов сравнения, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Примечания: n-число животных в группе

4.3. Влияние соединения ДАБ-15 на время кровотечения

На рисунке 4.7. графически отображено влияние тестируемого образца ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей. В контрольной группе среднее время кровотечения составило 233,5 с, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [Hsia C.W., 2017; Rossi E., 2017].

Исследуемое соединение ДАБ-15 достоверно в меньшей степени пролонгировало время кровотечения, чем клопидогрел и недостоверно уступало препарату сравнения ацетилсалициловой кислоте. Клопидогрел приводил к увеличению времени кровопотери на 161,2%. Соединение ДАБ-15 и ацетилсалициловая кислота достоверно пролонгировали исследуемый показатель на 54,8 и 60,4% соответственно (рис. 4.7.).

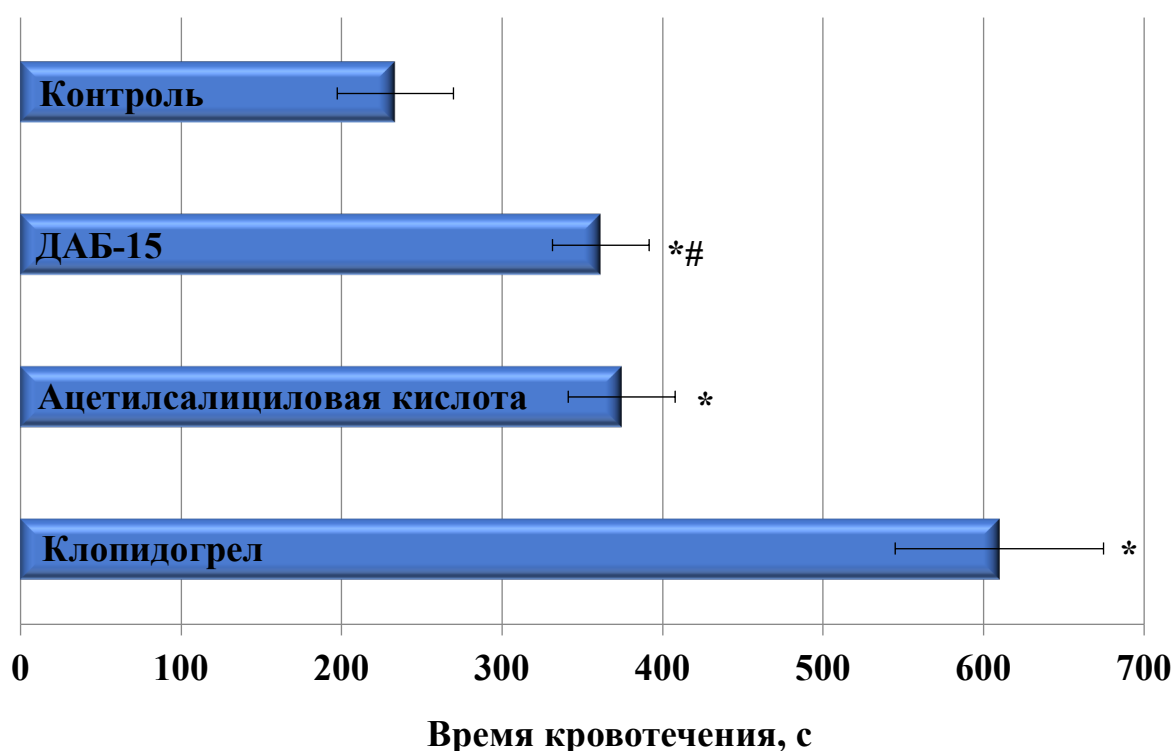


Рис. 4.7. Влияние соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей

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

#-данные достоверны по отношению к препарату сравнения клопидогрел, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$)

4.4. Заключение

Артериальные тромбозы являются одной из ведущих причин высокой летальности. Они приводят к развитию таких осложнений, как инфаркт миокарда, нарушение мозгового кровообращения, снижают эффективность оперативного лечения ишемической болезни сердца.

Поэтому важным является изучение антитромботической активности соединения ДАБ-15 на различных моделях артериальных тромбозов, в основе механизма развития которых лежат тромбоцитарные взаимодействия, является актуальным.

При контакте сонной артерии с раствором хлорида железа (III) происходит тяжелая травма эндотелиальных клеток, вызванная окислительным стрессом. Это приводит к усилению экспрессии тканевых факторов эндотелия и образованию тромба [Marcinczyk N., 2017]. Такой механизм тромбообразования близок к клиническому спонтанному тромбозу. Поэтому эта модель широко используется в доклинической практике с целью оценки антитромботической активности соединений [Zhang Y., 2017]. В модели тромбоза, индуцированного электрическим током, механизм тромбообразования в основном связан с накоплением тромбоцитов на субэндотелиальном матриксе, подвергнутому воздействию электрической травмы [Marcinczyk N., 2017]. Моделирование генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза осуществляется физиологическими агонистами тромбоцитов. Также инициация процессов тромбообразования может осуществляться в результате повышения турбулентных завихрений внутри сосудов, что приводит к механической активации кровяных пластинок.

В ходе проведенного исследования влияния нового производного 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола соединения ДАБ-15 на моделях артериальных тромбозов была установлена его высокая антитромботическая активность, превосходящая таковую для препаратов

сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. Так, при моделировании тромбоза сонной артерии аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) было установлено, что по величине ED₅₀ исследуемое соединение превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 5 и 4,8 раза соответственно. В случае инициации тромбоза сонной артерии электрическим током по показателю ED₅₀ соединение ДАБ-15 в 2,7 раза превосходило ацетилсалициловую кислоту и было сравнимо с клопидогрелем. По критерию выживаемости на модели системного адреналин-коллагенового тромбоза соединение ДАБ-15 в 1,5 раза превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и сравнимо с препаратом клопидогрел. При гистологической оценке срезов легких мышей было установлено, что по показателю средней площади тромбов на срезах легких мышей соединение-лидер превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 5 и 3,5 раза соответственно. Также тестируемое соединение снижает периметр тромбов на срезах в 1,9 раза по отношению к ацетилсалициловой кислоте, и в 1,5 в отношении препарата сравнения клопидогрел. В ходе гистологического исследования также наблюдалось снижение относительной площади тромбов на срезах легких мышей, получавших ДАБ-15. По данному показателю исследуемое соединение превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 1,5 и 1,2 раза соответственно.

В условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога соединение ДАБ-15 приводило к увеличению времени образования тромба в 1,7 раза по сравнению с группой контроля. При этом тестируемый образец не оказывал влияния на процессы фибринолиза.

Также при изучении антиагрегантных средств важным является оценка их эффективности в условиях экспериментальной патологии. В качестве последней была выбрана модель некоронарогенного инфаркта миокарда. В постинфарктный период значительно повышается тромбогенный потенциал крови. Об этом свидетельствовал тот факт, что в группе контрольных

животных с экспериментальным инфарктом миокарда среднее время окклюзии сонной артерии крыс при её обработке 50% раствором хлорида железа (III) значительно сокращалось и составляло 14,5 мин. В условиях данной экспериментальной патологии соединение ДАБ-15 продемонстрировало достоверный антитромботический эффект при однократном внутривенном введении. Среднее время окклюзии в группе животных, получавших тестируемое соединение, составило 27 мин, что почти в 2 раза превосходит контрольные значения.

Помимо изучения антитромботических средств на моделях артериальных тромбозов, необходимо также оценивать их активность в отношении процессов тромбообразования в венозной системе. Патологии венозной системы, связанные с повышенным тромбообразованием, грозят высоким риском тромбоэмболии. Наиболее часто тромбы возникают в системе нижней полой вены. В связи с этим была проведена сравнительная оценка антитромботического действия соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на модели тромбоза нижней полой вены крыс. При однократном внутривенном введении тестируемого образца ДАБ-15 средняя масса тромбов составила 44,5 мг, что в 1,5 раза ниже показателей действия препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. В группе животных, получавших другой препарат сравнения клопидогрел, средняя масса тромбов составила 59,2 мг.

Ввиду отсутствия в практике препаратов, селективно подавляющих агрегацию патологически активированных тромбоцитов, антиагрегантная терапия осложняется риском развития такого побочного эффекта, как кровотечение. Модель исследования времени кровотечения из хвостовой вены мышей позволяет объективно оценить степень выраженности данного побочного явления у потенциальных антиагрегантных средств. Так, соединение ДАБ-15 приводило к увеличению времени кровотечения, однако данный показатель был достоверно ниже значений группы клопидогрела и недостоверно ниже – ацетилсалициловой кислоты. Так как соединение ДАБ-

15 приводит к меньшей степени выраженности кровотечения можно заключить, что исследуемое соединение значительно превалирует над препаратами сравнения не только по выраженной антитромботической активности, но и по меньшему риску развития данного осложнения.

Ввиду наличия у ДАБ-15 высокой антиагрегантной и антитромботической активности возникла необходимость изучения углубленного механизма действия данного соединения.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИАГРЕГАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ДИАЗЕПИНО[1,2-*a*]БЕНЗИМИДАЗОЛА СОЕДИНЕНИЯ ДАБ-15

На мембране тромбоцитов сосредоточено множество рецепторов разных типов. Это G-белок сопряженные пуриновые рецепторы тромбоцитов, представленные двумя подтипами P2Y₁ и P2Y₁₂, протеазо-активируемые рецепторы (PAR₁ и PAR₄) [Koupenova M., 2018; Rwibasira R.G., 2018]. Важная роль в обеспечении функциональной активности тромбоцитов отводится рецепторам семейства интегринов. Они представлены рецепторами адгезии GP VI и GP Ia/IIa (адгезия к коллагену), GP Ib-IX-V (адгезия к фактору Виллебранда), а также рецепторами конечного пути агрегации тромбоцитов подтипа IIb/IIIa [Bue A.P., 2016].

Помимо рецепторных мишеней воздействия на функциональную активность кровяных пластинок существует система вторичных мессенджеров, которая представлена ферментами (PI3K, PKC, PLC, COX), IP3, DAG, а также ионами и циклическими соединениями (Ca²⁺, АДФ, АТФ) [Hsia C.H., 2018].

Воздействуя на различные пути активации и агрегации тромбоцитов специфическими агонистами возможно более детально установить механизм антиагрегантного действия соединения-лидера ДАБ-15.

5.1. Исследование влияния соединения ДАБ-15 на рецепторные пути активации тромбоцитов *in vitro*.

5.1.1. Влияние соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ

В ходе проведенного исследования было установлено, что соединение ДАБ-15 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота снижают агрегацию тромбоцитов, индуцированную 5 мкМ раствора АДФ, в тестах *in vitro*.

Механизм активации тромбоцитов данным агонистом связан со стимуляцией двух G-белок сопряженных рецепторов: P2Y₁ и P2Y₁₂[Bijak M., 2018].

При исследовании антиагрегантного действия тестируемого образца ДАБ-15 и препарата сравнения в концентрации 100 мкМ было выявлено, что в указанной концентрации соединение ДАБ-15 блокирует процессы агрегации тромбоцитов на 81,2%, а ацетилсалициловая кислота – на 52,1% (табл. 5.1). Это позволило провести изучение антиагрегантных свойств исследуемого соединения и препарата сравнения в концентрациях 10 и 1 мкМ с дальнейшим расчетом величины IC₅₀ антиагрегантной активности.

Так в концентрации 10 мкМ соединение-лидер ДАБ-15 достоверно ингибировало АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 48,1%. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в той же концентрации проявляла активность на 20,8% (табл. 5.1).

При дальнейшем снижении концентрации до 1 мкМ было установлено, что соединение ДАБ-15 оказывает антиагрегантное действие на 35,4%. Ацетилсалициловая кислота в конечной концентрации 1 мкМ блокирует агрегацию тромбоцитов на 4,6% (табл. 5.1).

При расчете величины IC₅₀ для соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты было установлено, что IC₅₀ для соединения-

лидера составила 6,1 мкМ, для ацетилсалициловой кислоты - 104 мкМ (табл. 5.1).

Таблица 5.1 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	ДАБ-15	81,2±4,1 ^{*#}	48,1±3,6 ^{*#}	35,4±5,3 ^{*#}	6,1
2.	Ацетилсалициловая кислота	52,1±4,2 [*]	20,8±3,5 [*]	4,6±1,7	104

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.2. Действие соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную адреналином

На мембране тромбоцитов присутствуют α₂-адренорецепторы. Стимулирующее влияние адреналина на указанный подтип рецепторов приводит к ингибированию работы аденилатциклазы, в результате чего снижается уровень цАМФ в тромбоцитах и происходят процессы активации и секреции ионов Ca²⁺ [Perez-Campos-Mayoral L., 2014].

При изучении антиагрегантной активности соединения ДАБ-15 на модели адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов было выявлено, что соединение-лидер дозозависимо блокирует функциональную активность кровяных пластинок, вызванную указанным индуктором.

