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

На правах рукописи

#### АТАПИНА НАТАЛЬЯ ВАЛЕНТИНОВНА

### АНТИАГРЕГАНТНАЯ, АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ И ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,

доцент

Куркин Денис Владимирович

Научный консультант:

доктор химических наук,

профессор

Брель Анатолий Кузьмич

#### Оглавление

<b>BBE</b>	ДЕНИЕ	5
		_

ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПОИСКА НОВЫХ АНТИАГРЕГАНТОВ (ОБЗОР		
ЛИТЕРАТУРЫ)		
1.1. Представления о патогенетических механизмах тромбообразования в		
современной медицине11		
1.2. Современные антиагрегантные лекарственные средства		
1.3. Модификации молекулы ацетилсалициловой кислоты и производных		
гидроксибензойных кислот в современной медицине35		
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		
2.1. Материалы исследования		
2.2. Дизайн исследования		
2.3. Метод АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов in vitro и in vivo47		
2.4. Определение параметров острой токсичности		
2.5. Моделирование артериального тромбоза, аппликацией раствором FeCl <sub>3</sub>		
48		
2.6. Метод артериального тромбозавызванного электрическим током 49		
2.7. Метод моделирования острого нарушения мозгового кровообращения 50		
2.8. Метод стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД 51		
2. 9. Методика оценки неврологического дефицита животных 52		
2.10. Методы изучения коагуляционного гемостаза крови 53		
2.11. Метод моделирования хронического нарушения мозгового		
кровообращения		
2.12. Методы оценки психоневрологического состояния, когнитивных		
функций у животных		
2.13. Методы оценки уровня мозгового кровотока и оценка		
вазодилатирующей функции эндотелия57		
2.14. Метод оценки простациклин-синтезирующей активности эндотелия58		
2.15. Статистическая обработка результатов исследований		

ГЛАВА 3. СКРИНИНГ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИ	X			
АНТИАГРЕГАНТНОЙ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ,	В			
РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ 60				
3.1. Поиск соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов in vitro 60				
3.2. Поиск соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов in vivo. 68				
3.3. Изучение антитромботической активности соединений на модел	ІИ			
артериального тромбоза, вызванного нанесением раствора хлорида желе	за			
(III) на сонную артерию крыс				
3.4. Исследование антитромботического действия веществ на модел	ΙИ			
артериального тромбоза, индуцированного электрическим током 72				
3.5. Изучение острой токсичности и расчет терапевтического индекса 73				
3.6. Заключение				
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТ	И			
ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ У ЖИВОТНЫХ	C			
ПРЕМОРБИДНЫМ ФОНОМ				
4.1. Исследование антиагрегантной активности на модели АД	Φ			
индуцированной агрегации (in vivo)				
4.2. Оценка противотромботического действия на модели артериального	ГО			
тромбоза, вызванного нанесением хлорида железа (III) на сонную артери	Ю			
крыс				
4.3. Изучение влияния соединений на время кровотечения 82				
4.4. Заключение				
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИ	Я			
СОЕДИНЕНИЯ С-60				
5.1. Изучение влияния соединения С-60 на психоэмоциональный стату	уc			
животных с ишемией головного мозга, смоделированной методо	M			
необратимой перевязки общих сонных артерий85				

5.2. Изучение влияния соединения С-60 на психоэмоциональный статус
животных с ишемией головного мозга, смоделированной методом
интравазальной окклюзии левой средней мозговой артерии90
5.3. Изучение влияния соединения С-60 на психоэмоциональный статус
животных с ишемией головного мозга, смоделированной методом
стенозирования общих сонных артерий95
5.4. Заключение
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ С-60 НА
ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ ДЕФИЦИТ, НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ГЕМОСТАЗА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ У КРЫС С
ХРОНИЧЕСКИМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ. 100
6.1. Влияние соединения С-60 на поведение животных на модели ХНМК в
постишемический период103
6.2. Анализ влияния соединения С-60 на показатели гемостаза на модели
хронического нарушения мозгового кровообращения 105
6.3. Исследование влияния соединения С-60 на простациклин-
синтезирующую и вазодилатирующую функции эндотелия на модели
XHMK
6.4. Заключение
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ110
ВЫВОДЫ 118
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ121
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАШЕНИЙ140

#### **ВВЕДЕНИЕ**

#### Актуальность темы исследования

Одним из патогенетических звеньев сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний является тромбообразование. В пожилом и старческом возрасте частота тромбозов увеличивается в несколько раз и достигает 200 случаев на 100 000 человек в год (Чазов Е.И., 2008; Мирзоян Р.С. и др., 2009; Спасов А.А. и др., 2013; Дедов И.И., 2013, 2015). С каждым годом число пациентов с сосудистыми поражениями постоянно увеличивается, так, в экономически развитых странах ежегодно отмечается около 1 млн. случаев ишемического инсульта (ИИ), а к 2030 году прогнозируется увеличение данного показателя до 3,4 млн. (Roger V.L. et al., 2011; Virani S.S. et al., 2021). Сахарный диабет (СД) является одним из основных факторов риска, способствующих формированию тромбов. В России по состоянию на начало 2021 года насчитывалось свыше 4,7 млн., а в мире (по данным IDF) более 530 млн. людей с СД (Дедов И.И. и др., 2021).

Таким образом, разработка новых соединений проявляющих антиагрегантную активность в ряду производных гидроксибензойных кислот является актуальным.

Тема диссертации утверждена решением Ученого Совета ВолгГМУ (от 15 января 2020г., протокол № 5) и включена в план НИР.

#### Степень научной разработанности проблемы

Ключевая роль в процессах тромбообразования принадлежит тромбоцитам. Адгезия, активация и синтез тромбоксана A2 являются основными стадиями образования тромба (Зиганшин А.У., Калинина О.С., 2017; Swieringa F. et al., 2017). Стимуляция процесса тромбообразования заключается во взаимодействии тромбоцитов с эндогенными проагрегирующими веществами и молекулами. (Кубатиев А.А. и др., 2016; Ghasemzadeh M. et al., 2018).

Широкое применение существующих антиагрегантов, таких как аспирин, клопидогрел, прасугрел и тикагрелор, и антагонистов гликопротеина IIb/IIIa, ограничено из-за повышенного риска кровотечений и устойчивости к

антитромбоцитарным препаратам. Следовательно, целесообразны дальнейшие поиски эффективных и безопасных антитромбоцитарных препаратов (Ostrowska, M. et al., 2019; Rengasamy K.R.R. et al., 2019).

В поиске новых антиагрегантных препаратов активно принимают участие химики и фармакологи исследовательских лабораторий всего мира. Дериватизация молекулы гидроксибензойных кислот путём присоединения к ней различных заместителей позволяет сохранить исходный механизм действия, изменить физико-химические свойства и добавить ряд плейотропных эффектов (Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., 2021; Патент РФ № RU 2632005 C1).

**Цель исследования** — провести поиск ингибиторов агрегации тромбоцитов среди новых производных гидроксибензойных кислот в ряду замещённых амидов и их солевых форм, исследовать их антитромбогенную и церебропротективную активность.

#### Задачи исследования

- 1. Выполнить поиск соединений, проявляющих высокую антиагрегантую активность *in vitro* в ряду новых производных гидроксибензойных кислот.
- 2. Оценить антиагрегантную активность соединений *in vivo* в ряду новых производных гидроксибензойных кислот и определить параметры острой токсичности для наиболее активных соединений.
- 3. Исследовать антитромботическое действие наиболее активных соединений.
- 4. Изучить действие наиболее активных соединений на тромбогенный потенциал крови, антитромботическую активность и продолжительность кровотечения у животных с преморбидным фоном.
- 5. Для соединения лидера провести оценку церебропротекторного эффекта при моделировании острого или хронического нарушения мозгового кровообращения.
- 6. Оценить выраженность влияния соединения лидера на показатели гемостаза у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения.

#### Научная новизна работы

В ряду новых производных гидроксибензойных кислот впервые проведен целенаправленный поиск соединений, оказывающих влияние на процессы агрегации тромбоцитов, эндотелио- и церебропротективное действие.

По результатам выполненных исследований было выявлено вещество С-60, которое по совокупности тестов было признано наиболее активным и малотоксичным. Также было проанализировано его влияние на сосудистотромбоцитарный гемостаз *in vitro* и *in vivo*, в результате — получены данные, подтверждающие наличие у него выраженных антиагрегантных свойств. Впервые, на моделях тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного нанесением на поверхность сосуда хлорида железа (III) или воздействием электрического тока, при СД, острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения, доказаны антитромботические свойства этого соединения. Впервые проведен анализ его церебропротективных эффектов.

#### Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящем исследовании экспериментально доказано, что изучение и разработка новых производных гидроксибензойных кислот имеют перспективу для создания на их сонове антиагрегантных и антитромботических средств, которые обладают дополнительным эндотелиоцеребропротекторным действием. Выявлено наиболее активное вещество под лабораторным шифром С-60, на основе экспериментальных данных установлены оптимальные дозы, в которых данное соединение оказывало антиагрегантное, антитромботическое и церебропротективное действие. Получены новые данные об антитромботических свойствах исследумого соединения С-60 на экспериментальных моделях тромбозов, широко распространённых в доклинических исследованиях (индуцированных хлоридом железа (III) или электрическим током), у различных групп животных (здоровые, с экспериментальным сахарным диабетом или старые). Соединение С-60 в меньшей степени чем ацетилсалициловая кислота (ACK) влияло продолжительность кровотечения. Исследование на

церебропротективной активности соединения C-60 позволило установить, что оно в более низкой дозе, чем АСК, проявляет сопоставимое церебропротективное и эндотелиопротективное действие у животных с острыми или хроническими формами нарушений мозгового кровообращения.