В концентрации 100 мкМ тестируемый образец ДАБ-15 достоверно блокировал агрегацию тромбоцитов на 83,2%. Такой эффект послужил основанием для изучения соединения ДАБ-15 в концентрациях 10 и 1 мкМ. Так, в концентрации 10 мкМ вещество ДАБ-15 ингибировало агрегацию тромбоцитов на 53,2%, а в концентрации 1 мкМ на 22,9%. Значение IC₅₀ для соединения ДАБ-15 составило 7,9 мкМ (табл. 5.2).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также оказывала дозозависимое антиагрегантное действие. Так, в концентрации 100 мкМ ацетилсалициловая кислота ингибировала агрегацию тромбоцитов на 77,7%. В концентрациях 10 и 1 мкМ препарат сравнения блокировал функциональную активность красных кровяных пластинок на 33,8 и 6,0% соответственно. Величина IC₅₀ для ацетилсалициловой кислоты при этом составила 20 мкМ (табл. 5.2).

Таблица 5.2 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты на адреналин-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	ДАБ-15	83,2±3,4*	53,5±2,5*	22,9±2,2*	7,9
2.	Ацетилсалициловая кислота	77,7±3,2*	33,8±2,5*	6,0±0,9	20

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.3. Исследование влияния соединения ДАБ-15 на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Коллаген играет ключевую роль в процессах адгезии и агрегации тромбоцитов. Стимулируя специфический гликопротеиновый рецептор GP VI, коллаген активирует внутриклеточные ферменты PLC γ 2 и PLC β 2, которые катализируют два различных сигнальных пути тромбоцитов. Процессы агрегации тромбоцитов и их адгезия протекают в зависимости от концентрации коллагена [Fuentes M., 2018; Consonni A., 2012].

Исследование влияния соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, выявило дозозависимую блокирующую активность в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированных коллагеном. В концентрации 100 мкМ исследуемое соединение на 100% блокировало процессы агрегации. При дальнейшем снижении концентрации ДАБ-15 до 10 мкМ также была отмечена высокая антиагрегантная активность, при этом тестируемый образец блокировал агрегацию тромбоцитов на 94,7%. В концентрации 1 мкМ ДАБ-15 блокировало функциональную активность тромбоцитов на 42,6%. При этом величина IC₅₀ для соединения ДАБ-15 составила 0,99 мкМ (табл. 5.3).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота также проявила значительный эффект на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов. В концентрации 100 мкМ препарат сравнения блокировал процессы агрегации тромбоцитов на 83,0%. В концентрациях 10 и 1 мкМ ацетилсалициловая кислота ингибировала коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 61,8 и 31,7% соответственно. Значение IC₅₀ для исследуемого препарата сравнения составило 4,5 мкМ (табл. 5.3).

Таблица 5.3 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты на коллаген-индуцированную (4 мкг/мл) агрегацию тромбоцитов кролика *in vitro* (M±m) (n=6).

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	ДАБ-15	100	94,7±1,6	42,6±1,7*	0,99
2.	Ацетилсалициловая кислота	83,0±1,9*	61,8±2,0*	31,7±1,8*	4,5

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.4. Влияние вещества ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой

Арахидоновая кислота является важной молекулой в системе вторичных мессенджеров тромбоцитов. Под воздействием циклооксигеназы-1 из арахидоновой кислоты образуется проагрегантный агент тромбоксан A₂, который секретируется из тромбоцитов и стимулирует тромбоксановые рецепторы на поверхности мембраны кровяных пластинок [Vijak M., 2017].

Ингибирующее влияние соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, вызванную исследуемым индуктором было дозозависимым.

Так, в концентрации 100 мкМ тестируемое соединение ДАБ-15 ингибировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой на 82,9%. Дальнейшее снижение концентрации исследуемого вещества позволило заключить, что в концентрациях 10 и 1 мкМ соединение ДАБ-15 блокирует агрегацию тромбоцитов на 44,1 и 26,0% соответственно. IC₅₀ для образца ДАБ-15 составила 9,2 мкМ (табл. 5.4).

Изучение препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на модели агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой, позволило установить, что в концентрации 100 мкМ препарат сравнения ингибирует процессы агрегации тромбоцитов на 84,6%. В концентрации 10 мкМ ацетилсалициловая кислота оказывает антиагрегантное действие на 37,3%. При снижении концентрации ацетилсалициловой кислоты до 1 мкМ было установлено, что препарат сравнения снижает агрегацию тромбоцитов на 17,8%. Показатель IC_{50} для ацетилсалициловой кислоты составил 13 мкМ (табл. 5.4).

Таблица 5.4 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную арахидоновой кислотой (50 мкМ) *in vitro* ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	ДАБ-15	82,9±4,4*	44,1±3,4*	26,0±2,1*	9,2
2.	Ацетилсалициловая кислота	84,6±2,0*	37,3±1,3*	17,8±1,7*	13

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.5. Изучение влияния соединения ДАБ-15 на ристоцитин-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Фактор Виллебранда-главный субстрат, обеспечивающий первичную адгезию тромбоцитов к поврежденным участкам сосуда в условиях высоких

скоростей сдвига, характерных для артериального русла [Мазуров А.В., 2011].

Изучение действия соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, вызванную ристоцитином, показало, что исследуемый образец оказывал маловыраженное влияние на функциональную активность тромбоцитов, блокируя данный процесс на 16,4% (табл. 5.5).

Таблица 5.5 Влияние соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную ристоцитином (1,25 мг/мл) *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов		
		Концентрация, мкМ		
		100	10	1
1.	ДАБ-15	16,4±3,5*	-	-

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.6. Действие соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином

Рецепторы к такому физиологическому агонисту, как тромбин относятся к семейству G-белок сопряженных рецепторов (PAR1 и PAR4). Их стимуляция приводит к активации различных внутриклеточных сигнальных систем (PLC и PKC), что сопровождается увеличением секреции тромбоксана A₂, АДФ, серотонина и повышением уровня внутриклеточного кальция [Moon J.Y., 2018].

При изучении действия соединения ДАБ-15 на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов в концентрации 100 мкМ

соединение-лидер блокировало процессы агрегации тромбоцитов на 16,6% (табл. 5.6).

Таблица 5.6 Влияние соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную тромбином (0,5 ед./мл) *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов		
		Концентрация, мкМ		
		100	10	1
1.	ДАБ-15	16,6±1,2*	-	-

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.7. Изучение влияния соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, вызванную агонистом тромбоксановых рецепторов U46619

Данный агонист является селективным стимулятором тромбоксановых рецепторов на поверхности тромбоцитов. При активации этих рецепторов происходит увеличение активности РКС и повышение концентрации внутриклеточного кальция в тромбоцитах [Chen H., 2018].

Тестируемый образец ДАБ-15 в концентрации 100 мкМ блокировал процессы агрегации кровяных пластинок, индуцированные специфическим агонистом тромбоксановых рецепторов U46619, на 30,4% (табл. 5.7).

Таблица 5.7 Влияние соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 (3 мкМ) *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов		
		Концентрация, мкМ		
		100	10	1
1.	ДАБ-15	30,4±2,3*	-	-

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.8. Влияние вещества ДАБ-15 на PAR₁-индуцированную агрегацию тромбоцитов

В ходе проведенного исследования было установлено, что соединение ДАБ-15 дозозависимо блокирует агрегацию кровяных пластинок, вызванную пептидом-агонистом рецепторов, активированных протеиназами подтипа 1. Так, в концентрации 100 мкМ исследуемый образец ДАБ-15 на 75,9% ингибировал PAR₁-индуцированную агрегацию тромбоцитов. При изучении действия соединения ДАБ-15 в концентрации 10 мкМ установлено, что тестируемое вещество оказывает блокирующее влияние на процессы образования агрегатов в тест-системе на 59,3%. В конечной концентрации 1 мкМ вещество ДАБ-15 ингибирует PAR₁-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 24,7%. Величина IC₅₀ при этом составила 7,5 мкМ (табл. 5.8).

Таблица 5.8 Влияние соединения ДАБ-15 на PAR₁-индуцированную агрегацию (30 мкМ) тромбоцитов доноров – мужчин *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ , мкМ
		Концентрация, мкМ			
		100	10	1	
1.	ДАБ-15	75,9±6,4*	59,3±3,6*	24,7±6,9*	7,5

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.9. Влияние соединения ДАБ-15 на ФАТ-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Фактор активации тромбоцитов обладает широким спектром биологической активности, в том числе, способен стимулировать активацию тромбоцитов. Стимулируя свой рецептор на мембране тромбоцитов, ФАТ приводит к активации РКС и повышению содержания внутриклеточного кальция в тромбоцитах [Мазуров А.В., 2011].

При исследовании действия соединения-лидера в концентрации 100 мкМ на агрегацию, вызванную фактором активации тромбоцитов, ингибирование данного процесса составило 28,1% (табл. 5.9).

Таблица 5.9 Влияние соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов кролика, индуцированную фактором активации тромбоцитов (10 мкМ) *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов		
		Концентрация, мкМ		
		100	10	1
1.	ДАБ-15	28,1±2,5*	-	-

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

Примечание: n-число проб в группе

5.1.10. Действие соединения ДАБ-15 на пуриновые P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторы тромбоцитов

При оценке эффективности действия соединения ДАБ-15 на активацию P2Y₁ рецепторов тромбоцитов было установлено, что тестируемое соединение в концентрации 1 мкМ на 6,3% блокирует активацию указанного подтипа пуриновых рецепторов (табл. 5.10).

В отличие от ДАБ-15 селективный блокатор P2Y₁ рецепторов тромбоцитов вещество сравнения MRS-2179 в концентрации 1 мкМ достоверно ингибирует процесс активации данных рецепторов на 81,0% (табл. 5.10).

Таким образом, соединение ДАБ-15 практически не оказывает антагонистического действия в отношении P2Y₁ рецепторов тромбоцитов, уступая веществу сравнения MRS-2179 в 12,9 раза.

Таблица 5.10 Влияние соединения ДАБ-15 и вещества сравнения MRS-2179 на степень активации P2Y₁-рецепторов тромбоцитов кролика в безкальциевой среде, индуцированную 70 нМ АДФ *in vitro* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация тестируемых образцов, мкМ	Уровень активации тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования активации тромбоцитов
1.	Контроль		0,773±0,05	
2.	ДАБ-15	1	0,725±0,02	6,3±2,5
3.	MRS-2179	1	0,147±0,02*	81,0±2,7*

*-данные достоверны относительно контроля, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p<0,05)

Примечания: n-число проб в группе

Далее было изучено влияние соединения ДАБ-15 на другой подтип пуриновых рецепторов тромбоцитов – P2Y₁₂. Данное исследование проводилось на крысах в условиях *in vivo*. В результате изучения было выявлено незначительное блокирующее влияние соединения ДАБ-15 в отношении P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов. В терапевтической дозе 5,6 мг/кг образец ДАБ-15 ингибировал активацию P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов на 6,2% (табл. 5.11), уступая при этом препарату сравнения клопидогрелу, который в дозе 7,4 мг/кг блокировал данный подтип рецепторов тромбоцитов на 40,7% (табл. 5.11).

Таблица 5.11 Влияние соединения ДАБ-15 и клопидогрела в терапевтических дозах* на активацию P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов крыс в кальциевой среде, индуцированную 200 нМ АДФ *in vivo* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень активации P2Y ₁₂ рецепторов тромбоцитов, отн. ед.	Δ% ингибирования активации P2Y ₁₂ рецепторов тромбоцитов
1.	Контроль		3,04±0,11	
2.	ДАБ-15	5,6	2,85±0,07	6,2±2,4
3.	Клопидогрел	7,4	1,8±0,2	40,7±6,6*

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

Примечания: n-число животных в группе; терапевтические дозы (значения ED₅₀ антиагрегантной активности, полученные на модели АДФ-индуцированной агрегации (5 мкМ) в опытах *in vivo*).

5.2. Влияние производного diazepino[1,2-*a*]бензимидазола ДАБ-15 на тромбоксан-простациклиновый баланс в организме крыс

5.2.1. Влияние вещества ДАБ-15 на продукцию тромбоксана В₂ в тромбоцитах интактных крыс.

Исходный уровень тромбоксана В₂ в интактных тромбоцитах крыс составил 802,9 пкг/мл (табл.5.12). При этом соединение ДАБ-15 практически не изменяло уровень тромбоксана В₂. В интактных тромбоцитах крыс, получавших вещество ДАБ-15, среднее значение уровня данного показателя составило 772,7 пкг/мл (табл. 5.12).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота ингибировала продукцию тромбоксана В₂ в интактных тромбоцитах. Уровень последнего при этом составил 606,7 пкг/мл (табл. 5.12).

Таблица 5.12 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты в терапевтических дозах* на уровень тромбоксана В₂ в интактных тромбоцитах крыс, *in vivo* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ТхВ ₂ , пкг/мл
1.	Контроль		802,9±46,4
2.	ДАБ-15	5,6	772,7±152,7
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	606,7±40,6

Примечания: n-число животных в группе; терапевтические дозы (значения ED₅₀ антиагрегантной активности, полученные на модели АДФ-индуцированной агрегации (5 мкМ) в опытах *in vivo*).

В тромбоцитах животных, которые были простимулированы арахидоновой кислотой (контрольная группа), уровень тромбоксана В₂ увеличивался в 11,5 раз по сравнению с исходом и составлял 9250,9 пкг/мл (табл. 5.13).