#### Методология и методы диссертационного исследования

Эксперименты выполняли, стремясь максимально разносторонне оценить спектр фармакологической активности исследуемых производных гидроксибензойных кислот. Исследования выполнены в соответствии «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н. и др., 2012). Исследователи соблюдали этические нормы работы с модельными организмами, в соответствии с принципом «3R» выбирали валидные экспериментальные модели, минимально возможное количество животных. Заключение и выводы основаны на результатах исследований, выполненных автором, составлены и интерпретированы с учётом данных, изложенных в научной литературе.

#### Реализация результатов исследования

Полученных при проведении диссертационного исследования результаты, позволили разработать и предложить программу по целенаправленному поиску среди новых производных гидроксибензойных кислот с остатками нейроактивных аминокислот веществ с антитромботическим, антиагрегантным, эндотелиопротективным и церебропротективным действием. Предложенная программа реализуется в планировании и разработке синтеза новых веществ на кафедре химии ВолгГМУ, а также в научной работе кафедры фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ, лабораториях НЦИЛС ВолгГМУ.

#### Положения, выносимые на защиту

1. В ряду новых производных гидроксибензойных кислот выявлены соединения С-10 (натриевая соль 4-ацетоксибензоиламиноуксусной кислоты), С-24 (дикалиевая соль N-салицилоилглицина), С-60 (дикалиевая соль N-(3-оксибензоил)таурина), С-61 (дикалиевая соль N-(4-оксибензоил)таурина) с

выраженной антиагрегантной активностью. Наиболее активное соединение С-60 обладало антиагрегантной и антитромботической активностями как у животных без патологии, так и у животных с преморбидным фоном (возраст или СД), что делает его перспективным для дальнейшего изучения.

2. Соединение С-60 проявляет дополнительные плейотропные эффекты, включающие церебропротективное и эндотелиопротективное действие, обладает низкой токсичностью и потенциально высокой лекарственной безопасностью. Не вызывает изменений функционального состояния нервной системы и поведенческих реакций, что указывает на перспективность его дальнейшего изучения с целью возможного внедрения в клиническую практику в качестве антиагрегантного препарата, в том числе в условиях острого или хронического нарушения мозгового кровообращения.

#### Степень достоверности и апробации результатов

Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным количеством экспериментов *in vitro* и *in vivo*, выполненных на необходимом числе модельных организмов (крысах и мышах обоего пола) или образцах плазмы, а также применением адекватных методов статистической обработки получаемых данных. При выполнении работы применяли современные методы, оборудование; обязательным было применение СОПов (Стандартные операционные процедуры).

#### Публикации

Основные диссертационного публично результаты исследования представлялись на научно-практических конференциях: 73-,75-,78-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных студентов международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной клинической медицины» (Волгоград, 2015, 2017, 2021); XXIV Региональной конференции молодых ученых и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2019).

По материалам работы опубликовано 20 научных работ, 5 из которых размещены в изданиях перечня рецензируемых ВАК Министерства образования и науки РФ. Авторские права на соединение, разработанное в ходе выполнения диссертационного исследования защищены 2 патентами РФ.

#### Объем и структура диссертации

Текст диссертационной работы изложен на 141 странице машинописного текста, разделён на: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 4 главы собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, научно-практические рекомендации, список литературы (218 источников, из них 64 российских и 154 зарубежных), перечень условных сокращений, иллюстрации представлены 34 рисунками, результаты также отражены в 7 таблицах.

#### Личный вклад автора

Авотр лично выбирал направление исследований, планировал и проводил эксперименты, анализировал, интерпретировал и оформлял результаты, писал статьи и курировал их публикации в научных журналах. Автор исследования принимал ключевое участие в реализации всех этапов – от постановки задач и разработки протоколов исследования, выполнения экспериментальных работ, анализа и интерпретации полученных данных, до их представления в виде научных отчетов, публичных выступлений с докладами и публикаций в рецензируемых изданиях.

## ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПОИСКА НОВЫХ АНТИАГРЕГАНТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Представления о патогенетических механизмах тромбообразования в современной медицине

Постоянный рост числа заболеваний, связанных с тромбозом, в общей структуре причин смерти и инвалидности населения развитых стран диктует необходимость их углубленного изучения и совершенствования методов коррекции (Корокин М.В. и др., 2019). Активация тромбоцитов происходит после повреждения участка сосуда (без эпителия) и их адгезии к нему, далее происходит агрегация и формируется первичный тромбоцитарно-фибриновый сгусток, которые легко разносятся током крови и могут стать вызывать обструкцию на уровне микроциркуляции (Бубнова М.Г. и др., 2010; Марковчин А.А., 2014). Тромбоз вызывается образованием сгустка крови в кровеносных сосудах, венозных или артериальных (частичная или полная закупорка), ограничивающих кровоток и приводящих к клиническим последствиям (Чарная М.А., Морозов Ю.А., 2009). Острый артериальный тромбоз – основная причина большинства случаев инфаркта миокарда и около 80% инсультов, что в совокупности является наиболее распространенной причиной смерти в современном мире. Венозная тромбоэмболия – третья по значимости причина смерти от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Патогенные изменения, которые происходят в стенке кровеносного сосуда и в самой крови, приводящие к тромбозу, полностью не изучены. Понимание этих процессов имеет решающее значение для разработки современных безопасных и эффективных антитромботических препаратов (Чарная М.А., Морозов Ю.А., 2009; Малинова Л.И. и др., 2017; Сонькин И.Н. и др., 2018). Тромбы могут возникать в любой системе органов, и их клиническая картина может варьировать в зависимости от сопутствующих заболеваний и наличия (или отсутствия) провоцирующих факторов. Использование продолжительность антикоагулянтной или антиагрегантной терапии зависят от тщательной оценки факторов, провоцирующих тромбообразование и агрегацию

тромбоцитов. Понимание основной патофизиологии тромбоза и провоцирующих факторов риска помогает клиницистам в диагностике и лечении этого состояния (Ashorobi D. et al., 2021; Ashorobi D., Ameer M.A., Fernandez R., 2022).

возникновения тромбоза является Причиной нарушение баланса эндогенной антикоагуляции и гемостаза через сложный патофизиологический механизм. К тромбозу предрасполагают три исторически распространённых фактора: 1) повреждение эндотелиальной выстилки стенки сосуда; 2) состояние гиперкоагуляции и 3) застой артериальной или венозной крови. Повреждение эндотелиальной стенки может быть вызвано различными факторами, которые включают в себя механическое разрушение сосуда (катетер, травма или хирургическое вмешательство) или различные нарушения гомеостаза при возникновении острых и хронических заболеваний (ишемия, атеросклероз, сахарный диабет) (Previtali E. et al., 2011; Куркин, Д.В. и др., 2016; Seretis, С. et al., 2015: Marcinczyk N. et al.. 2021). Гиперкоагуляция является гематологической концепцией, которая просто означает повышенный риск тромбоза (т.е. тромбогенный) через увеличение уровня протромботических компонентов в крови. Она обусловленна нарушениями механизмов свертывания и поддержания гемостаза, возникающими при воспалении, изменением реологии, секрецией протромботических и/или недостатком антикоагулянтных факторов. Подобные состояния могут носить приобретенный или наследственный харрактер (Dautaj A. et al., 2019). Последние встречаются довольно редко и представлены дефицитом антитромбина III, дефицитом белка С и S, фактором V Лейден (вызывает резистентность к активированному белку С) или мутациями гена протромбина (среди многих других). Приобретенная форма распространена чаще, развивается вследствие приема лекарств (оральных контрацептивов, эстрогенов или других гормональных препаратов), при беременности, хирургических хронических вмешательствах, травмах, инфекциях или воспалительных заболевания. (ожирение, ревматологические язвенный состояниях курение). Приобретенный антифосфолипидный синдром и гепаринобусловленная

тромбоцитопения (HITT) характеризуются гиперкоагуляцией и могут вызвать венозный или артериальный тромбоз. Злокачественные опухоли также являются хорошо известным фактором риска гиперкоагуляции, поскольку опухолевые клетки могут экспрессировать различные прокоагулянтные белки, включая повышенный экспрессионный тканевый фактор (Previtali E. et al., 2011; Maezono-Kandori K. et al., 2021).

Артериальный или венозный застой крови возникает при длительной иммобилизации, беременности или снижении кровотока (остаточный тромб, ремоделирование или фиброз сосудов, атеросклероз) (Чарная М.А., Морозов Ю.А., 2009; Лобастов К.В., Дементьева Г.И., Лаберко Л.А., 2019).

Таким образом, оценивая любой тромбоз, нужно определить повреждение эндотелиальной выстилки сосуда, состояние гиперкоагуляции и застой артериальной или венозной крови, а также внимательно рассмотреть различные провоцирующие факторы риска, которые могут предрасполагать к тромбозу. Как правило, венозный тромбоз инициируется эндотелиальным повреждением, а артериальный тромбоз связан с течением атеросклеротического процесса. Тем не менее, некоторые исследования доказали, что существует связь между этими двумя типами тромбозов. Имеются данные о том, что эти два типа тромбоза запускаются одними и теми же биологическими стимулами, которые активируют процессы коагуляции и/или воспаления (Prandoni P., 2009).

Оба вида тромбозов имеют сходные факторы риска, включая возраст, ожирение, курение, хроническое воспаление, метаболический синдром, а также другие, описанные ранее. При выявлении подтвержденного тромбоза врач должен тщательно оценить, могли ли какие-либо провоцирующие факторы предрасполагать к развитию тромба.

Ключевую роль в процессе тромбообразования играет эндотелий. Незначительное воспаление, эндотелиальная дисфункция и гиперреактивность тромбоцитов независимо друг от друга повышают риск ССЗ. Антиагрегантная терапия у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), помимо основной

цели снижения тромботических событий вследствие ингибирования тромбоцитов, также имеет важную задачу восстанавливать нормальное взаимодействие тромбоцитов и эндотелия, уменьшая воспаление и улучшая функцию эндотелия, а также замедляя течение атеросклероза (Marcinczyk N. et al., 2017).

Эндотелий рассматривается в качестве органа, нормальное функционирование которого имеет определяющее значение для поддержания здоровья сосудов, а его дисфункция выполняет важную роль в возникновении, прогрессировании и клинических осложнениях сосудистых заболеваний.

ЭК (эндотелиальные клетки) играют важную роль в регуляции тонуса сосудов, процессов тромбообразования и тромболизиса, обеспечивая кровоток адекватный физиологическим потребностям. В то же время эндотелий имеет первостепенное значение в гомеостазе организма, поскольку он регулирует перенос различных веществ по кровеносным сосудам и через гистогематические барьеры (Galley H.F., Webster N.R., 2004; Rodríguez-Mañas L. et al., 2009).

В физиологических условиях тромбоциты свободно циркулируют процессов адгезии к ЭК не наблюдается. Между ЭК и кровью присутствует слой протеогликанов и гликопротеинов, известный как гликокаликс (Alphonsus C.S., Rodseth R.N., 2014). Эта структура регулирует проницаемость и взаимодействие эндотелиоцитов с другими клетками, такими как тромбоциты и лейкоциты, с которыми отсутствует механическое взаимодействие, ввиду наличия одинакового отрицательного заряда на наружной мембране, что ограничивает воздействие на эндотелий молекул адгезии. Кроме того, простациклин, продукт метаболизма арахидоновой кислоты в эндотелиальных клетках с сосудорасширяющими свойствами, агрегацию тромбоцитов подавляет за счёт повышения внутриклеточных уровней цАМФ (Jin R.C., Voetsch B., Loscalzo J., 2005; Moncada S., 2006). Это вещество обладает синергетическим действием с оксидом азота (NO). NO является ключевым релаксирующим фактором эндотелиального происхождения и подавляет активацию тромбоцитов за счёт увеличения производства циклического ГМФ. В результате концентрация внутриклеточного

 $Ca^{2+}$  снижается, и трансформация рецептора тромбоцитов  $\Gamma\Pi$  (гликопротеин) IIb/IIIа вместе со связыванием интегрина с фибриногеном подавляется (Jin R.C., Voetsch B., Loscalzo J., 2005; Moncada S., 2006). При помещении экто-АДФазы на поверхность эндотелиальных клеток происходит гидролиз АТФ, АДФ для выработки АМФ, и снижается активность тромбоцитов (Рисунок 1) (Jin R.C., Voetsch B., Loscalzo J., 2005). Эндотелий также вырабатывает вещества с сосудосуживающим и протромботическим поведением, такие как тромбоксан А2 агрегации (FitzGerald G.A., 1991), который способствует тромбоцитов, экспрессирует адгезивные кофакторы для тромбоцитов, такие как фактор фон Виллебранда, фибронектин и тромбоспондин, и прокоагулянтные факторы, такие как фактор V. Вазоконстрикторы эндотелиального происхождения противостоят действию эндогенных вазодилататоров (Alexander R.W., Griendling K.K., 1996). Наиболее важными среди них являются эндотелин-1, ангиотензин-ІІ и сосудосуживающие простагландины (Rosen B., Barg J., Zimlichman R., 1999). Эндотелиальная дисфункция – это нарушение нормальной функции эндотелия в результате различных раздражителей или клинических состояний. Нарушение этого баланса может привести к агрегации тромбоцитов и их адгезии к эндотелию, тем самым активируя его и способствуя адгезии лейкоцитов, а также высвобождению тромбоцитарных факторов роста, которые стимулируют гиперплазию интимы.

Ряд патологических процессов, таких как гипертония, сахарный диабет, курение и дислипидемия, может привести к эндотелиальной дисфункции и запуску атеросклеротического процесса. Окислительный стресс и, в частности, накопление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) приводят к снижению уровня NO и запуску воспалительного процесса (Lusis A.J., 2000; Willerson J.T., Kereiakes D.J., 2003). В то же время окисленные ЛПНП усиливают экспрессию эндотелеина-1 в ЭК, вызывая сужение сосудов и пролиферацию фибробластов и гладкомышечных клетках сосудов. Кроме того, окисленный ЛПНП увеличивает производство и секрецию фибронектина, тромбоспондина и ряда других

гликопротеинов, усиливая адгезию лейкоцитов и тромбоцитов (Рисунок 2) (Badrnya S., 2012).

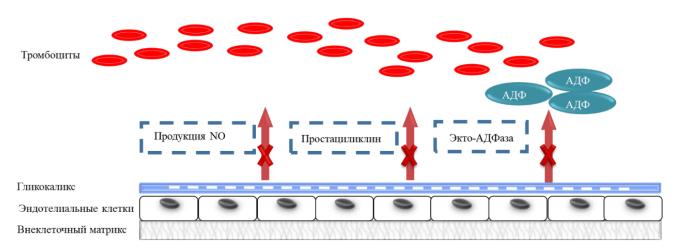


Рисунок 1. Механизм, предотвращающий активацию тромбоцитов и адгезию к эндотелию в нормальных условиях (Michalis H., Stylianos P., Fragiskos P., 2018)

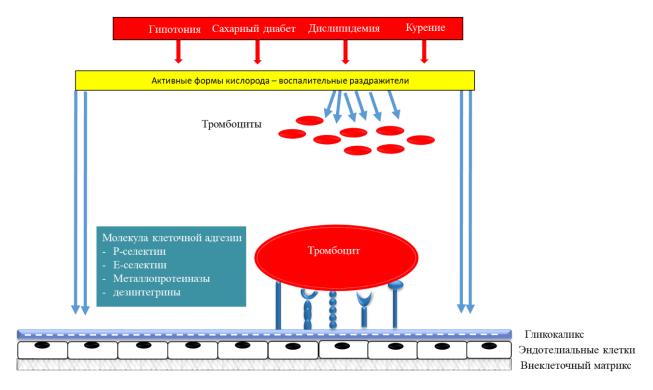


Рисунок 2. Патологические процессы, вызывающие активацию эндотелия и тромбоцитов (Michalis H., Stylianos P., Fragiskos P., 2018)

Первоначальный контакт между тромбоцитами и эндотелиальными клетками опосредуется Е- и Р-селектином, которые экспрессируются на поверхности ЭК во время воспалительных процессов (Frenette P.S., 1998). Присутствие интегринов, которые являются трансмембранными рецепторами, опосредующими адгезию клеток на поверхности тромбоцитов, дополнительно усиливает это связывание, что приводит к более стабильной адгезии между тромбоцитами и ЭК. Кроме того, присутствующие на ЭК интегрины, такие как дезинтегрин и металлопротеиназы, а также трансмембранный белок клеточной поверхности, связываются с тромбоцитами через рецептор ГП способствуя их активации (Langer H., 2005). Тромбоциты после активации начинают высвобождать множество медиаторов воспаления и факторов роста, таких как хемокины, белки адгезии и факторы свертывания крови, а также другие вещества, которые дополнительно активируют ЭК, и подавляют моноциты, макрофаги (Weber C., 2005). Семейство хемокинов включает фактор тромбоцитов, который способствует привлечению моноцитов и их дифференцировке в макрофаги (Scheuerer B., 2000), а также ингибированию деградации ЛПНП (Nassar Т., 2003). К примеру, CCL5 (RANTES) относится к главным агентам рекрутирования лейкоцитов в очаге воспаления, хемотактичен для Т-клеток, эозинофилов и базофилов, а также для моноцитов, естественных киллеров (NK), дендритных клеток и мастоцитов (Hundelshausen P., 2005). Совместно с цитокинами (IL-2) CCL5 индуцирует пролиферацию и активацию определенных NK-клеток с образованием клеток CHAK (СС-хемокин-активированные киллеры), является хемоаттрактантным белком моноцитов (Lu B., 1988; Hawrylowicz C.M., Howells G.L., Feldmann M., 1991), который также индуцирует экспрессию матриксных металлопротеиназ и подавляет продукцию NO (Heeschen C. et al., 2003). В исследовании 2021 года было установлено, что АСК уменьшает высвобождение CCL5 (Michalis H., Stylianos P., Fragiskos P., 2018; Michalis H. et al., 2021).