Однократное внутрижелудочное введение исследуемого соединения в дозе 5,6 мг/кг приводило к значительному снижению продукции тромбоксана В₂ в тромбоцитах, индуцированных арахидоновой кислотой. Уровень исследуемого продукта при этом уменьшался в 2,2 раза и составил 4271,8 пкг/мл (табл. 5.13).

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота, также приводила к резкому уменьшению выработки тромбоксана В₂, однако при этом уменьшало его количество в 1,7 раза по сравнению с контрольными значениями, уступая по активности соединению-лидеру ДАБ-15. Однократное внутрижелудочное введение ацетилсалициловой кислоты

приводило к ингибированию продукции тромбоксана В₂ до 5495,3 пкг/мл (табл. 5.13).

Таблица 5.13 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты на продукцию тромбоксана В₂ в тромбоцитах крыс, стимулированных арахидоновой кислотой, в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень ТхВ ₂ , пкг/мл
1.	Контроль		9250,9±790,3
2.	ДАБ-15	5,6	4271,8±494,1*#
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	5495,3±315,2*

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

#-данные достоверны относительно ацетилсалициловой кислоты, критерий one-way ANOVA (поправка Бонферони) (p<0,0001)

Примечания: n-число животных в группе

5.2.2. Влияние вещества ДАБ-15 на продукцию 6-кето-простагландина F1_α

В ходе проведенного исследования был установлен исходный уровень 6-кето-простагландина F1_α в плазме интактных крыс, который составил 22602,6 пкг/мл (табл. 5.14).

При действии тестируемого образца ДАБ-15 уровень 6-кето-простагландина F1_α недостоверно повышался до 27805,7 пкг/мл (табл. 5.14).

При однократном внутривенном введении препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в 1,7 раза снижала выработку 6-кето-простагландина F1_α. Уровень последнего при этом составлял 12507,6 пкг/мл (табл. 5.14).

Таблица 5.14 Влияние соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты на продукцию 6-кето-простагландина F_{1α}, в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* (M±m) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Уровень PGF _{1α} , пкг/мл
1.	Контроль		22602,6±998,5
2.	ДАБ-15	5,6	27805,7±1304,5**
3.	Ацетилсалициловая кислота	27	12507,6±1937,4*

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

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

Примечания: n-число животных в группе

5.3. Влияние нового производного диазепино[1,2-а]бензимидазола на уровень кальция в тромбоцитах крыс

Различные пути активации тромбоцитов сводятся к увеличению концентрации внутриклеточного кальция, секретируемого из плотных гранул хранения. При участии ионов кальция происходят процессы агрегации тромбоцитов [Ngo A.T.P., 2018].

5.3.1. Действие соединения ДАБ-15 на общий уровень кальция

Перед проведением эксперимента было выявлено отсутствие хелатирующих свойств соединения ДАБ-15. На рисунке 5.1 показано, что в сравнении с ЭГТА соединение ДАБ-15 не обладает способностью связывать ионы кальция.

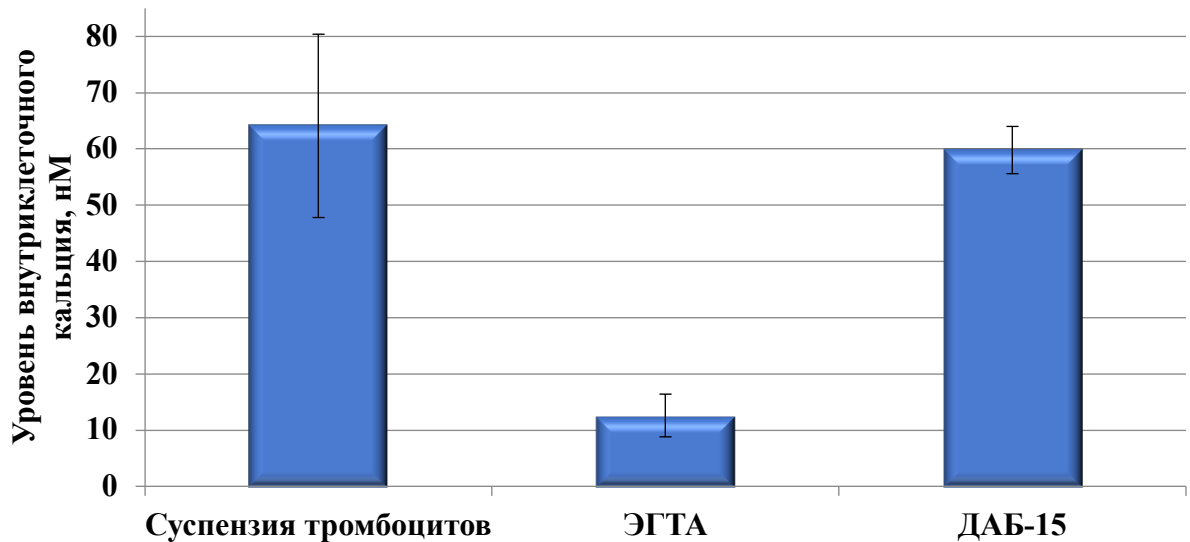


Рис. 5.1 Влияние соединения ДАБ-15 и ЭГТА на связывание интрацеллюлярного кальция в интактных тромбоцитах

В кальциевой среде уровень кальция складывается из физиологической концентрации во внеклеточном пространстве и в клеточных депо.

Было установлено, что исходный уровень кальция в суспензии интактных тромбоцитов составил 64,1 нМ. После стимуляции тромбином общий уровень кальция возрастал и составлял 390,8 нМ.

Соединение ДАБ-15 проявляло дозозависимое ингибирующее влияние на общий уровень кальция в тромбоцитах. Так, в концентрации 100 мкМ тестируемый образец снижал уровень кальция в 4,4 раза по сравнению со значениями, полученными в контроле. При снижении исследуемой концентрации до 10 и 1 мкМ было установлено, что уровень кальция уменьшался на 64,7 и 35,5% соответственно. Дозозависимое действие соединения ДАБ-15 позволило рассчитать для него значение IC_{50} , которое составило 3,7 мкМ (табл. 5.15).

В качестве препарата сравнения был использован антагонист ионов кальция препарат верапамил. В концентрации 100 мкМ данный препарат снижал уровень кальция до 197,7 нМ, уступая при этом исследуемому образцу ДАБ-15 (табл. 5.15).

Таблица 5.15 Влияние соединения ДАБ-15 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного тромбином (0,5 ед./мл) в кальциевой среде *in vitro* ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ	$\Delta\%$ ингибирования уровня внутриклеточного кальция	IC ₅₀ , мкМ
1.	Суспензия тромбоцитов		64,1±16,3		
2.	Суспензия тромбоцитов + тромбин	Контроль	390,8±39,2		
3.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + ДАБ-15	100	89,2±7,7*	77,2±2,0	3,7
		10	138,1±18,3*	64,7±4,7	
		1	251,9±18,0	35,5±4,6	
4.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + Верапамил	100	197,7±45,5	49,4±11,6	

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

Примечания: n-число проб в группе

5.3.2. Действие соединения ДАБ-15 на уровень внутриклеточного кальция в тромбоцитах

Для более полной оценки влияния соединения ДАБ-15 на пул ионов кальция, было проведено исследование в условиях отсутствия кальция во внеклеточной среде. Буферный раствор, в котором находились отмытые тромбоциты, не содержал ионов кальция.

Исходный уровень кальция в интактных тромбоцитах составил 30,6 нМ. После стимуляции тромбоцитов тромбином содержание ионов кальция возросло до 128,6 нМ.

Исследуемое соединение ДАБ-15 проявило дозозависимое ингибирование выхода ионов кальция из клеточных депо. В конечной концентрации 100 мкМ уровень кальция составил 30,1 нМ, что соответствует 76,6% ингибирования. При изучении тестируемого образца ДАБ-15 в концентрации 10 и 1 мкМ было установлено, что соединение снижает концентрацию ионов кальция на 41,7 и 16,5% соответственно. Величина IC_{50} для соединения ДАБ-15 составила 15 мкМ (табл. 5.16).

Препарат сравнения верапамил не оказал выраженного ингибирующего влияния на высвобождение кальция из клеточных депо. В концентрации 100 мкМ верапамил снижал содержание ионов кальция до 128,1 нМ, что составило 0,4% ингибирования (табл. 5.16).

Таблица 5.16 Влияние соединения ДАБ-15 на уровень кальция в тромбоцитах, индуцированный тромбином (0,5 ед./мл) в безкальциевой среде *in vitro* (M±m) (n=5)

№ п/п	Тестируемые образцы	Концентрация, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, нМ	Δ% ингибирования уровня внутриклеточного кальция	IC ₅₀ , мкМ
1.	Суспензия тромбоцитов		30,6±1,2		
2.	Суспензия тромбоцитов + тромбин	Контроль	128,6±18,1		
3.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + ДАБ-15	100	30,1±5,9*	76,6±4,6	15
		10	75,0±4,5*	41,7±3,5	
		1	107,3±7,7	16,5±6,0	
4.	Суспензия тромбоцитов + тромбин + Верапамил	100	128,1±17,2	0,4±0,2	

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

Примечания: n-число проб в группе

5.4. Влияние соединения ДАБ-15 на секрецию АТФ из гранул хранения тромбоцитов.

Измерение уровня секретлируемой АТФ из δ -гранул тромбоцитов проводилось люминисцентным методом детекции с использованием агрегометра Chronolog-700. На данном приборе возможна одновременная запись кривых секреции АТФ и агрегации тромбоцитов. Таким образом, наряду с измерением уровня секреции АТФ проводили измерение значения импеданса под влиянием вещества ДАБ-15.

При стимуляции цельной крови раствором АДФ в концентрации 5 мкМ было установлено, что значение импеданса для интактных образцов в среднем составило 20,0 Ом. При добавлении в тест-систему 200 мкМ тестируемого образца ДАБ-15 наблюдалось снижение сопротивления цельной крови до 5,8 Ом (рис. 5.2, а). Это подтверждает выраженное антиагрегантное действие соединения-лидера.

Уровень секретлируемой АТФ при стимуляции 5 мкМ АДФ в контрольных образцах в среднем составил 64,8 нМ. Соединение ДАБ-15 в концентрации 200 мкМ подавляло секрецию АТФ до 38,5 нМ (рис. 5.2, б).

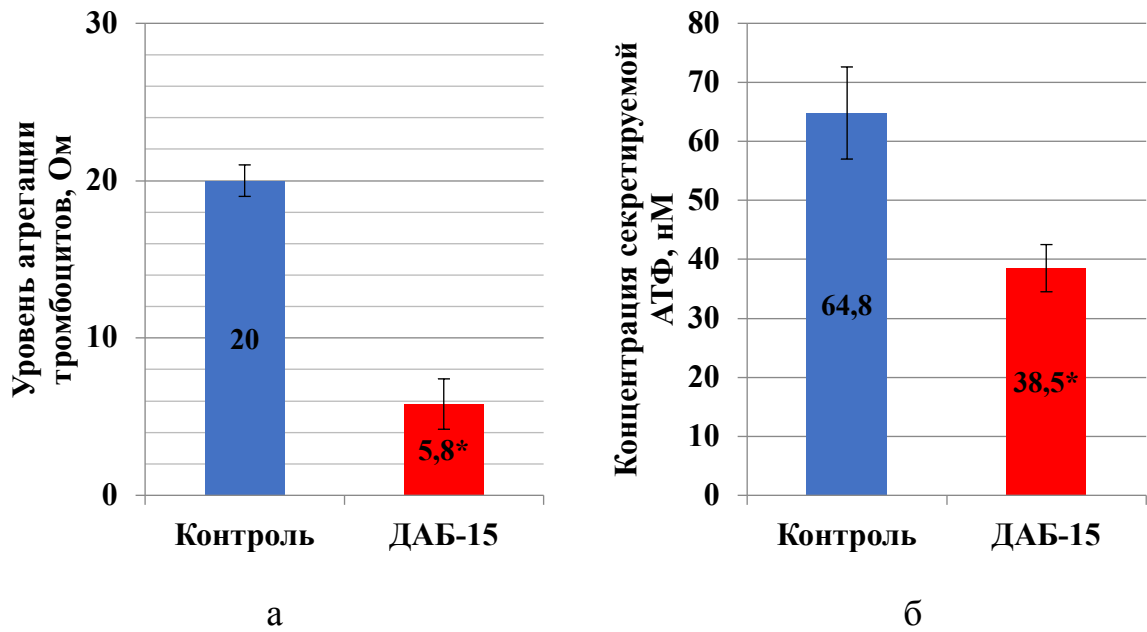


Рис. 5.2 Влияние соединения ДАБ-15 (200 мкМ) на уровень импеданса (а) и секрецию АТФ из гранул хранения тромбоцитов (б)

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

5.5. Влияние соединения ДАБ-15 на адгезивные свойства тромбоцитов

Оценку степени адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена проводили по значению импеданса. В контрольных образцах цельной крови величина сопротивления составила 18,8 Ом (табл. 5.17).