Активированные тромбоциты также высвобождают различные вещества (цитокины, хемокины, лиганды суперсемейства TNF (Фактор некроза опухоли), металлопротеиназы и другие медиаторы), что приводит к рекрутированию и активации лейкоцитов/моноцитов, деградации белков внеклеточного матрикса и дальнейшей активации эндотелия. Антитромбоцитарные препараты ослабляют активацию тромбоцитов. Кроме того, тикагрелор, по-видимому, обладает дополнительными преимуществами, повышая уровень аденозина в плазме и количество циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников (ЭПК). ГП и ЛПНП также высвобождаются молекулы адгезии ЭК, тромбоцитов, Рселектин, фибронектин, vWF, витронектин и фибриноген, факторы свертывания крови, включая плазминоген. Другими медиаторами, участвующими в активации, являются серотонин, гистамин и тромбоцитарный фактор роста. Тромбоциты также экспрессируют хемокиновые рецепторы (Boehlen F., Clemetson K.J., 2001; Калинская А.И. и др., 2018), в ответ на воспалительные сигналы от ЭК и лейкоцитов, которые дополнительно их стимулируют.

Совокупным результатом действия обозначенных выше веществ является свойств ЭК. лейкоцитов/моноцитов модуляция биологических самих тромбоцитов с точки зрения хемотаксиса, дифференцировки, клеточной адгезии, пролиферации агрегации. Таким образом, тромбоциты способствуют И самоподдерживающемуся воспалению образованию атеросклеротической И бляшки (Рисунок 3).

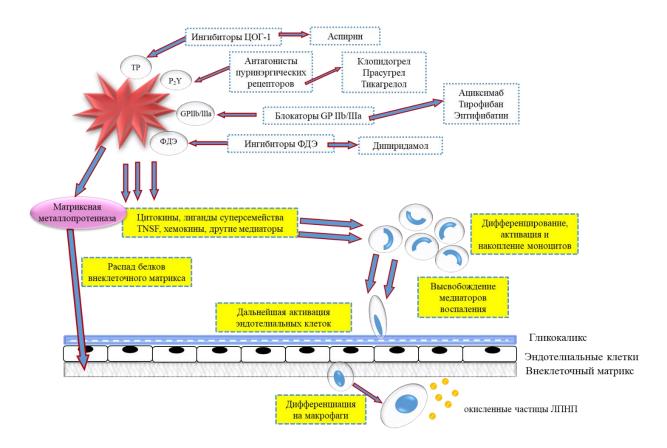


Рисунок 3. Процесс активации тромбоцитов и эндотелия, антиагрегантные препараты (Michalis H., Stylianos P., Fragiskos P., 2018)

#### 1.2. Современные антиагрегантные лекарственные средства

Антитромбоцитарная терапия (в том числе комбинированная) с целью уменьшения сердечно-сосудистого риска назначается все большему числу пациентов различными диагнозами, поскольку доказана тромбоцитов в нарушении микроциркуляции различных сосудистых регионов (Kolandaivelu K.. **Bhatt** D.L., 2011). Решение вопроса персонализированного выбора антиагрегантов в настоящее время остаётся актуальным. Данные метаанализов и клинических исследований часто носят противоречивый характер, их результаты не всегда однозначны. Зачастую необоснованные опасения риска кровотечений приводят к тому, что врачи не абсолютно необходимо. антиагреганты даже тогда, когда это назначают Соблюдение баланса между риском развития атеротромбозов и кровотечений

актуально при любой длительной терапии препаратами данного класса (Напалков Д.А., 2015).

Ишемические цереброваскулярные события представляют собой серьезную проблему общественного здравоохранения из-за высокой частоты встречаемости, инвалидности. Неинвазивные (или смертности миниинвазивные) диагностические тесты, например КТ, ЯМР, ангио-КТ, ангио-ЯМР улучшают диагностику возникновения ишемии. Они являются обязательными при принятии решения о лечении пациентов антитромботическими препаратами. Тем не менее, профилактика по-прежнему играет ключевую роль, поскольку она направлена на снижение последствий инсульта как медицинской, так и социальной проблемы (первичная профилактика). С другой стороны, рецидив инсульта у пациентов, перенесших ОНМК (острое нарушение мозгового кровообращения), является более тяжелой патологией. Некоторые антитромбоцитарные эффективны для первичной или вторичной профилактики инсульта, как указано в обновлённых рекомендациях по профилактике и лечению инсульта. Хотя многочисленные исследования показали, что антитромбоцитарные препараты эффективны для предотвращения инсульта, кровотечение (мозговое, желудочное, кишечное, почечное и мочевыводящее), связанное с их применением, остается важным побочным эффектом (Родионова О.В. и др., 2017; Signorelli S.S., 2020).

В течение долгого времени разрабатывались многочисленные антиагреганты с множеством показаний. Антитромбоцитарные препараты делятся на пероральные и парентеральные. Аспирин был первым антиагрегантным препаратом и ингибитором циклооксигеназы. В настоящее время в качестве антиагрегантов широко применяют: блокаторы АДФ-рецепторов (клопидогрел, тикагрелор и прасугрел); ингибиторы ФДЭ (фосфодиэстераза) тромбоцитов (цилостазол и дипиридамол). Ингибиторы гликопротеина ПЬ/Па, такие как тирофибан, эптифибатид, доступны только в качестве парентеральных средств и используются в острых фазах коронарного синдрома (Лагута П.С., 2017; Константинова, Е.В., 2018; Iqbal А.М. et al., 2022). Антиагреганты можно

классифицировать следующим образом (Косарев В.В., Бабанов С.А., 2013) (Таблица 1).

Таблица 1. Современная классификация антиагрегантных препаратов

Классы антиагрегантов	Препараты	
Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты	<ul> <li>Неселективные ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ) – ацетилсалициловая кислота, ее кишечнорастворимая форма Тромбо АСС, индобуфен, трифлузал</li> <li>Блокаторы тромбоксана – пикотамид, ридогрел</li> </ul>	
Препараты, увеличивающие содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в тромбоцитах	<ul> <li>Ингибиторы фосфодиэстеразы (ФДЭ) тромбоцитов – дипиридамол, трифлузал</li> <li>Стимуляторы аденилатциклазы – илопрост</li> </ul>	
Блокаторы аденозиндифосфат (АДФ)-рецепторов	• Тиенопиридины – тиклопидин, клопидогрел	
Антагонисты IIb/IIIа гликопротеиновых рецепторов	• Абциксимаб, эптифибатид, тирофибан, ламифибан, фрамон	

Аспирин, известный как ацетилсалициловая кислота (АСК), является одним из наиболее широко используемых лекарств: ежегодно потребляется около 40 000 тонн (от 50 до 120 миллиардов таблеток) и внесен в список основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

Инактивация циклооксигеназы тромбоцитов (ЦОГ-1) низкими дозами аспирина приводит к длительному подавлению продукции тромбоксана A2 и активации, и агрегации тромбоцитов, опосредованных ТХА2 (Born G., Patrono C., 2009).

Этот эффект необходим и достаточен для объяснения уникальной (среди других ингибиторов ЦОГ-1) эффективности аспирина в предотвращении атеротромбоза, а также общей (с другими антиагрегантами) способности вызывать кровотечение (Wood A.J., Patrono C., 1994). Аспирин является краеугольным камнем в профилактике вторичных осложнений ССЗ, поскольку он снижает риск повторных сосудистых катастроф примерно на 18% (Fowkes G. et al., 2010). Применение антиагрегантов показало высокую эффективность как при профилактике инсульта, так и при острой или хронической стадиях, что подтверждается результатами проведённых клинических испытаний и

последующих систематических обзорах в общепринятых руководствах (Gouya G. et al., 2014). Аспирин является наиболее широко назначаемым антиагрегантом в качестве основного средства для вторичной профилактики инсульта (Jauch E.C. et al., 2013). Однако клинические испытания показали противоречивые результаты относительно эффективности АСК для первичной профилактики ИИ.

Эффективность и безопасность АСК в первичной профилактике ССЗ широко изучались в течение последних трех десятилетий. Например, главной задачей в исследовании «Здоровье врачей» было определить, снижает ли АСК (325 мг через день) смертность от ССЗ (Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group, 1989). Это исследование не обнаружило различий между АСК и группой плацебо в отношении частоты инсульта, а также повышала риск геморрагии. Конечными точками исследования проекта первичной профилактики были инсульт (нефатальный) и транзиторная ишемическая атака. Первичная профилактика была запланирована как контролируемое централизованное рандомизированное открытое клиническое исследование для тестирования АСК (100 мг в день) по сравнению с витамином Е (300 мг в день) для снижения частоты серьезных смертельных и нефатальных сердечно-сосудистых событий без каких-либо клинически значимых последствий. АСК снижает тяжесть транзиторной ишемической атаки или инсульта (Roncaglioni M.C., De Gaetano G., 2001).

Изучение оптимальной фармакотерапии гипертонии проводили в рандомизированном контролируемом исследовании, в которое были включены пациенты, получавшие АСК или плацебо (Ridker P.M. et al., 2005). Применение АСК не влияло на частоту возникновения инсульта, но снижало количество основных сердечно-сосудистых событий. Результаты исследования не подтвердили различий влияния на частоту смертельных случаев от ССЗ в когортах, получавших АСК или витамин Е.