Изучение влияния соединения ДАБ-15 на способность тромбоцитов к адгезии позволило выявить, что тестируемый образец дозозависимо ингибировал адгезию тромбоцитов на микрофибриллах коллагена. В концентрации 1 мкМ соединение ДАБ-15 на 74,3% блокировало способность тромбоцитов к адгезии. Изучение образца ДАБ-15 в концентрациях 0,1 и 0,01 мкМ позволило заключить, что в указанных концентрациях исследуемое вещество ингибирует адгезию тромбоцитов на 35,3 и 11,3% соответственно. Учитывая наличие дозозависимого эффекта, была рассчитана величина IC_{50} для соединения ДАБ-15, которая составила 0,5 мкМ (табл. 5.17).

Таблица 5.17 Влияние соединения ДАБ-15 на адгезию тромбоцитов к микрофибриллам коллагена (50 мкМ) ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация, мкМ	Значение импеданса, Ом	$\Delta\%$ ингибирования адгезии тромбоцитов	IC ₅₀ , мкМ
1.	Контроль		18,8±0,7		
2.	ДАБ-15	0,01	16,7±0,4*	11,3±2,2*	0,5
		0,1	12,2±0,7*	35,3±3,7*	
		1	4,8±1,2*	74,3±6,6*	

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

Примечание: n-число проб в группе

5.6. Заключение

Исследование влияния соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами, позволило сделать заключение о том, что данный тестируемый образец дозозависимо блокирует функциональную активность тромбоцитов, индуцированную различными агонистами.

Наиболее выраженную активность соединение ДАБ-15 проявило в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, при этом значение IC₅₀ составило 990 нМ. Коллаген является адгезивным белком для тромбоцитов, посредством которого происходит адгезия тромбоцитов к сосудистой стенке. Стимулирующее влияние коллагена на гликопротеиновый рецептор GP VI тромбоцитов приводит к активации внутриклеточной сигнальной системы кровяных пластинок. В результате активности фосфолипазы C происходит образование инозитол-2,4,5-трифосфата. Последний имеет рецепторы на мембране плотных гранул

тромбоцитов, стимуляция которых приводит к высвобождению ионов кальция из депо хранения [Jamasbi J., 2017]. Повышение концентрации интрацеллюлярного кальция приводит к изменению конформации и активации другого рецептора семейства интегринов – $\text{Pb}/\text{P3a}$. Взаимодействие последнего со своими агонистами приводит к развитию стойкой и необратимой агрегации тромбоцитов [Qiao J., 2018].

Действие соединения-лидера в отношении таких индукторов, как арахидоновая кислота, адреналин и PAR_1 -агонист также было выраженным. Показатель IC_{50} для соединения ДАБ-15 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой составил 9,2 мкМ, что в 1,5 раза эффективнее ацетилсалициловой кислоты. Значения IC_{50} ДАБ-15 при индуцировании процессов активации кровяных пластинок адреналином и PAR_1 -агонистом составили 7,9 и 7,5 мкМ соответственно.

В отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином, ристоцетином, фактором активации тромбоцитов и агонистом тромбоксановых рецепторов соединение ДАБ-15 проявило незначительную активность.

Соединение ДАБ-15 не оказывает влияния на пуриновые P2Y_1 и P2Y_{12} рецепторы тромбоцитов.

Также, методом иммуноферментного анализа, было проведено исследование влияния соединения ДАБ-15 на баланс тромбоксана V_2 и 6-кето - простагландина. В результате проведенных экспериментов показано, что исследуемое соединение приводит к снижению выработки тромбоксана V_2 , превосходя при этом препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 1,2 раза, а также незначительно увеличивает уровень 6-кето - простагландина.

Для протекания процессов агрегации тромбоцитов важным условием является выход ионов кальция из плотных гранул хранения тромбоцитов [Munzer P., 2017]. Поэтому изучение потенциальных антиагрегантных средств в отношении ингибирования выброса ионов кальция является важной частью изучения их механизма действия. В результате исследования было

выявлено, что соединение ДАБ-15 в значительной степени снижает уровень общего кальция в тест-системе с физиологическим содержанием кальция и также приводит к снижению концентрации внутриклеточного кальция в безкальциевой среде. Данное исследование позволяет косвенно предположить, что соединение ДАБ-15 оказывает влияние на секрецию внутриклеточного кальция.

Изученное соединение снижает уровень секреции АТФ из плотных гранул тромбоцитов. Так на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов люминесцентным методом детекции соединение ДАБ-15 в 1,7 раза уменьшает выброс АТФ из гранул хранения по сравнению с контрольными значениями.

В ходе проведенного исследования влияния соединения ДАБ-15 на процессы адгезии тромбоцитов было установлено дозозависимое ингибирование данного процесса на микрофибриллах коллагена. IC_{50} для соединения ДАБ-15, составила 0,5 мкМ.

Исходя из полученных данных о выраженном антитромбоцитарном действии соединения ДАБ-15 в отношении агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, и способности блокировать адгезию тромбоцитов на микрофибриллах коллагена можно предположить, что наиболее вероятной мишенью его антиагрегантного действия является гликопротеиновый рецептор GP VI к коллагену.

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ведущая роль в патогенезе таких заболеваний, как инфаркт миокарда, атеросклероз, ишемический инсульт отводится процессам тромбообразования [Наувар Н., 2018]. Последние протекают постадийно с участием множества мишеней активации тромбоцитов, а также благодаря внутренним и внешним биохимическим факторам [George M.J., 2018]. В основе тромбообразования также лежит ускоренный, турбулентный ток крови в суженном атеросклеротической бляшкой участке сосуда, что способствует повреждению эндотелия и вовлечению в процесс коллагена, одного из главных факторов агрегации и адгезии тромбоцитов. Тромбоциты вступают в контакт с субэндотелиальным слоем, в частности с главным стимулятором адгезии – коллагеном, образуя белый тромб. Активация тромбоцитов осуществляется множеством физиологических агонистов, таких как катехоламины, тромбин, АДФ, серотонин, коллаген, тромбоксан А₂ – продукт метаболизма арахидоновой кислоты. В результате происходит высвобождение биологически активных веществ (АДФ, ТАх₂, серотонина) из депо хранения тромбоцитов и конформационная активация гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa под действием АДФ и тромбоксана А₂. Таким образом, активация тромбоцитов – ключевой момент, во многом определяющий выраженность нарушений кровоснабжения органов и тканей (сердце, головной мозг, периферические сосуды), поэтому антитромбоцитарная терапия является патогенетически обоснованной, ей принадлежит ведущая роль в коррекции и профилактике клинических проявлений тромбоза [Гороховская Г.Н., 2013].

Современная антиагрегантная терапия представлена лекарственными препаратами с различными механизмами действия: ингибиторами ЦОГ ацетилсалициловой кислотой и индobufеном; антагонистами P2Y₁₂ рецептора на тромбоцитарных мембранах, необратимо ингибирующими его активность – тиенопиридинами: тиклопидином, клопидогрелом и

прасугрелом, а также обратимыми антагонистами этого рецептора — тикагрелором и кангрелором; блокаторами гликопротеинов IIb/IIIa для в/в введения — абциксимабом, эптифибатидом, тирофибаном; ингибитором фосфодиэстеразы дипиридамолом и др.

Данные препараты не всегда достаточно эффективны и их применение также ограничивает ряд нежелательных эффектов. Среди этих эффектов отмечается гастротоксичность (ацетилсалициловая кислота), которая сопровождается эрозиями слизистой оболочки, болями в эпигастральной области и изжогой. Но наиболее опасным осложнением являются кровотечения, которые характерны для всех антиагрегантных препаратов, что требует постоянного лабораторного контроля со стороны системы гемостаза. Остро стоит вопрос резистентности к ацетилсалициловой кислоте и клопидогрелу, характеризующейся снижением эффекта [Li J.L., 2018]. Ингибиторы гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa, могут вызывать брадикардию, АВ-блокаду, гипотензию, спутанность сознания, нарушение зрения, анафилактический шок, анемию, лейкоцитоз [Соловьева В.Ю., 2016]. Поэтому поиск антиагрегантов, влияющих на новые мишени, приводящие к агрегации тромбоцитов, является актуальным.

В результате аналитического обзора литературы и данных, полученных на базе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, было установлено, что гетероциклические азотсодержащие соединения способны эффективно блокировать агрегацию тромбоцитов, при этом вызывая минимум побочных эффектов [Kucheryavenko A.F., 2014; Yao W-C., 2017].

В настоящем исследовании объектом изучения явились 19 соединений под шифром ДАБ, являющиеся представителями нового класса гетероциклических соединений — производные 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazепино[1,2-*a*]бензимидазола.

Скрининг указанных соединений на наличие антиагрегантной активности проводили на модели АДФ-индуцированной (5 мкМ) агрегации

тромбоцитов *in vitro* по методу G. Born в модификации В.А. Габбасова (1989).

Золотым стандартом лечения функционального нарушения тромбоцитарного звена системы гемостаза с доказанной эффективностью является ацетилсалициловая кислота – ингибитор ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [Mohring A., 2017]. Данный препарат был выбран в качестве препарата сравнения, поскольку способен блокировать агрегацию тромбоцитов, индуцированную *in vitro*, в отличие от препарата клопидогрел, активность которого проявляется только в условиях целостного организма. Помимо этого, согласно литературным данным, механизм антиагрегантного действия представителей класса бензимидазолов связан с ингибированием синтеза тромбоксана A₂ [Yao W-C., 2017].

В ходе исследования дозозависимого эффекта ацетилсалициловой кислоты в отношении блокирования процессов агрегации тромбоцитов *in vitro*, была рассчитана ингибирующая концентрация IC₅₀, которая составила 104 мкМ.

При исследовании антиагрегантной активности 19 новых трициклических производных бензимидазола, было выявлено 8 соединений, проявляющих максимальный дозозависимый антиагрегантный эффект, что позволило рассчитать для соединений ДАБ-4, ДАБ-7, ДАБ-9, ДАБ-12, ДАБ-13, ДАБ-15, ДАБ-25 и ДАБ-26 значение IC₅₀. В результате наибольшую антиагрегантную активность проявило соединение ДАБ-15, которое по значению IC₅₀ превосходило препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 17 раз. Поэтому данное соединение было выбрано для дальнейшего детального изучения.

Важным показателем лекарственных средств является величина их токсичности, поэтому для исследуемого соединения методом регрессионного анализа было рассчитано значение LD₅₀, которая составила 118 мг/кг. Исходя из величины острой токсичности при внутрибрюшинном пути введения тестируемого соединения и согласно классификации токсичности

химических веществ в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 его можно отнести к 3 классу умеренно-токсичных веществ [Березовская И.В., 2003; Саноцкий И.В., 1975].

Наличие данных исследований *in vitro* и показателя острой суточной токсичности позволило в дальнейшем рассчитать условную широту терапевтического действия (условный терапевтический индекс (УТИ)). Значения УТИ для соединения ДАБ-15 и ацетилсалициловой кислоты составили 59 и 16,48 соответственно. Таким образом, исследуемое соединение ДАБ-15 по значению УТИ превосходило ацетилсалициловую кислоту в 3,6 раза.

В ряду новых трициклических производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола (рис. 6.1) было проведено исследование зависимости антиагрегантной активности от их химической структуры. Так как все изученные соединения в той или иной степени проявили антиагрегантную активность можно сделать вывод о значительном вкладе базовой структуры в наличие антиагрегационного эффекта. Методом сходства и различий было установлено, что важным условием является наличие радикала R₁ именно в положении N¹¹.

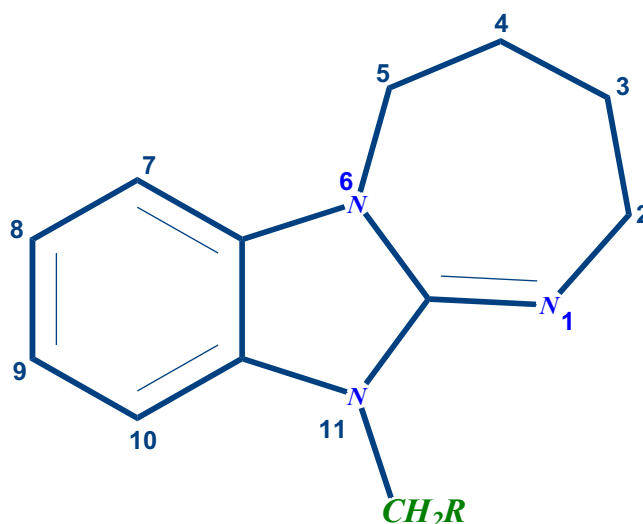


Рис. 6.1 Общая структура производных diaзепино[1,2-*a*]бензимидазола

Включение в структуру заместителя алифатических или гетероциклических фрагментов приводило к потере активности более чем в 2 раза.

Таким образом, в ходе проведенного анализа зависимости антиагрегантной активности новых производных диазепино[1,2-*a*]бензимидазола от химической структуры установлено, что высокий уровень данной активности обуславливает наличие заместителя в положении N¹¹. Структура заместителя должна содержать ароматическое кольцо с атомом галогена в пара-положении.