Исследование женского здоровья (Patrono C., Baigent C., 2019), факторное испытание два на два, оценивающее риски и преимущества низких доз АСК (100

мг в день) по сравнению с витамином Е (600 мг), было нацелено на оценку эффективности первичной профилактики инсульта. Исследование показало снижение риска инсульта на 17% в группе АСК по сравнению с группой витамина Е. ИИснизился до 24% в группе АСК. В соответствии с этими данными, следует отметить, что долгосрочное наблюдение предоставило доказательства того, что прием 100 мг аспирина через день может снизить риск ишемических сосудистых событий головного мозга, но не влияет на функциональные исходы инсульта (Rist P.M., 2013).

Исследование эффективности первичной профилактики осложнений атеросклероза аспирином, проведенное в Японии, было направлено на оценку влияния низких доз АСК (100 мг один раз в день) у пациентов с диабетом 2 типа. Первичная профилактика инсульта и/или ТИА была указана в качестве одной из конечных точек. В исследовании приняли участие 2539 пациента из Японии с СД2 старше 60 лет, без атеросклеротического заболевания в анамнезе. Пациенты с СД2 были рандомизированы для получения АСК (80 мг или 100 мг) или плацебо. Частота любого инсульта или ТИА была ниже в группе АСК, особенно у лет (комбинированная конечная точка фатальных старше 65 коронарных событий и фатальных цереброваскулярных событий произошла у 1 пациента (инсульт) в группе аспирина и у 10 пациентов (5 фатальных инфарктов миокарда и 5 фатальных инсультов) в группе без аспирина (ОР, 0,10; 95% ДИ, (0,01). (0,01). (0,01). При оценке результатов исследования был сделан вывод, что применение низких доз аспирина пациентами с диабетом 2 типа с целью первичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений не эффективно (Ogawa H. et al., 2008).

Японский проект по первичной профилактике — это многоцентровое открытое рандомизированное исследование в параллельных группах с периодом наблюдения <6,5 лет (Ikeda Y. et al., 2014). После 5-летнего наблюдения было выявлено, что АСК значительно снизила частоту транзиторных ишемических атак (Uchiyama S. et al., 2016).

В трёх крупных исследованиях применения аспирина с целью снижения риска сердечно-сосудистых событий при диабете у пациентов с умеренным риском CC3 проводили метаанализ данных отдельных участников рандомизированных исследований – были сосредоточены на АСК в первичной профилактике наиболее серьезных сосудистых событиях. Исследования включали первичную профилактику инсульта как одну из конечных точек (Bowman L. et al., 2018). Период наблюдения составил 7,4 года, на протяжении которого пациентам с СД2 случайным образом давали 100 мг/день АСК или плацебо. Исследование показало снижение частоты новых сосудистых событий, включая инсульт, на 12% в группе АСК. В исследовании эффективности применения аспирина с целью снижения частоты возникновения первичных сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с умеренным риском ССЗ (Gaziano J. et al., 2018) сравнивали 100 мг АСК в день с плацебо. В исследование были также включены люди из группы высокого риска, но исключены пациенты с СД2. Инсульт и/или ТИА обозначены, как конечные точки и частота их достижения существенно не различалась между исследуемыми группами. Данные получены двумя ИЗ метаанализа рандомизированных исследований, проводившихся в течение 5 лет среди участников в возрасте старше 70 лет, которые получали первичную и вторичную J.J. al.. профилактику ССЗ аспирином (McNeil et 2013). Участников рандомизировали для получения 100 мг АСК с энтеросолюбильным покрытием или плацебо. По результатам данного исследования различий между АСК и плацебо обнаружено не было.

В метаанализе сотрудничества «Рабочая группа исследователей антитромбоцитарных препаратов» (Baigent C. et al., 2009) по профилактике инсульта были проанализированы результаты шести исследований первичной профилактики. Всего было рассмотрено 95 000 человек с низким риском. Результаты показали в общей сложности 3 554 серьезных сосудистых события. По результатам метаанализа исследователи пришли к выводу, что чистый эффект АСК не был значимым для профилактики ишемического или геморрагического

инсульта. В обзоре (Capodanno D. et al., 2019) обсуждали эффективность применения АСК для профилактики ССЗ. Авторы пришли к выводу, что АСК не влияет на смертность от ССЗ и оказывает умеренное влияние на частоту или тяжесть возникновения инсульта. Авторы подтвердили (Capodanno D. et al., 2019), что АСК нельзя регулярно предлагать пациентам без ССЗ. Этот вывод является важным для клинической практики.

Bo многих клинических исследованиях проводили оценку риска кровотечения при приеме АСК, которые показали его увеличение по сравнению с плацебо. В исследовании «Проект первичной профилактики» было выявлено четыре случая смерти, из-за кровотечения, три из четырех были в контрольной группе, но только один случай произошел в группе АСК. В исследовании «Оптимальное лечение гипертонии» смертельные кровотечения (в том числе церебральные) произошли как в группе АСК, так и в группе плацебо; однако несмертельные, но обильные кровотечения чаще всего возникали у пациентов, получавших АСК. Кроме того, у пациентов, получавших АСК, незначительные кровотечения возникали в 1,8 раза чаще. В исследовании женского здоровья (Ogawa H. et al., 2008) сообщения о желудочно-кишечных кровотечениях и язвенной болезни были подтверждены с помощью последующих опросов. Побочные эффекты были более распространены среди женщин из группы АСК, чем у женщин из группы плацебо.

Принимая во внимание большое количество доказательств, текущие рекомендации по использованию АСК для первичной профилактики ССЗ остаются противоречивыми. В исследовании, проведенном Ріероlі М.Г. с соавторами не рекомендуется применять АСК для первичной профилактики у пациентов без ССЗ из-за риска кровотечения (Piepoli M.F. et al., 2016). Напротив, согласно рекомендациям авторов (Bibbins-Domingo K., 2016) «Рабочей группы по профилактическим услугам США» предлагают использовать низкие дозы АСК для первичной профилактики ССЗ у людей в возрасте от 50 до 59 лет, у которых 10-летний риск ССЗ ≥10%, но без повышенного риска кровотечения.

Хотя люди с диабетом представляют собой отдельную популяцию с двукратным повышенным риском сердечно-сосудистых событий, утверждения из двух рекомендаций кажутся противоречивыми. Рекомендации Европейского общества кардиологов сообщают, что у пациентов с диабетом из группы высокого риска аспирин (75–100 мг/день) может рассматриваться в качестве первичной профилактики при отсутствии явных противопоказаний. Напротив, его использование не рекомендуется пациентами с умеренным риском ССЗ (Bibbins-Domingo K., 2016), (Chamberlain J.J. et al., 2018).

Эффективность и безопасность применения АСК с целью вторичной профилактики инсульта исследовали в Голландии (Van Gijn J. et al., 1991), в которых препарат применяли в дозах 30-283 мг/сутки или 300-1200 мг/сутки. Результаты показали отсутствие позитивного эффекта от АСК. Данные шести метаанализов исследований не показали разницы в снижении частоты инсульта при использовании низкой (<100 мг/день), средней (300–325 мг/день) или высокой (> 900 мг/день) дозы. Однако, другой метаанализ шести исследований, посвященных применению низкой дозы аспирина для вторичной профилактики инсульта, показал снижение риска инсульта на 25% у пациентов с предыдущими сердечно-сосудистыми событиями, включая ишемический инсульт. В данном метаанализе показано, что у этих пациентов было несколько тяжелых кровотечений (Berger J.S. et al., 2008). Американская кардиологическая ассоциация и Американская ассоциация инсультов рекомендовали АСК (75-325 мг в день) для предупреждения новых инсультов у пациентов, перенесших острое цереброваскулярное событие (Kernan W.N. et al., 2014).

При старении в ЦНС наблюдаются признаки системного хронического воспаления, которое участвует в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний. Ацетилсалициловая кислота, являясь неселективным ингибитором ЦОГ, в сочетании с аскорбиновой кислотой защищает ткани головного мозга. В исследовании (Yusuf K. et al., 2014) было изучено влияние субхронического приема аспирина и аскорбиновой кислоты на пространственное обучение и

окислительный стресс у крыс-самцов (16–18 месяцев), которых делили на 4 группы и в течение 10 недель вводили: плацебо, АСК, аскорбиновую кислоту или АСК + аскорбиновая кислота. Результаты проведенного эксперимента (Yusuf K. et al., 2014) показали, что введение ацетилсалициловой кислоты улучшает способность к формированию пространственной памяти. Кроме того, введение комбинации АСК и аскорбиновой кислоты способствовало значительному снижению содержания продуктов окисления. Полученные результаты позволили установить, что по сравнению с другими доступными в настоящее время нестероидными противовоспалительными средствами, АСК оказывает сильное действие на ЦОГ-2 с дополнительными преимуществами антиоксидантного действия против гидроксильных радикалов. Антиагрегантное действие на сосуды головного мозга (усиление кровотока, уменьшение ишемических атак и др.) нейропротекторным эффектом ACK. считается еще одним Противовоспалительное и антиоксидантное действие аспирина, в котором аскорбиновая кислота обеспечивает дополнительный антиоксидантный эффект, может снизить и замедлить негативные эффекты процесса старения у пожилых людей.

Салициловая кислота и ее производное, ацетилсалициловая кислота, используются анальгетиков, В качестве хишонажиноподаж противоревматических средств. Кроме того, ацетилсалициловая кислота широко ингибирующего используется качестве препарата, тромбоциты, необратимого характера ее ингибирующего действия на циклооксигеназу тромбоцитов. В дополнение к этим хорошо известным эффектам салицилаты оказывают антиоксидантное действие в очень высоких концентрациях, что способствует их противовоспалительному действию. Ацетилсалициловая кислота увеличивает высвобождение белка ферритина, поглотителя свободного железа, что способствует защитному эффекту против опосредованного оксидантами повреждения клеток в средних концентрациях. Ацетилсалициловая и салициловая кислоты в очень высоких концентрациях ингибируют адгезию моноцитов к

эндотелиальным клеткам, что подтверждает гипотезу опосредованного антиоксидантного эффекта, а не только ингибирование циклооксигеназы. Действие салицилатов на адгезию моноцитов подражает антиоксидантным веществам, таким как витамины С и Е, N-ацетилцистеин и аллопуринол.

При сравнении было выявлено, что ибупрофен ингибирует активность циклооксигеназы в той же степени, что и салицилаты в пределах диапазона концентраций, но не оказывает ингибирующего действия на адгезию моноцитов. Так, высвобождение продуктов арахидоновой кислоты, образующихся в результате свободнорадикального перекисного окисления липидов, ингибировалось только салицилатами, а не ибупрофеном.

Позитивное действие АСК в профилактических мероприятиях ИБС имеет обширную доказательную базу и часто назначается в низких и/или очень низких дозах. Тем не менее, в последнее время накоплены данные нескольких исследований о том, что ацетилсалициловая кислота может оказывать эффекты дополнительные В средних И высоких концентрациях. Ацетилсалициловая кислота и ее метаболит, салициловая кислота, оказывают антиоксидантное действие на культивируемые эндотелиальные клетки. В подтверждении данного вывода было обнаружено, что оба соединения ингибируют активацию фактора транскрипции провоспалительных генов NF-кВ в высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты терапевтическими дозами двух препаратов. Окислительный стресс усиливает взаимодействие лейкоцитов эндотелиальных клеток за счет увеличения экспрессии провоспалительных генов, кодирующих молекулы адгезии эндотелиальных клеток и хемотаксических белков. Таким образом, АСК ингибирует активацию NF-kB, что объясняет молекулярную связь между её антирадикальным, контролирующим транскрипцию молекул адгезии и адгезию моноцитов действием.

Источниками свободных радикалов супероксида продуценты стенки сосудов, среди которых заметную роль отводят НАДФН-оксидазе,

ксантиноксидазе, циклооксигеназе и NO-синтазе. В исследовании было показано, что ацетилсалициловая кислота, но не салициловая кислота или ибупрофен, повышала уровень ферритина в клетках.

С клинической точки зрения ацетилсалициловая кислота может быть больше, чем просто ингибитором агрегации тромбоцитов. Так, у пациентов, получавших лечение ацетилсалициловой кислотой в дозе 900 мг в день, чаще наблюдалась регрессия и реже прогрессирование ранее существовавших каротидных бляшек, чем у пациентов, получавших лечение ацетилсалициловой кислотой в дозе 50 мг кислоты в день. В заключение ацетилсалициловая кислота вызывает антиоксидантные эффекты при приеме внутрь в высоких дозах, тогда как салициловая кислота индуцирует такие эффекты только сверхтерапевтических концентрациях, а ибупрофен вообще не оказывает антиоксидантного действия. Механизм этого антиадгезионного эффекта может заключаться в индукции синтеза ферритина, удалении супероксидных радикалов, NF-κB И активации снижении экспрессии чувствительных антиоксидантам молекул адгезии на поверхности эндотелия (Eisele G. et al., 2002).

Тиенопиридины, клопидогрел и прасугрел, являются пролекарствами и оказывают антиагреантное действие после метаболизма в печени и образования их активных метаболитов, которые необратимо связываются с P2Y12. Основные метаболиты препарата клопидогрел неактивные, 15% препарата подвергается активации ферментативным путем печеночного цитохрома P450. Активация требует двухэтапного процесса окислительного превращения, сначала в 2-оксоклопидогрел, а затем в активный тиоловый метаболит. Оба этапа включают несколько изоферментов цитохрома печени. Прасугрел, после поступления в кровь, вначале подвергается быстрой деэтерификации до промежуточного тиолактона, а затем превращается в активный метаболит в единственном процессе, зависимом от цитохрома. Клопидогрел и прасугрел являются необратимыми антагонистами рецептора P2Y12. Тикагрелор — обратимый неконкурентный антагонист рецептора P2Y12 прямого действия. Активные

метаболиты пролекарств тиенопиридина ковалентно связываются с рецептором P2Y12, что приводит к непрямому, но необратимому ингибированию тромбоцитов. Новейшие ингибиторы P2Y12 прямого действия (кангрелор, элиногрель) изменяют конформацию рецептора P2Y12 (Trenk D. et al., 2019).

Результаты многочисленных исследований подтверждают целесообразность клопидогрела вторичной профилактики использования ДЛЯ некардиоэмболического инсульта. Например, «Рандомизированное исследование клопидогрела по сравнению с аспирином у пациентов с риском событий (CAPRIE)» ишемических \_ ЭТО международное исследование, разработанное для сравнения роли клопидогрела (75 мг в день) и АСК (325 мг в день) в снижении риска комбинированного кластера исходов ИИ, инфаркта миокарда или смерти от иных сердечно-сосудистых событий; также оценивалась их относительная безопасность (CAPRIE Steering Committee, 1996). После анализа результатов исследований учёные сделали вывод, что длительное введение клопидогрела пациентам с атеросклеротическим заболеванием сосудов более эффективно, чем аспирина, в снижении комбинированного риска ИИ, инфаркта миокарда или смерти от иных сердечно-сосудистых событий. Общий профиль безопасности клопидогрела сопоставим с таковым у аспирина в средних дозах.

Эффекты клопидогрела в сочетании с АСК в отношении профилактики инсульта сравнивали с эффектами клопидогрела в отдельности в исследовании «Аспирин и клопидогрел в сравнении с одним клопидогрелом после недавнего ИИ или транзиторной ишемической атаки у пациентов из группы высокого риска (MATCH)» (Diener H.C. et al., 2004), в которое включали пациентов с ИИ и/или ТИА и дополнительным заболеванием «высокого риска» (перенесенный инфаркт миокарда, перенесенный инсульт, диабет, стенокардия, симптоматическая артерий). В протоколе исследования болезнь периферических случайным образом распределялись по группе клопидогрела (75 мг в день) и АСК (75 мг в день) или только клопидогрела (75 мг в день). В результате исследования было обнаружено, что добавление АСК к клопидогрелу у пациентов с высоким

риском и недавним ИИ или ТИА связано с незначительной разницей в снижении значимости основных сосудистых событий. Однако риск опасности для жизни или большого кровотечения при добавлении аспирина увеличивается.

В исследование «Режим профилактики для эффективного предотвращения второго (вторичного, повторного) инсульта» (PRoFESS) (Diener H.C. et al., 2008) включали пациентов перенёсших ИИ, которых случайным образом распределяли по факторному плану «два на два» для приема либо 25 мг АСК, либо 200 мг дипиридамола с пролонгированным высвобождением два раза в день или 75 мг клопидогрела один раз в день, либо телмисартан 80 мг, либо плацебо один раз в Предварительно определенными конечными день. точками исследования были инвалидность после повторного инсульта, оцениваемая с помощью модифицированной шкалы Рэнкина (mRS) и индекса Бартеля через 3 месяца, и состояние когнитивной функции, определяемой по краткой шкале психического статуса MMSE через 4 недели после рандомизации и при предпоследнем посещении. Результаты исследования показали, что инвалидность из-за повторного инсульта и снижение когнитивных функций у пациентов с ИИ не различались между двумя антиагрегантными схемами и не зависели от профилактического применения телмисартана.

Клопидогрел реже по сравнению с АСК вызывал желудочные или желудочно-кишечные кровотечения. Результаты исследования клопидогрела по сравнению с аспирином у пациентов с риском ишемических событий показали, что безопасность клопидогрела и АСК сопоставима при оценке таких параметров как: внутричерепное кровоизлияние (0,33% против 0,47%) и желудочно-кишечное кровотечение (0,52% против 0,72%), соответственно, для клопидогрела или АСК (CAPRIE Steering Committee, 1996).

Клопидогрел, в отличие от тиклопидина, не вызывал развитие тяжёлой нейтропении. Вариабельность фармакологического эффекта клопидогрела достаточно высока из-за зависимости его эффективности от состояния системы цитохрома, в том числе от генетической изменчивости активности изофермента

цитохорма P450. Более того, некоторые часто назначаемые одновременно препараты (статины, ингибиторы протонной помпы и блокаторы кальциевых каналов) могут влиять на метаболизм клопидогрела.

Дипиридамол является антиагрегантом, ингибирующим повторный захват аденозиндифосфата и фосфодиэстеразы тромбоцитов. Второе европейское исследование профилактики инсульта (ESPS2) было рандомизированным плацебо-контролируемым исследованием, в котором изучалась эффективность низких доз АСК и дипиридамола с модифицированным высвобождением, по отдельности или в комбинации, с целью вторичной профилактики ИИ. По результатам исследования установленно, что комбинирование было значительно эффективнее, чем раздельное применение препаратов. В исследовании Sivenius J. С соавт., оценивали зависимомсть эффективности АСК и дипиридамола от возраста пациентов, применяя их по отдельности или в комбинации, с целью вторичной профилактики ИИ. Результаты исследования Sacco R.L. с соавт., указывают, что комбинированная терапия дипиридамолом и АСК с целью вторичной профилактики ИИ превосходит любой препарат, используемый в отдельности. Также в результате этих исследований было установлено, что эффективность АСК не зависит от возраста пациентов.