Наличие у соединения ДАБ-15 высокого уровня активности *in vitro* явилось основанием для его тестирования в условиях целостного организма. В организме тромбоциты подвергаются воздействию множества физиологических факторов их активации. Поэтому при введении веществ в организм и исследовании антиагрегантного действия *in vivo* возможно более точно установить активность соединений.

Изучение антиагрегантной активности ДАБ-15 в условиях целого организма *in vivo* на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов также продемонстрировало достоверно высокую эффективность. По значению ED₅₀ соединение ДАБ-15 превосходило препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 4,8 и 1,3 раза соответственно.

К патологиям сердечно-сосудистой системы относят такие социально значимые заболевания, как ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, развивающиеся зачастую в результате тромботических нарушений в сосудистом русле. Проблема артериальных и венозных тромбозов является острой в современной медицинской практике [Gorka J., 2018; Jeraj L., 2018]. Исходя из этого целесообразным явилось изучение потенциальных антиагрегантных средств на моделях артериальных и венозных тромбозов.

Модель тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствором хлорида железа (III), заключается в активировании процессов агрегации

тромбоцитов [Ciciliano J.C., 2015]. Также хлорид железа способствует развитию в очаге поражения реакции Хабера-Вейса (взаимодействие железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы). На данной модели артериального тромбоза соединение ДАБ-15 по показателю ED₅₀ превосходило известные антиагрегантные средства ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 5 и в 4,8 раза соответственно.

Проведенные исследования позволяют заключить, что соединение ДАБ-15 также обладает выраженной антитромботической активностью на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током. При сравнительной оценке антитромботической активности соединения ДАБ-15 и известных антиагрегантных средств ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела оказалось, что на данной модели тромбоза тестируемый образец ДАБ-15 превосходит по значению ED₅₀ ацетилсалициловую кислоту в 2,7 раза и сравним по активности с клопидогрелем.

Модель генерализованного тромбоза, индуцированного смесью адреналина и коллагена, также широко используется, как максимально приближенная к реальной патологии в клинике. По критерию выживаемости соединение ДАБ-15 в 1,5 раза превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту и сравнимо с препаратом клопидогрел. По изученным морфометрическим показателям на срезах легкого, исследуемое соединение значительно превосходит по антитромботическому эффекту препараты сравнения. Так, соединение-лидер снижает показатели средней площади тромбов на срезах легких мышей относительно препаратов сравнения ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела в 5 и 3,5 раза соответственно, а также уменьшает периметры тромбов на срезах легких в 1,9 раза по отношению к ацетилсалициловой кислоте, и в 1,5 - в отношении препарата сравнения клопидогрел. В ходе гистологического исследования также наблюдалось снижение относительной площади тромбов на срезах легких мышей, получавших тестируемый образец ДАБ-15, превосходящее препараты сравнения.

При исследовании антитромботической активности соединения ДАБ-15 на модели венозного тромбоза было установлено, что тестируемое соединение предотвращало увеличение массы тромбов, извлеченных из нижней полой вены крыс, в среднем на 51,2%, в то время как препараты сравнения ацетилсалициловая кислота и клопидогрел уменьшали массу тромбов на 24,8 и 35% соответственно.

Другая модель тромбоза – Global Thrombosis Test – широко используется в клинической практике для оценки эффективности антитромбоцитарной терапии. В данной тест-системе соединение ДАБ-15 также продемонстрировало высокую эффективность. Соединение ДАБ-15 приводило к достоверному увеличению времени наступления окклюзии на 73,7%. Время лизиса под действием тестируемого образца было сравнимо с контролем и составило 617,5 с. Учитывая, что используемый метод позволяет фиксировать время лизиса тромба, можно сделать вывод об отсутствии у соединения ДАБ-15 фибринолитической активности.

Поиск и создание новых антиагрегантных средств включает в себя исследование потенциальных соединений в условиях экспериментальной патологии. В качестве патологии была использована модель некоронарогенного инфаркта миокарда, на которой была изучена антитромботическая активность соединения ДАБ-15 на модели тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствором хлорида железа (III). Среднее время окклюзии сонной артерии крыс с инфарктом миокарда (группа контроля) составило 14,5 мин, в то время как для интактных животных этот показатель был 19,4 мин. Полученные данные позволяют сделать вывод об увеличении тромбогенного потенциала крови при наличии патологии – инфаркта миокарда. В результате проведенных исследований было показано, что соединение ДАБ-15 при однократном внутривенном введении крысам с экспериментальным инфарктом миокарда в дозе 5,6 мг/кг достоверно пролонгировало время наступления полной окклюзии сонной артерии на 86,2% по сравнению с контрольными животными. На интактных

животных была также определена высокая антитромботическая активность образца ДАБ-15, однако при наличии экспериментальной патологии наблюдалось значительное увеличение эффективности исследуемого соединения.

Ввиду отсутствия в практике препаратов, селективно подавляющих агрегацию патологически активированных тромбоцитов, антиагрегантная терапия осложняется риском развития такого побочного эффекта, как кровотечение [Некерева М., 2017]. Поэтому данное соединение было изучено на модели «время кровотечения». В результате было показано, что соединение ДАБ-15 приводило к увеличению времени кровотечения на 54,8 %, однако данный показатель был достоверно ниже значений, полученных в группе животных, получавших клопидогрел, и статистически незначимо ниже в группе животных, получавших ацетилсалициловую кислоту. Ацетилсалициловая кислота и клопидогрел увеличивали время кровотечения на 60,4 и 161,2% соответственно. Так как соединение ДАБ-15 приводит к меньшей степени выраженности кровотечения можно заключить, что исследуемое соединение значительно превалирует над препаратами сравнения не только по выраженной антитромботической активности, но и по меньшему риску развития данного осложнения.

Детальное понимание ведущей роли кровяных пластинок в процессах тромбообразования позволяет изучать потенциальные антиагрегантные средства по основным механизмам действия в различных мишенях, что способствует прекращению образования тромба на стадии формирования агрегатов тромбоцитов [Song W., 2018].

Стимуляция агрегации тромбоцитов происходит посредством множества эндогенных физиологических, механических и химических стимулов. Эндогенными физиологическими агонистами считаются коллаген (главный белок внеклеточного матрикса и белок, обеспечивающий адгезию тромбоцитов) и тромбин, которые относятся к сильным индукторам, а также АДФ и ТХА₂ (вторичные мессенджеры, секретируемый тромбоцитами)

[Onselaer M.B., 2017; Pierre S., 2017; Poulter N.S., 2017]. Агонисты, взаимодействуя со специфическими рецепторами на мембране тромбоцита, способствуют его переходу в активированное состояние, которое сопровождается изменением формы, адгезией, агрегацией, высвобождением содержимого гранул, активацией сигнальной системы [Aslan J.E., 2018; Murakami M., 2017]. Поэтому нам представилось интересным установить, не является ли соединение ДАБ-15 конкурентным антагонистом индукторов агрегации тромбоцитов.

Механизм активации тромбоцитов агонистом АДФ связан с угнетением аденилатциклазы. Происходит иммобилизация кальция из гранул хранения, снижение количества цАМФ, увеличивается продукция диацилглицерола и фосфатидилинозитол-3-фосфата, повышается секреция эндогенного проагреганта тромбоксана A_2 [Irfan M., 2018]. Соединение ДАБ-15 достоверно ингибировало АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Величина IC_{50} для соединения-лидера составила 6,1 мкМ, для ацетилсалициловой кислоты - 104 мкМ. Таким образом, можно предположить, что возможным механизмом действия исследуемого соединения является угнетение продукции эндогенного тромбоксана A_2 .

При изучении влияния соединения ДАБ-15 на адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов было установлено, что значение IC_{50} для ДАБ-15 составило 7,9 мкМ, а для ацетилсалициловой кислоты – 20 мкМ. Известно, что стимулирующее влияние адреналина на α_2 -адренорецепторы тромбоцитов приводит к ингибированию аденилатциклазы, в результате чего снижается уровень цАМФ в тромбоцитах и происходят процессы активации и секреции ионов Ca^{2+} [Perez-Campos-Mayoral L., 2014]. Ингибирующее влияние соединения-лидера в отношении агрегации тромбоцитов, вызванной адреналином, может свидетельствовать о его влиянии на активность внутриклеточной аденилатциклазы.

Арахидоновая кислота является важной молекулой в системе вторичных мессенджеров тромбоцитов. Под воздействием циклооксигеназы-

1 из арахидоновой кислоты образуется проагрегантный агент тромбоксан A_2 , который секретируется из тромбоцитов и стимулирует тромбоксановые рецепторы на поверхности мембраны кровяных пластинок [Vijak M., 2017]. Тестируемое соединение проявило дозозависимую антиагрегантную активность в отношении данного индуктора и IC_{50} для образца ДАБ-15 составила 9,2 мкМ и была сравнима с ацетилсалициловой кислотой. Так как соединение ДАБ-15 значительно снижает агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой, закономерно предположить, что соединение-лидер приводит к снижению продукции тромбоксана A_2 .

Фактор Виллебранда-главный субстрат, обеспечивающий первичную адгезию тромбоцитов к поврежденным участкам сосуда в условиях высоких скоростей сдвига, характерных для артериального русла [Мазуров А.В., 2011].

Изучение действия соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, вызванную ристоцитином, показало, что исследуемый образец оказывал маловыраженное влияние на функциональную активность тромбоцитов, блокируя данный процесс на 16,4%. Эти данные свидетельствуют об отсутствии влияния ДАБ-15 на активность фактора Виллебранда.

Рецепторы к такому мощному физиологическому агонисту, как тромбин относятся к семейству G-белок сопряженных рецепторов (PAR1 и PAR4). Их стимуляция приводит к активации различных внутриклеточных сигнальных систем (PLC и PKC), что сопровождается увеличением секреции тромбоксана A_2 , АДФ, серотонина и повышением уровня внутриклеточного кальция [Moon J.Y., 2018].

Тестируемый образец ДАБ-15 в концентрации 100 мкМ блокировал процессы агрегации кровяных пластинок, индуцированные специфическим агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 на 30,4%. Такая умеренная активность соединения ДАБ-15 в высокой концентрации не может свидетельствовать о наличии у него блокирующего действия в отношении рецепторов тромбоксана.

В ходе проведенного исследования было установлено, что соединение ДАБ-15 дозозависимо блокирует агрегацию кровяных пластинок, вызванную пептидом-агонистом рецепторов, активированных протеиназами подтипа 1. Величина IC_{50} при этом составила 7,5 мкМ. PAR-1 рецепторы тромбоцитов являются G-белок сопряженными и их стимуляция приводит к активации сложного каскада внутриклеточных реакций. Агрегация тромбоцитов под действием данного агониста протекает по двум направлениям: через снижение активности аденилатциклазы и активацию PLC β . Однако величина IC_{50} исследованного соединения в сравнении с блокаторами PAR-1 рецепторов тромбоцитов – атопаксаром и ворапаксаром [Lan G., 2015] является высокой, поэтому можно предположить, что исследуемое вещество обладает слабовыраженным блокирующим влиянием в отношении данного подтипа рецепторов.

Величина IC_{50} для соединения ДАБ-15 в отношении ингибирования коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов составила 0,99 мкМ. Ключевую роль в процессах адгезии и агрегации тромбоцитов играет коллаген. Стимулируя специфический гликопротеиновый рецептор GP VI, коллаген активирует внутриклеточные ферменты PLC γ 2 и PLC β 2, которые катализируют два различных сигнальных пути внутри тромбоцита. Процессы агрегации тромбоцитов и их адгезия протекают в зависимости от концентрации коллагена [Consonni A., 2012; Fuentes M., 2018]. Такой уровень активности позволяет косвенно предположить, что тестируемый образец ДАБ-15 является блокатором GP VI рецепторов тромбоцитов.

Начальным этапом в процессе тромбообразования является способность тромбоцитов к адгезии на сосудистой стенке. На мембране тромбоцитов имеется два основных гликопротеиновых рецептора адгезии- VI и Ib/IX/V. Связующим звеном между сосудистой стенкой и рецептором адгезии являются микрофибриллы коллагена [Mangin P.H., 2018]. Изучение влияния соединения ДАБ-15 на способность тромбоцитов к адгезии позволило выявить, что тестируемый образец дозозависимо ингибировал

адгезию тромбоцитов на микрофибриллах коллагена. Учитывая наличие дозозависимого эффекта, была рассчитана величина IC_{50} для соединения ДАБ-15, которая составила 0,5 мкМ.

В ходе углубленного изучения влияния ДАБ-15 на пуриновые рецепторы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния не было выявлено активности в отношении блокирования $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ рецепторов, из чего можно заключить, что механизм антиагрегантного действия тестируемого образца не связан с влиянием на данные подтипы рецепторов тромбоцитов.

При однократном внутривенном введении исследуемого соединения в дозе 5,6 мг/кг наблюдалось значительное снижение продукции тромбоксана B_2 в тромбоцитах, индуцированных арахидоновой кислотой. В отношении ингибирования продукции тромбоксана B_2 соединение ДАБ-15 было сравнимо с ацетилсалициловой кислотой. Последняя является известным ингибитором ЦОГ-1 и наряду со снижением продукции тромбоксана B_2 снижает и уровень 6-кето-простагландина $F1\alpha$, что в свою очередь обуславливает наличие побочных эффектов данного препарата, связанными с гастротоксичностью. Примечательным является то, что соединение ДАБ-15 наоборот, приводит к недостоверному повышению уровня 6-кето-простагландина $F1\alpha$, что указывает на значительное преимущество соединения-лидера перед препаратом сравнения ацетилсалициловой кислотой. Учитывая такой эффект, возможно предполагать избирательное влияние ДАБ-15 на тромбоксансинтазу.