Федеральное управление лекарственных средств США одобрило дипиридамол дополнительного профилактики качестве средства ДЛЯ тромбоэмболии У пациентов, перенёсших замену сердечного клапана. Дипиридамол также используется не по назначению для профилактики инсульта. Комбинация аспирина с дипиридамолом пролонгированного действия была разрешена для клинического использования, в том числе для профилактики инсульта, в качестве альтернативной терапии для пациентов с непереносимой головной болью. Европейское агентство по лекарственным средствам указало дипиридамол в качестве агента для коронарного диагностического теста, для визуализации перфузии миокарда, адаптированной для пациентов, неспособных подвергаться адекватной физической нагрузке, и для измерения фракционного

резерва кровотока стеноза одиночной коронарной артерии во время инвазивного вмешательства.

Цилостазол является ингибитором фосфодиэстеразы тип III (ФДЭ III). Ферменты ФДЭ III гидролизуют цГМФ и цАМФ. Ферменты ФДЭ III расположены в саркоплазматическом ретикулуме клеток сердца и миоцитах артерий и вен. Эти ферменты играют роль в регулировании сократимости гладких мышц сердца и сосудов. Цилостазол ингибирует активность фосфодиэстеразы и подавляет деградацию цАМФ. Ингибирование ФДЭ III обеспечивает высокую концентрацию цАМФ в тромбоцитах и в кровеносных сосудах. Концентрация цАМФ впоследствии приводит к увеличению концентрации активной формы протеинкиназы А (ПКА), напрямую связанной с ингибированием агрегации тромбоцитов. Высокий уровень протеинкиназы А инактивирует киназу миозина, оказывая сосудорасширяющее действие на гладкомышечные клетки (Катвауаshi J. et al., 2003).

заболеванием Цилостазол предлагается ДЛЯ лечения пациентов периферических артерий на основании доказанной клинической эффективности перемежающейся хромоте. Контролируемые при испытания показали эффективность цилостазола в предотвращении инфаркта мозга. В исследовании эффективности вторичной профилактики ИИ проведенного Gotoh F. C соавт., цилостазол сравнивали с плацебо у более, чем 1 000 пациентов в Японии. Было показано, что препарат снижает частоту рецидивов инсульта и риск его возникновения. Напротив, результаты китайского исследования «Цилостазол для профилактики вторичного инсульта (CSPS 2): контролируемое двойное слепое рандомизированное исследование не меньшей эффективности», показали, что цилостазол не уступает аспирину и может превосходить его по эффективности вторичной профилактики инсульта, при этом реже вызывая геморрагии. Следовательно, этот препарат можно использовать для профилактики инсульта у пациентов с некардиоэмболическим инсультом (Shinohara Y. et al., 2010).

В метаанализе, посвящённом сравнению цилостазола с АСК для вторичной профилактики ИИ был сделан вывод о том, что его применение снижает частоту инсульта с низким риском кровотечения, что подтверждает для данного лекарственного препарата более широкий терапевтический профиль, чем у АСК. Эти данные подтверждают безопасность и эффективность цилостазола для вторичной профилактики инсульта. Однако пока нет качественных данных относительно использования этого лекарственного средства для вторичной профилактики инсульта в неазиатских этнических группах. Кроме того, более низкая переносимость и более высокая стоимость цилостазола по сравнению с АСК могут ограничивать его широкое использование для профилактики инсульта.

По сравнению с АСК применение цилостазола вызывает 73% снижение частоты геморрагического инсульта и 48% снижение общих геморрагических событий, а также выявлена тенденция к уменьшению риска желудочно-кишечных кровотечений. Годовая частота развития геморрагических событий (внутримозговое, субарахноидальное или другое кровоизлияние, требующее госпитализации) на фоне применения цилостазола была ниже, чем при назначении АСК. Многие пациенты чаще прекращали приём цилостазола, чем АСК. Интересные данные о цилостазоле для вторичной профилактики по сравнению АСК были получены в результате проведения метаанализа основных исследований по этому препарату. Авторы оценивали церебральные кровотечения (внутричерепные, экстракраниальные кровоизлияния) и желудочно-кишечные Было обнаружено, кровотечения, как отдельные исходы. ЧТО экстракраниальные кровотечения были значительно выше в группе АСК по сравнению с группой цилостазола (Dinicolantonio J.J. et al., 2013).

Профилактика церебрального ишемического события (инсульт, ТИА) является краеугольным камнем клинической практики. Несмотря на результаты клинических исследований, рекомендаций, руководств, систематических обзоров, мнений экспертов и метаанализов, подбор оптимального медикаментозного

лечения для достижения цели по-прежнему остаётся важной задачей современной медицины и фармакологии.

Аспирин – самый изученный и наиболее часто применяемый препарат для профилактики ИИ, но Американский колледж кардиологии и Американская кардиологическая ассоциация не рекомендовали его применение, особенно у пожилых пациентов и у взрослых любого возраста с повышенным риском кровотечения. По материалам обзора недавних крупных исследований аспирина его не следует рекомендовать для применения пациентам без явных ССЗ.

Аспирин является наиболее назначаемым антиагрегантным препаратом, он показал абсолютное преимущество в предотвращении ИИ и продемонстрировал относительный защитный эффект у пожилых людей; наоборот, низкие дозы аспирина подавляют образование трамбоксана A2. В настоящее время нет чёткого консенсуса относительно аспирина как эффективного антиагрегантного препарата для первичной профилактики сосудистых заболеваний. Клопидогрел отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами считается эффективным для вторичной профилактики инсульта. Цилостазол можно считать препаратом выбора для предотвращения ИИ, но данные более убедительны в отношении его применения при заболеваниях периферических артерий. Дипиридамол в сочетании с аспирином рекомендуется для первичной профилактики ССЗ.

## 1.3. Модификации молекулы ацетилсалициловой кислоты и производных гидроксибензойных кислот в современной медицине

Несмотря на долгую историю использования в качестве лекарственного средства, АСК по-прежнему вызывает восхищение исследователей в области химии, биологии и медицины. В связи с этим разработка производных АСК с новыми, биологическими свойствами продолжает оставаться актуальной задачей химиков.

Металлоорганическая дериватизация АСК оказывает сильное влияние на его профиль действия и биологическую активность. В большинстве металлоорганических производных АСК первоначальная способность к

ацетилированию ЦОГ-1 и ЦОГ-2 сохраняется, но органы и ткани, в системе которых происходит ацетилирование, отличаются от тех, в которых этот процесс запускается оригинальной ACK. Это чередование является результатом комбинации электронных стерических эффектов, И создаваемых металлоорганическим объектом.

Металлический центр молекулы оказывает сильное влияние на её биологическую активность, например, через способность к образованию активных форм кислорода (АФК) в клетках, что не является характерным эффектом АСК и вносит вклад в фармакологические свойства. Эти новые свойства металлоорганических производных АСК включают противоопухолевую, противопаразитарную и антибактериальную активность.

Проведя анализ литературы металлоорганических производных ацетилсалициловой кислоты (со связью металл-углерод), известные соединения можно разделить на три класса.

Первый – объединяет соединения, в которых бензольное кольцо АСК полностью замещено металлоорганической группой, во втором металлоорганический фрагмент периферически присоединен ядру ацетилсалициловой кислоты с помощью подходящего мостика, а у третьего металлоорганический лиганд координирован с ядром АСК через один или два атома кислорода. Из трёх классов гексакарбонилдикобальталкиновое производное лидирующую позицию в качестве наиболее многообещающего противоракового активного агента; данное соединение является активным в отношении саркоматоидных раковых клеток.

Металлоорганическая функционализация аспирина может быть полезной для разработки новых антибактериальных и средств против лейшманиоза. Разработка противопаразитарных забытых новых средств лечения ДЛЯ тропических болезней настоящее время является актуальной металлоорганические производные аспирина могут играть важную роль в этой области. Люминесцентные производные органометаллического аспирина

представляют собой развивающуюся группу соединений с потенциальным применением в качестве тераностических агентов или люминесцентных зондов для визуализации (Kowalski K., 2019).

Металлорганический компонент привносит новый фармакологический эффект и изменяет первоначальную способность аспирина к ацетилированию и ЦОГ. ингибированию ферментов Несмотря многообещающую на противораковую металлоорганических производных ACK. активность необходимы исследования, чтобы сделать эти соединения более подходящими прототипами для потенциальных кандидатов в лекарственные средства и их последующей разработки В ДЛЯ клинического применения. последовательной модернизации молекул должно быть достигнуто оптимальное соотношение между желаемой противораковой активностью и нежелательной токсичностью по отношению к здоровым клеткам человека.