Все пути активации тромбоцитов сводятся к увеличению концентрации внутриклеточного кальция, секретируемого из плотных гранул хранения, что приводит к процессам агрегации тромбоцитов [Ngo A.T.P., 2018]. Соединение ДАБ-15 проявило дозозависимое ингибирующее влияние на общий уровень кальция в тромбоцитах и уровень кальция в безкальциевой среде. Показатели IC_{50} тестируемого образца при этом составили 3,7 и 15 мкМ соответственно.

АТФ является физиологическим активатором тромбоцитов, секретуемым из их депо хранения, как компонент сигнальной системы тромбоцитов [Munzer P., 2018]. Уровень секретуемой АТФ при стимуляции 5 мкМ АДФ в контрольных образцах в среднем составил 64,8 нМ. Соединение ДАБ-15 в концентрации 200 мкМ подавляло секрецию АТФ до 38,5 нМ. Учитывая влияние соединения ДАБ-15 на уровень кальция в двух исследуемых средах и снижение выброса АТФ можно предположить, что соединение-лидер проявляет активность в отношении сигнальной системы тромбоцитов.

Исходя из полученных данных о выраженном влиянии соединения ДАБ-15 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой *in vitro* и уровень проагреганта тромбоксана A_2 при исследовании ИФА-методом можно заключить, что данное вещество может оказывать влияние на синтез тромбоксана A_2 . Также высокую активность соединения ДАБ-15 проявило на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*. Блокирующее действие в отношении указанного индуктора может косвенно свидетельствовать об антагонизме к гликопротеиновым рецепторам адгезии (GP VI) к коллагену, что подтверждает также снижение способности тромбоцитов к адгезии на микрофибриллах коллагена под воздействием исследуемого соединения. Таким образом, можно предположить, что соединение ДАБ-15 проявляет комбинированное антиагрегантное действие связанное с ингибированием синтеза тромбоксана A_2 и блокированием рецептора к коллагену.

Современные агнтитромбоцитарные средства такие, как, например, ацетилсалициловая кислота, клопидогрел и др. влияют на один из путей активации тромбоцитов, поэтому их использование при тромботических осложнениях оказывается не всегда достаточным. В настоящее время в мировой практике выступает концепция двойной антитромбоцитарной терапии, когда сочетают два препарата с различными механизмами действия [Jung S., 2018; Lin J., 2018]. Поэтому влияние изученного соединения на два

различных пути агрегации тромбоцитов может иметь важное положительное значение для дальнейшего углубленного исследования фармакологической активности соединения ДАБ-15, что в будущем, возможно, приведет к изучению и созданию новейших уникальных антиагрегантных средств с мультитаргетным механизмом действия.

ВЫВОДЫ

1. Новый химический класс 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола обладает антиагрегантными свойствами. В ходе проведения скрининговых исследований 19 производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола было выявлено соединение-лидер под шифром ДАБ-15, проявляющее высокую антиагрегантную активность *in vitro* и *in vivo*.
2. Высокий уровень антиагрегантной активности обуславливает наличие заместителя в положении N¹¹. Структура заместителя должна содержать ароматическое кольцо с атомом галогена в пара-положении, о чем свидетельствуют данные подструктурного анализа производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-*a*]бензимидазола.
3. Исследуемое соединение ДАБ-15 проявляет выраженную антитромботическую активность на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50 %-ным раствором хлорида железа (III) соединение-лидер по показателю ED₅₀ превосходит препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 5 и 4,8 раза соответственно. По значению ED₅₀ ДАБ-15 было активнее ацетилсалициловой кислоты в 2,7 и сравнимо с клопидогрелем на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током. На модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза соединение ДАБ-15 также продемонстрировало высокую антитромботическую активность по критерию выживаемости мышей и способности снижать морфометрические параметры тромбов в сосудах легких мышей. Так, соединение-лидер приводило к снижению средней площади тромбов на 93,3%, в то время как ацетилсалициловая кислота и клопидогрел уменьшали данный показатель на 66,5 и 76,3% соответственно. Периметр тромбов снижался под влиянием

соединения ДАБ-15, ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела на 59,4, 24,1 и 40,4% соответственно.

4. Соединение ДАБ-15 приводит к ограничению роста массы тромбов, извлеченных из нижней полой вены крыс на модели тромбоза глубоких вен.
5. При экспериментальном моделировании некоронарогенного инфаркта миокарда было установлено, что соединение ДАБ-15 обладает более эффективным антитромботическим действием, чем ацетилсалициловая кислота и клопидогрел.
6. Соединение ДАБ-15 проявляет выраженную активность в отношении индуктора агрегации тромбоцитов коллагена, а также препятствует процессам адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена.
7. Исследуемое вещество значительно снижает уровень тромбоксана В₂ по сравнению с ацетилсалициловой кислотой, выраженно блокирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном, а также процессы адгезии тромбоцитов на микрофибриллах коллагена, что указывает на наличие у соединения ДАБ-15 комбинированного антитромбоцитарного механизма действия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Созданная методология поиска соединений с антиагрегантной активностью может быть использована при синтезе новых веществ и для направленного поиска новых антитромбоцитарных соединений.
2. Рекомендовано проведение фармакокинетических и токсикологических исследований тестируемого образца ДАБ-15 с целью детализации фармакотерапевтического эффекта.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОТНОШЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АСК - ацетилсалициловая кислота

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

АЦ - аденилатциклаза

ГП - гликопротеины

ДАГ - диацилглицерол

ИФ₃ - инозитол-1,4,5-трифосфат

ПГ - простагландины

ПГ₂ - простаглицлин

ТХА₂ - тромбоксан А₂

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

ЦОГ - циклооксигеназа

ФАТ - фактор активации тромбоцитов

ЭГТА - этиленгликольтетраацетат натрия

IC₅₀ - ингибирующая концентрация, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов на 50%

ED₅₀ - эффективная доза, в которой вещество ингибирует процессы агрегации тромбоцитов (продолжает время окклюзии сонной артерии) на 50%

PAR - протеазо-активированные рецепторы

U 46619 - агонист тромбоксановых рецепторов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения// Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37. — № 3. — С. 32–34.
3. Бокерия Л.А., Никитина Т.Г. и др. Этапное лечение пациента с ишемической болезнью сердца и онкопатологией//Клиническая физиология кровообращения.-2014.-4.-С.30-32.
4. 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.15-18.22.
5. Гороховская Г.Н., Юн В.Л. Антитромбоцитарная терапия: современное представление и комплексный подход к проблеме атеротромбоза//РМЖ.- 2013.-34.-С.1737-1741.
6. Гурова Н.А., Мухтаров Т.А. и др. Поиск соединений, удлиняющих эффективный рефрактерный период, среди производных аминокбензимидазолов//Фармация и фармакология.-2015.-3(10).-С. 61-63.
7. Зиганшин А.У., Калинина О.С. Агонисты и антагонисты P2Y-рецепторов в современной клинической практике//Вестник современной клинической медицины.-2017.-10(1).-С.22-28.
8. Косолапов В.А., Ельцова Л.В., Спасов А.А., Анисимова В.А. Антиоксидантные свойства производного пирролобензимидазола - соединения РУ-792 - в эксперименте//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2013.-155(4).-С. 453-456.
9. Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г. и др. Тромбоциты: современный взгляд на структуру и функции//Патогенез.-2016.-14(1).-С.4-13.
10. Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Анисимова В.А. Методологические подходы к изучению механизма антиагрегантного действия нового

производного бензимидазола//Тромбоз, гемостаз и реология.-2016.-67(3).-С. 238-239.

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

12. 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.

13. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов//М.-Литтерра.-2011.

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

15. Марцевич С.Ю. Эффективность и безопасность антитромбоцитарной терапии при первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний//ВНОК.-Москва.-2011.-76 с.

16. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств /Под ред. А.Н. Миронова.– Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. – 944.37.

17. Науменко Л.В., Кузнецова В.А., Спасов А.А. и др. Изменение электрокинетических свойств эритроцитов под воздействием пентоксифиллина и новых гемореологически активных соединений//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины//2012.-153(2).-С. 174-176.

18. Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Тромбоциты и гемостаз//Онкогематология.-2014.-2.-С.65-73.

19. Петров В.И., Шаталова О.В. и др. Анализ фармакотерапии тромбоза глубоких вен нижних конечностей (фармакоэпидемиологическое исследование)//Флебология.-2014.-8(3).-С.32-37.

20. Сакаев, М.Р. Изучение влияния некоторых синаптотропных веществ на тромбоцитарную активность: дис. канд. биол. наук: 14.00.25 /Сакаев Марат Рустамович. – СПб., 2000. – 115с.
21. Саноцкий И.В., Уланова И.П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. - М.: «Медицина», 1975. -327 с.77. 10.
22. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов. - М.: Медицина 1996.
23. Соловьева В.Ю., Джутова Э.Д., Тютюмова Е.А. Антитромбоцитарная терапия, как компонент первичной и вторичной профилактики ишемического инсульта//Медицинский совет.-№8.-2016.-С.24-33.
24. Сумароков А.Б., Широков Е.А., Бурячковская Л.И. Антитромбоцитарная терапия в профилактике ишемического некардиоэмболического инсульта. Основные положения современных рекомендаций//Москва.-2015.-43 с.
25. Танашян М.М., Шабалина А.А., Антонова К.В., Максимова М.Ю.и др. Изменение показателей гемостаза при ишемическом инсульте: роль хронической гипергликемии//Научно-практический журнал «Тромбоз, гемостаз и реология».-2017.-№1.-С. 21-26.
26. Трегубова И.А., Косолапов В.А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы//Успехи физиологических наук.-2012.-43(1).-С. 75-94.
27. Фоякин А.В., Гераскина Л.А. Профилактика ишемического инсульта//ИМА-Пресс.-Москва.-2014.-76 с.
28. Чазов Е.И. К вопросу об атеротромботической болезни//Кардиология.-2001.-41(4).-С.4-7.
29. Шимановский Н.Л., Барышев П.М., Киселева О.А. Реологические свойства крови у геронтологических больных ишемической болезнью сердца//Клиническая геронтология.-2010.-16(9-10).-С. 90.

30. Шляхто Е.В., Конради А.О. Основные направления и перспективы трансляционных исследований в кардиологии//Вестник Росздравнадзора.-2015.-5.-С. 33-37.
31. Яковлев Д.С., Спасов А.А. и др. Влияние 5-НТ_{2А}-антагонистов на кровотоков в сосудах каротидной системы в условиях повышенного уровня серотонина//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2014.-157(3).-С. 328-330.
32. Agarwal A., Firdouse M. et al. Incidence and Management of Thrombotic and Thromboembolic Complications Following the Norwood Procedure: A Systematic Review//Clin. Appl.Thromb. Hemost.-2017.-23(8).-P.911-921.
33. Albarrán L., Dionisio N., López E. et al. The membrane potential modulates thrombin-stimulated Ca²⁺ mobilization and platelet aggregation//Arch. Biochem. Biophys.-2013.-538(2).-P.130-137.
34. Alfredsson J., Neely B., Neely M.L., Bhatt D.L., Goodman S.G. et al. Predicting the risk of bleeding during dual antiplatelet therapy after acute coronary syndromes//Heart.-2017.-103(15).-P.1168-1176.
35. Ambrosio A.L., Di Pietro S.M. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis//Platelets.-2017.-28(2).-P. 138-146.
36. Antonio A. Z., Michael J., Eric C. S., Hyon K. C. The Risk of Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Primary Sjögren Syndrome: A General Population-based Study// J. Rheumatol.-2017.-44(8).-P.1184-1189.
37. Arkhipov M.V. Selection of antiplatelet therapy for patients with stable angina//Kardiologiya.-2018.-(S1).-P.36-41.
38. Aslan J.E. Platelet Rho GTPase regulation in physiology and disease//Platelets.-2018.-25.-P.1-6.
39. Aviña-Zubieta A.J. et al. The Risk of Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Primary Sjögren Syndrome: A General Population-based Study//J. Rheumatol.-2017.-44(8).-P.1184-1189.
40. Beck S., Leitges M., Stegner D. Protein kinase C λ is dispensable for platelet function in thrombosis and hemostasis in mice//Cell Signal.-2017.-38.-P.223-229.

41. Belova L.A. Dipyridamole in the treatment and prevention of cerebral venous thrombosis in women using hormonal contraceptives//Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.-2017.-117(12).-P.116-123.
42. Bijak M., Saluk-Bijak J. Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets//BMC. Complement Altern. Med.-2017.-17.-P.1-8.
43. Bijak M., Szelenberger R., et al. Inhibitory Effect of Flavonolignans on the P2Y₁₂ Pathway in Blood Platelets//Molecules.-2018.-23(374).-P.1-10.
44. Borem L.M.A., Neto J.F.R. et al. The role of the angiotensin II type I receptor blocker telmisartan in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a brief review//Hypertens. Res.-2018.-41(6).-P.394-405.
45. Bryckaert M., Rosa J.P., Denis C.V., Lenting P.J. Of von Willebrand factor and platelets//Cell Mol. Life Sci.-2015.-72(2).-P.307-26.
46. Bye A.P., Unsworth A.J., Gibbins J.M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks//Thromb. Haemost.-2016.-14(5).-P.918-930.
47. Chang Y., Hsu W.H. et al. Structure-activity relationship of three synthesized benzimidazole-based oligosaccharides in human platelet activation//Int. J. Mol. Med.-2017.-40(5).-P.1520-1528.
48. Chen H. Role of thromboxane A₂ signaling in endothelium-dependent contractions of arteries//Prostaglandins Other Lipid. Mediat.-2018.-134.-P.32-37.
49. Chen W.C., Lin K.H., Huang Y.T., Tsai T.J. et al. The risk of lower gastrointestinal bleeding in low-dose aspirin users//Aliment. Pharmacol. Ther.-2017.-45(12).-P.1542-1550.
50. Christen J.R. et al. Long-lasting thrombocytopenia induced by glycoprotein IIb/IIIa inhibitor//Rev. Med. Interne.-2017.-38(11).-P.769-773.
51. Ciciliano J.C., Sakurai Y., Myers D.R. et al. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach//Blood.-2015.-126(6).-P.817-824.

52. Cong Y., Wang L., Peng R. et al. Timosaponin AIII induces antiplatelet and antithrombotic activity via Gq-mediated signaling by the thromboxane A2 receptor//Sci. Rep.-2016.-6.-P.1-13.
53. Consonni A., Cipolla L., Guidetti G. et al. Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase β in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ signaling//Blood.-2012.-119.-P.847-856.
54. Crea F., Libby P. Acute coronary syndromes: the way forward from mechanisms to precision treatment//Circulation.-2017.-136.-P.1155–1166.
55. D'Ascenzo F., Taha S., Moretti C. et al. Meta-analysis of randomized controlled trials and adjusted observational results of use of clopidogrel, aspirin, and oral anticoagulants in patients undergoing percutaneous coronary intervention//Am. J. Cardiol.-2015.-115(9).-P.1185-1193.
56. Da Q. et al. Free hemoglobin increases von Willebrand factor-mediated platelet adhesion in vitro: implications for circulatory devices//Blood.-2015.-126(20).-P.-2338-2341.
57. Darwish M., Bond M. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of bendamustine and its metabolites//Cancer.Chemother. Pharmacol.-2015.-75(6).-P.1143-1154.
58. Decouture B., Dreano E., Belleville-Rolland T. et al. Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice//Blood.-2015.-126(15).-P.1823-1830.
59. Di Minno G. et al. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol//J. Pharmacol. Exp. Ther. -1983.- 225(1).- P.57-60.91.
60. Fegghi S., Munday A.D., Tooley W.W., Rajsekar S. et al. Glycoprotein Ib-IX-V Complex Transmits Cytoskeletal Forces That Enhance Platelet Adhesion//Biophys. J.-2016.-111(3).-P.601-608.
61. Floyd C.N., Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance//Pharmacol. Ther.-2014.-141(1).-P.69-78.

62. Fuentes E., Badimon L., Caballero J. et al. Protective mechanisms of adenosine 5'-monophosphate in platelet activation and thrombus formation//*Thromb. Haemost.*-2014.-111(3).-P.491-507.
63. Fuentes M., Sepúlveda C. et al. Matico prevents collagen-induced platelet activation by decreasing phospholipase C-gamma 2 and protein kinase C phosphorylation signaling//*Journal of traditional and complementary medicine.*-2017.-8(1)-P.66-71.
64. Gandhi D.M., Majewski M.W., Rosas R.Jr. et al. Characterization of Protease-Activated Receptor (PAR) ligands: Parmodulins are reversible allosteric inhibitors of PAR1-driven calcium mobilization in endothelial cells//*Bioorg. Med. Chem.*-2018.-26(9).-P.2514-2529.
65. Gao W., Wang K., Zhang L. Pharmacological inhibition of S6K1 facilitates platelet activation by enhancing Akt phosphorylation//*Platelets.*-2017.-P. 1-10
66. Gardiner E.E., Andrews R.K. Structure and function of platelet receptors initiating blood clotting//*Adv. Exp. Med. Biol.*-2014.-844.-P.263-275.
67. George M.J., Bynum J. et al. Platelet biomechanics, platelet bioenergetics, and applications to clinical practice and translational research//*Platelets.*-2018.-26.-P.1-9.
68. Ghasemzadeh M., Hosseini E., Roudsari Z.O., Zadkhak P. Intraplatelet reactive oxygen species (ROS) correlate with the shedding of adhesive receptors, microvesiculation and platelet adhesion to collagen during storage: Does endogenous ROS generation downregulate platelet adhesive function?//*Thromb. Res.*-2018.-163.-P.153-161.
69. Górka J., Polok K., Fronczek J. et al. Myocardial Injury is More Common than Deep Venous Thrombosis after Vascular Surgery and is Associated with a High One Year Mortality Risk//*Eur. J.Vasc.Endovasc. Surg.*-2018.-S1078-5884(18).-P.102-103.
70. Greene T.K., Schiviz A. et al. Towards a standardization of the murine tail bleeding model//*J.Thromb. Haemost.*-2010.-8(12).-P. 2820-2822.

71. Guerrero C., Garay A., Ariza-Solé A., Formiga F. et al. Anemia in patients with acute coronary syndromes treated with prasugrel or ticagrelor: Insights from the RENAMI registry//*Thromb. Res.*-2018.-167.-P.142-148.
72. Guglielmi G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience//*J. Neurosurg.* -1991.- 75(1).- P.8-14.
73. Gupta S., Cherpokova D., Spindler M. et al. GPVI signaling is compromised in newly formed platelets after acute thrombocytopenia in mice//*Blood.*-2018.- 131(10).-P.1106-1110.
74. Haastrup P. et al. Enteric-coated aspirin does not reduce the risk of gastrointestinal side effects//*Ugeskr. Laeger.*-2014.-176(9).
75. Hagedom I., Vogtle T., Nieswandt B. Arterial thrombus formation. Novel mechanisms and targets// *Hemostaseologie.*- 2010.- 30(3).- P.127-135.
76. Haybar H., Khodadi E., Zibara K., Saki N. Platelet Activation Polymorphisms in Ischemia//*Cardiovasc.Hematol.Disord. Drug Targets.*-2018.- P.153-161.
77. Hekerova M. Bleeding during anticoagulant and antiaggregation therapy as a cause of acute abdomen//*Rozhl. Chir.*-2017.-96(10).-P.438-441.
78. Henke P.K., Varma M.R. Fibrotic injury after experimental deep vein thrombosis is determined by the mechanism of thrombogenesis//*Thrombosis and Haemostasis.*-2007.-98.-P. 1045-1055.
79. Holinstat M., Boutaud O., Apopa P.L. et al. Protease-activated receptor signaling in platelets activates cytosolic phospholipase A₂ α differently for cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase catalysis//*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2011.-31(2).-P.435-442.
80. Hsia C.H., Jayakumar T. et al. Structure-Antiplatelet Activity Relationships of Novel Ruthenium (II) Complexes: Investigation of Its Molecular Targets//*Molecules.*-2018.-23(2).-P.477.

81. Hsia C.W., Velusamy M., Tsao J.T. et al. New therapeutic agent against arterial thrombosis: an Iridium(III)-derived organometallic compound//*Int. J. Mol. Sci.*-2017.-18(12).
82. Hussain M.A., Al-Omran M., Creager M.A. et al. Antithrombotic Therapy for Peripheral Artery Disease: Recent Advances//*J. Am. Coll. Cardiol.*-2018.-71(21).-P.2450-2467.
83. Irfan M., Kwon T.H., Yun B.S. et al. Eiseniabicyclis (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P2Y₁₂ receptor signaling pathway//*Phytomedicine.*-2018.-1(40).-P.79-87.
84. Isono A., Tate S. et al. Involvement of cAMP-dependent unique signaling cascades in the decrease of serine/threonine-phosphorylated proteins in boar sperm head//*Theriogenology.*-2016.-85(6).-P.1152-1160.
85. Jamasbi J., Ayabe K., Goto S., Nieswandt B. et al. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future//*Thromb. Haemost.*-2017.-117(7).-P.1249-1257.
86. Jayakumar T., Chen W.F., Lu W.J., Chou D.S. et al. A novel antithrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylate cyclase: ex vivo and in vivo studies//*J. Nutr. Biochem.*-2013.-24(6).-P.1086-1095.
87. Jbara M. et al. Abciximab-induced delayed profound thrombocytopenia//*BMJ. Case. Rep.*-2017.-P.1-10.
88. Jeraj L., Spirkoska A., Ježovnik M.K., Poredoš P. Deep vein thrombosis and properties of the arterial wall//*Vasa.*-2018.-27.-P.1-5.
89. Jones S., Evans R.J. et al. Ca²⁺ influx through P2X₁ receptors amplifies P2Y₁ receptor-evoked Ca²⁺ signaling and ADP-evoked platelet aggregation//*Mol. Pharmacol.*-2014.-86(3).-P.243-251.
90. Jones W.S., Patel M.R. Antithrombotic Therapy in Peripheral Artery Disease: Generating and Translating Evidence Into Practice//*J. Am. Coll. Cardiol.*-2018.-71(3).-P.352-62.
91. Jung C. et al. Update ESC Guideline 2017 - Acute Myocardial Infarction (STEMI)//*Dtsch. Med. Wochenschr.*-2018.-143(11).-P.797-801.

92. Juška A. Thrombin-stimulated discharge of calcium stores in human platelets: analysis of experimental data//Arch. Biochem. Biophys.-2012.-526(1).-P.78-83.
93. Kang N.I., Yoon H.Y. et al. Protein kinase CK2/PTEN pathway plays a key role in platelet-activating factor-mediated murine anaphylactic shock//J. Immunol.-2011.-186(11).-P.6625-6632.
94. Kassouf N., Ambily A., Watson S. et al. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate stimulates Ca(2+) elevation and Akt phosphorylation to constitute a major mechanism of thromboxane A2 formation in human platelets//Cell Signal.-2015.-27(7).-P.1488-1498.
95. Khodor S., Castro M., McNamara C., Chaulagain C.P. Clopidogrel-induced refractory thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with rituximab//Hematol. Oncol. Stem. Cell. Ther.-2016.-9(2).-P.76-79.
96. Khokhar M.A. et al. Droperidol for psychosis-induced aggression or agitation//Cochrane. Database Syst. Rev.-2016.-P.1-9.
97. Kim J.H., Lee J., Kang S., Moon H., Chung K.H., Kim K.R. Antiplatelet and Antithrombotic Effects of the Extract of *Lindera obtusiloba* Leaves//Biomol. Ther. (Seoul).-2016.-24(6).-P.659-664.
98. Kucheryavenko A.F., Spasov A.A., Petrov V.I., Anisimova V.A. Antiaggregant activity of a new benzimidazole derivative//Bull. Exp. Biol.-2014.-156(6).-P.796-798.
99. Koupenova M., Ravid K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity//Front. Pharmacol.-2018.-9(37).-P.1-9.
100. Kumbar M.N., Kamble R.R. et al. Design and Microwave Assisted Synthesis of Coumarin Derivatives as PDE Inhibitors//Int. J. Med. Chem.-2016.-P.1-16.
101. Kupka D., Sibbing D. P2Y12 receptor inhibitors: an evolution in drug design to prevent arterial thrombosis//Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.-2018.-14(3).-P.303-315.
102. Kurz K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride//Thrombosis Research. -1990. -15.- P.269-280.

103. Kuzin M., Schoretsanitis G. et al. Effects of the Proton Pump Inhibitors Omeprazole and Pantoprazole on the Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Venlafaxine//*Clin. Pharmacokinet.*-2018.-57(6).-P.729-737.
104. Kwon H.W., Shin J.H. Antiplatelet and antithrombotic effects of cordycepin-enriched WIB-801CE from *Cordycepsmilitaris* ex vivo, in vivo, and in vitro//*BMC Complementary and alternative medicine.*-2016.-16(1).-P. 508110.
105. Kwon S.U., Kim J.S. Antithrombotic Therapy//*Front. Neurol. Neurosci.*-2016.-40.-P.141-151.
106. Lan G., Fei-Li Z., Shu-Chuen Li et al. Efficacy and safety of thrombin-receptor antagonist (Atopaxar and Vorapaxar) in patients with acute coronary syndrome or coronary artery disease – a meta-analysis of randomized controlled trials//*Value in health regional issues.*-2015.-6.-P.22-32.
107. Li J.L., Fu Y., Qin S.B., Liang G.K. et al. Association between P2RY12 gene polymorphisms and adverse clinical events in coronary artery disease patients treated with clopidogrel: A systematic review and meta-analysis//*Gene.*-2018.-657.-P.69-80.
108. Lin J., Han Z., Wang C. et al. Dual therapy with clopidogrel and aspirin prevents early neurological deterioration in ischemic stroke patients carrying CYP2C19*2 reduced-function alleles//*Eur. J.Clin. Pharmacol.*-2018.-P.1-10.
109. Liu L.L., Li X. et al. Sibelium in combination with dibazole in the treatment of angioneurotic headache//*J. Biol.Regul.Homeost. Agents.*-2017.-31(3).-P.653-657.
110. Makhoul S., Walter E., Pagel O., Walter U. et al. Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets//*Nitric Oxide.*-2018.-76.-P.71-80.
111. Magwenzi S., Woodward C., Wraith K.S., Aburima A. et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade//*Blood.*-2015.-125(17).-P.2693-2703.
112. Mangin P.H., Onselaer M.B., Receveur N., Le Lay N. et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through GPVI//*Haematologica.*-2018.-P.1-26.

113. Marcinczyk N., Jarmoc D., Leszczynska A., Zakrzaska A. et al. Antithrombotic Potential of Tormentil Extract in Animal Models//Front. Pharmacol.-2017.-P.1-12.
114. McFadyen J.D., Schaff M., Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis//Nat. Rev. Cardiol.-2018.-15.-P.181–191.
115. Mohamed A.R., El-Hadidy W.F., Manna H.F. Assessment of the prophylactic role of aspirin and/or clopidogrel on experimentally induced acute myocardial infarction in hypercholesterolemic rats//Drugs R. D.-2014.-14(4).-P. 233-239.
116. Mohring A., Piayda K., Dannenberg L., Zako S. et al. Thromboxane Formation Assay to Identify High On-Treatment Platelet Reactivity to Aspirin//Pharmacology.-2017.-100(3-4).-P.127-130.
117. Moon J.Y., Franchi F., Rollini F., Angiolillo D.J. Role for Thrombin Receptor Antagonism With Vorapaxar in Secondary Prevention of Atherothrombotic Events: From Bench to Bedside//J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.-2018.-23(1).-P.23-37.
118. Morales Vidal S.G., Ruland S. Platelet antiaggregants in stroke prevention//Neurologic Clinics.-2013.-31(3)-P.633-657.
119. Münzer P., Mittelstädt S., Geue S. et al. Ceramidase critically affects GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation//Biochem. Biophys. Res. Commun.-2018.-496(3).-P.792-798.
120. Munzer P., Walker-Allgaier B., Geue S. et al. CK2 β regulates thrombopoiesis and Ca²⁺-triggered platelet activation in arterial thrombosis//Blood.-2017.-130(25).-P.2774-2785.
121. Murakami M., Nakatani Y. et al. Regulatory Functions of Phospholipase A₂//Crit. Rev. Immunol.-2017.-37(2-6).-P.121-179.
122. Naik M.U., Patel P., Derstine R. et al. Ask1 regulates murine platelet granule secretion, thromboxane A₂ generation, and thrombus formation//Blood.-2017.-129(9).-P.1197-1209.

123. Ngo A.T.P., McCarty O.J.T., Aslan J.E. TRPing out Platelet Calcium: TRPM7 (Transient Receptor Potential Melastatin-Like 7) Modulates Calcium Mobilization and Platelet Function via Phospholipase C Interactions//*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2018.-38(2).-P.285-286.
124. Olas B., Kontek B. et al. Inhibition of blood platelet adhesion by phenolics' rich fraction of *Hippophaerhamnoides L.* fruits//*Physiol. Pharmacol.*-2017.-68(2).-P.223-229.
125. Onselaer M.B., Hardy A.T. et al. Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI//*Blood Adv.*-2017.-1(19).-P.1495-1504.
126. Pawluk S.A., Roels C.A. et al. A review of pharmacokinetic drug-drug interactions with the anthelmintic medications albendazole and mebendazole//*Clin. Pharmacokinet.*-2015.-54(4).-P.371-383.
127. Perez-Campos-Mayoral L., Perez-Campos E. et al. Better detection of platelet aggregation in patient with metabolic syndrome using epinephrine and ADP//*Diabetol. Metab. Syndr.*-2014.-6(93).-P.1-7.
128. Pierre S., Linke B. et al. GPVI and Thromboxane Receptor on Platelets Promote Proinflammatory Macrophage Phenotypes during Cutaneous Inflammation//*J. Invest. Dermatol.*-2017.-137(3).-P.686-695.
129. Polgár L., Soós P., Lajkó E., Láng O. et al. Platelet impedance adhesiometry: A novel technique for the measurement of platelet adhesion and spreading//*Int. J. Lab. Hematol.*-2018.-40(3).-P.372-381.
130. Poulter N.S., Pollitt A.Y., Owen D.M. et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets//*J. Thromb. Haemost.*-2017.-15(3).-P.549-564.
131. Qiao J., Arthur J.F., Gardiner E.E., Andrews R.K. et al. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species//*Redox Biol.*-2018.-14.-P.126-130.
132. Quillard T., Franck G., Mawson T., Folco E., Libby P. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques// *Curr Opin Lipidol.*-2017.- 28(5).-P.434-441.

133. Rao M. L., Tang M. et al. Effects of paeoniflorin on cerebral blood flow and the balance of PGI₂/TXA₂ of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury//Yao XueXue Bao.-2014.-49(1).-P. 55-60.
134. Raslan Z., Naseem K.M. The control of blood platelets by cAMP signaling//Biochem. Soc. Trans.-2014.-42(2).-P.289-294.
135. Reed G.W., Rossi J.E., Cannon C.P. Acute myocardial infarction//Lancet.-2017.-14(389).-P.197-210.
136. Rollini F., Franchi F. et al. Pharmacodynamic effects of cangrelor on platelet P2Y₁₂ receptor-mediated signaling in prasugrel-treated patients//JACC Cardiovasc. Interv.-2014.-7(4).-P.426-434.
137. Rossi E., Pericacho M., Bachelot-Loza C. et al. Human endoglin as a potential new partner involved in platelet-endothelium interactions//Cell. Mol. Life Sci.-2017.-P.1269-1284.
138. Rwibasira R.G., Khan G.J., Kong Y. Protease-Activated Receptor 4 (PAR4): A Promising Target for Antiplatelet Therapy//Int. J. Mol. Sci.-2018.-19(2).-P.573.
139. Ryu S.K., Ahn D.S., Cho Y.E. et al. Augmented sphingosylphosphorylcholine-induced Ca²⁺-sensitization of mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive rat//Naunyn.Schmiedebergs Arch. Pharmacol.-2006.-373(1).-P. 30-6.
140. Sather P.C., Santana M. et al. Human thromboxane synthase: comparative modeling and docking evaluation with the competitive inhibitors Dazoxiben and Ozagrel//J. Enzyme Inhib. Med. Chem.-2014.-29(4).-P.527-531.
141. Schiele F. et al. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization//Blood.-2013.-121(18).-3554-3562.
142. Seredenin S.B., Tsorin I.B. et al. On the mechanism of anti-ischemic effects of afobazole//Bull. Exp. Biol. Med.-2013.-155(6).-P.760-763.
143. Shaturnyĭ V.I., Shakhidzhanov S.S., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Activators, receptors and signal transduction pathways of blood platelets//Biomed. Khim.-2014.-60(2).-P.182-200.

144. Shi P., Zhang L. et al. Platelet-specific p38a deficiency improved cardiac function after myocardial infarction in mice//*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*-2017.-37(12).-P.185-196.
145. Siau K., Hannah J.L. et al. Stopping antithrombotic therapy after acute upper gastrointestinal bleeding is associated with reduced survival//*Postgrad. Med. J.*-2018.-94(1109).-P.137-142.
146. Signorello M.G., Leoncini G. Regulation of cAMP Intracellular Levels in Human Platelets Stimulated by 2-Arachidonoylglycerol//*J. Cell. Biochem.*-2016.-117(5).-P.1240-1249.
147. Song W., Ma Y.Y., Miao S. et al. Pharmacological actions of miltirone in the modulation of platelet function//*Acta. Pharmacol.Sin.*-2018.-P.1-9.
148. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Anisimova V.A. Calcium-dependend mechanism of the antiplatelet activity of benzimidazole derivative RU-891//*Eksp.Klin. Farmakol.*-2014.-77(3).-P.16-19.
149. Stavenuiter F., Gale A.J., Heeb M.J. Phosphorylation of protein S by platelet kinases enhances its activated protein C cofactor activity//*FASEB J.*-2013.-27(7).-P.2918-2925.
150. Suzuki T. Hetero-oligomerization and Functional Interaction between Purinergic Receptors Expressed in Platelets to Regulate Platelet Shape Change//*YakugakuZasshi.*-2015.-135(12).-P.1335-1340.
151. Swieringa F., Baaten C.C., Verdoold R., Mastenbroek T.G., Rijnveld N., van der Laan K.O., Breel E.J., Collins P.W., Lancé M.D., Henskens Y.M., Cosemans J.M., Heemskerk J.W., van der Meijden P.E. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow//*Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*-2016.-36.-P.692–699.
152. Tilemann L., Mohr S.K. et al. Platelet function monitoring for stent thrombosis in critically III patients with an acute Coronary syndrome//*J. Interv. Cardiol.*-2017.-P.1-8.
153. Traby L., Kaider A., Kollars M. et al. Effects of clopidogrel with or without aspirin on the generation of extracellular vesicles in the microcirculation and in

- venous blood: A randomized placebo controlled trial//*Thromb. Res.*-2018.-167.-P.149-155.
154. Tsoumani M.E., Kalantzi K.I. et al. Clopidogrel generic formulations in the era of new antiplatelets: a systematic review//*Curr.Vasc. Pharmacol.*-2014.-12(5).-P.766-77.
155. Valet C., Severin S., Chicanne G., Laurent P.A. et al. The role of class I, II and III PI 3-kinases in platelet production and activation and their implication in thrombosis//*Adv. Biol. Regul.*-2016.-61.-P.33-41.
156. Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. Calcium signaling in platelets//*J. Thromb. Haemost.*-2009.-7(7).-P.1057-1066.
157. Veron-Esquivel D., Batiz-Armenta F., Cazares-Diazleal A.C., Oviedo-Moguel S., Jarvio-Fernandez S.M., Arce-Gonzalez J.M., Ivey-Miranda J.B. Validation of DAPT Score for Prolonged Dual Antiplatelet Therapy in Acute Myocardial Infarction Patients//*Hellenic. J. Cardiol.*-2018.-P.1-32.
158. Wang F., Han J. Delayed eosinophilic gastroenteritis, a possible side effect of clopidogrel?//*Int. J. Cardiol.*-2013.-165(3).-P.53-54.
159. Wang Y., Zhao Z., Shi S., Gao F. et al. Calcium sensing receptor initiating cystathionine-gamma-lyase/hydrogen sulfide pathway to inhibit platelet activation in hyperhomocysteinemia rat//*Exp. Cell Res.*-2017.-358(2).-P.171-181.
160. Weisshaar S., Litschauer B. et al. Ticagrelor mitigates ischaemia-reperfusion induced vascular endothelial dysfunction in healthy young males - a randomized, single-blinded study//*Br. J.Clin. Pharmacol.*-2017.-83(12).-P.2651-2660.
161. Wu H. Calcium signaling in platelet activation//*Sheng Li KeXueJin Zhan.*-2012.-43(6).-P.417-421.
162. Yamamoto J., Inoue N. et al. Global Thrombosis Test (GTT) can detect major determinants of haemostasis including platelet reactivity, endogenous fibrinolytic and thrombin generating potential//*Thrombosis Research.*-2014.-133.-P. 919-926

163. Yan Y., Jiang W., Liu J., Xu W., Qian H. Expression of Recombinant Phosphodiesterases 3A and 3B Using Baculovirus Expression System//Iran J. Biotechnol.-2016.-14(4).-P.236-242.
164. Yao W.C., Yuan L.T., Yang W.B. et al. Development of Benzimidazole Derivatives as Novel Anti-platelet Drugs//Curr. Pharm. Biotechnol.-2017.-18(7).-P.594-605.
165. Zhang H.H., Yu W.Y., Li L. Protective effects of diketopiperazines from MoslaeHerba against influenza A virus-induced pulmonary inflammation via inhibition of viral replication and platelets aggregation//Journal of ethnopharmacology.-2018.-215-P.156-166.
166. Zhang Q., Liao X., Wu F. The naphthoquinone plumbagin suppresses ADP-induced rat platelet aggregation through P2Y1-PLC signaling pathway//Pak. J. Pharm. Sci.-2017.-30(2).-P.573-578.
167. Zhang X.H., Zhou S.Y., Feng R., Wang Y.Z. et al. Increased prostacyclin levels inhibit the aggregation and activation of platelets via the PI3K-AKT pathway in prolonged isolated thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation//Thromb. Res.-2016.-139.-P.1-9.
168. Zhang Y., Li L., Zhao Y., Han H. et al. The Myosin II Inhibitor, Blebbistatin, Ameliorates FeCl₃-induced Arterial Thrombosis via the GSK3 β -NF- κ B Pathway//Int. J. Biol. Sci.-2017.-13(5).-P. 630-639.
169. Zhao X., Guo F., Hu J. et al. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from Laminaria Japonica//Thromb. Res.-2016.-144.-P. 46-52.