Исследователи разрабатывают новые производные аспирина, которые лучше растворяются в воде и оказывают более выраженные противораковые эффекты с минимальными побочными эффектами. Фосфо-аспирин является производным аспирина, модифицированным по его карбоксильной группе. По сравнению с аспирином, фосфо-аспирин в большей степени подавляет онкогенез и имеет лучшую безопасность на моделях животных таких как рак толстой кишки и поджелудочной железы, чем аспирин (Rainsford K.D. et al., 1996; Mattheolabakis G. et al., 2016). Для повышения эффективности и минимизации токсичности были разработаны пролекарства сложного эфира аспирина на основе фумарата (Kastrati I. et al., 2015). Одно из пролекарств аспирина на основе фумарата способно эффективно воздействовать на раковые стволовые клетки, одновременно блокируя пути ЦОГ, простагландина и ядерного фактора «каппа-би», может быть использовано в качестве химиопрофилактических или терапевтических агентов при лечении рака груди.

NO-высвобождающий аспирин является еще одним сложноэфирным производным аспирина (Pereira-Leite C. et al., 2017). При высвобождении из

пролекарства аспирина NO способен предотвращать повреждение слизистой оболочки желудка за счёт увеличения секреции слизи, улучшения микроциркуляции оболочки и снижения агрегации нейтрофилов в ней (Wallace J.L., Granger D.N. et al., 1996). Кроме того, высвобожденный NO оказывает дополнительное антиагрегантное действие (Cena C. et al., 2003). Таким образом, высвобождающий NO, может аспирин, иметь лучшую противораковую активность и меньшую желудочно-кишечную токсичность, чем у исходного соединения аспирина. К настоящему времени разработано много вариантов молекул АСК, высвобождающей NO (Nemmani K.V. et al., 2009).

Кроме NO, другим газопередатчиком является сероводород ( $H_2S$ ). NO и  $H_2S$ имеют много схожих функций, таких как защита от ишемического повреждения цитопротекция при окислительном стрессе миокарда, И ингибирование воспаления (Zheng Y. et al., 2018). Были разработаны H<sub>2</sub>S-высвобождающие производные аспирина, которые обычно синтезируются путём связывания аспирина с дитиолетионовой или тиобензамидной составляющей. Подобно NOаспирину, H<sub>2</sub>S-аспирин обладает противоопухолевым действием и защитным, против вызванного АСК повреждения желудка в доклинических моделях (Chattopadhyay M. et al., 2013). Кроме того, NOSH-аспирин, гибрид аспирина, который несет как NO-, так и H<sub>2</sub>S-высвобождающие части, эффективен в подавлении роста раковых клеток (Vannini F. et al., 2015). NOSH-аспирин в доклинических исследованиях был менее токсичен и лучше в качестве химиопрофилактического средства против рака, чем аспирин (Kodela R. et al., 2015).

Глюкоза-аспирин синтезируется путём конъюгирования ацетилсалициловой кислоты с глюкозой. Примечательно, что данное соединение в семь раз более растворимо в воде и примерно в восемь-девять раз более активно в подавлении роста раковых клеток, чем АСК (Jacob J.N., Tazawa M.J., 2012).

Аспирин-фосфатидилхолин – производное АСК, в состав которого входит соевый лецитин, обогащённый фосфатидилхолином. Связанный с

фосфатидилхолином аспирин оказывает более сильное ингибирующее действие на рост клеток рака яичников, чем аспирин, *in vitro* и *in vivo* (Zhu Y. et al., 2015). Кроме того, производные аспирина на основе ресвератрола высвобождают ресвератрол, чтобы облегчить побочные действие аспирина и усилить его эффекты, в том числе противоопухолевый (Huang Y. et al., 2016). В особенности аспириноподобная молекула о-(ацетоксифенил)гепт-2-инилсульфид ингибирует ЦОГ-2 гораздо более мощно и селективно, чем аспирин (Kalgutkar A.S. et al., 1998).

В дополнение к описанным выше производным аспирина альтернативной стратегией является включение в аспирин наночастицы (Hua H. et al., 2019). В 2020 году учёными из Университета имени Адама Мицкевича в Познани (Польша) получены люминесцентные наночастицы фторида лантанида ядрооболочка нанесённой на поверхность ацетилсалициловой кислотой. Спектроскопический анализ модифицированного продукта показал ковалентный или ионный характер связи между группами NH<sub>2</sub> и молекулами АСК, прикреплёнными к поверхности наночастицами. Основываясь на результатах гемосовместимости, анализов онжом сделать вывод, ЧТО исследованные наночастицы не вызывают изменения структуры мембран эритроцитов и не увеличивают её избирательную проницаемость, существенно влияют на скорость оседания эритроцитов. Полученные соединения можно безопасно использовать в потенциальных биомедицинских приложениях, следовательно, они, могут стать очень хорошими предшественниками для многофункциональных систем доставки лекарств или зондов для приложений биовизуализации (Быков В.В. 2020; Kwiatek D. et al., 2020).

Синтезированы галогенированновые аналоги азо-аспирина, которые проявляют антибактериальную активность в отношении кишечной палочки по сравнению с ампициллином (Ngaini Z., Mortadza N.A., 2019).

Производные ацетилсалициловой кислоты являются потенциальными противоинфекционными средствами. Бутирил-салициловая кислота, проявляет

значительно улучшенную противоинфекционную активность против Salmonella Typhimurium. Исследования структуры-активности показали, ЧТО функциональность сложного эфира бутирил-салициловой кислоты имеет решающее значение И связана c ацилированием ключевых факторов бактериальной вирулентности и метаболических ферментов, которые важны для Salmonella инфицированых клеток-хозяев роста бактерий. Помимо грамотрицательных бактериальных патогенов, бутирилсалициловая кислота также показала большую антибактериальную активность по сравнению с аспирином против Clostridioides difficile. Примечательно, что введение бутирилсалициловой кислоты снижало патогенное действие сальмонеллы in vivo (Yang X. et al., 2020; Ren F.C., 2021).

Оксибензойная кислота благодаря широкому спектру биологических эффектов является перспективной молекулой для структурной модификации с целью создания соединений, обладающих разнонаправленным действием в условиях цереброваскулярной патологии. Соединения, полученные на основе структурной модификации оксибензойной кислоты, сохраняют выраженное антиагрегантное, противовоспалительное, жаропонижающее, антиокисидантное, обезболивающее, эндотелио- и церебропротективное действие, а также приобретают некоторые положительные плейотропные эффекты, что имеет важное терапевтическое значение в лечении ССЗ (Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., 2021; Патент РФ № RU 2632005 С1).

В лаборатории кафедры химии ВолгГМУ были синтезированы новые соединения на основе оксибензойной кислоты, а на кафедре фармакологии и фармации ИНМФО совместно с сотрудниками лаборатории сердечно-сосудистых средств НЦИЛС проведены исследования их антиагрегантных свойств.

Несмотря на многолетнюю историю изучения и высокую эффективность АСК, химическая модификация молекулы может повысить её эффективность и добавить ей дополнительные свойства. Получение солевых форм повышает растворимость новых соединений, а добавление остатков нейроактивных

сообщить позволяет психоактивные эффекты усилить аминокислот церебропротективное действие. Согласно литературным данным, хлорамины аминокислот и таурина ковалентно модифицируют поверхностные белки тромбоцитов, проявляя антиагрегантные свойства (Ding Z. et al., 2003; Рощупкин Д.И. и др., 2007). Комбинированное применение АСК и производных таурина эффекты. Производные гидроксибензойной потенцирует ИΧ кислоты рассматривают в качестве биорегуляторов, которые могут синтезироваться клетками организма выполняя в них протекторную функцию. Таким образом применение АСК и её производных в современной медицине может быть шире.

В связи с этим, целенаправленный поиск новых высокоэффективных и безопасных веществ на основе гидроксибензойной кислоты является актуальной задачей фармакологии (Tshane L.S.L., 2021; Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., 2021; Патент РФ № RU 2632005 C1).

Проведённый анализ литературных данных отечественных и зарубежных учёных позволяет сделать вывод о том, что, несмотря на богатую историю изучения эффектов АСК, ученые всего мира продолжают исследовать данную молекулу, разрабатывать новые лекарственные формы, использовать различные комбинации с АСК, а также модифицировать её структуру, сообщая дополнительные свойства, снижая терапевтическую дозу и риски побочных эффектов.

#### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 2.1. Материалы исследования

В работе изучено 14 новых веществ, полученных дериватизацией молекул гидроксибензых кислот (различных по положению радикала в цикле) и объединённых лабораторным шифром «С-п». Из них 2 относятся к соединениям содержащих ГАМК, 4 — глицин, 2 — морфолин и 6 — таурин. Их химические формулы представлены ниже (Таблица 2).

Данные соединения были синтезированы под руководством заведующего кафедрой химии ВогГМУ д.х.н. проф. А.К. Бреля, к.х.н. Ю.Н. Будаевой<sup>1</sup>.

В качестве модельных организмов использовали крыс (Wistar) и беспородных мышей. Животных закупали в специализированных питомниках Московской («Столбовая») и Ленинградской областей («Рапполово»), а затем содержали в условиях стандартного вивария. Выполнение экспериментов регламентировалось методическим руководствам и нормативным документа: ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002, правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014, 2015), а также локальными СОПами и учитывая решение Совета ЕЭК №81 от 03.11.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»; Директива 2010/63/ЕU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22Sep2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Эвтаназию проводили по правилам «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). При необходимости пищевой депривации — она сотавляла 24 часа. Животным никогда не ограничивали свободный доступ к воде.

Таблица 2. Структурные формулы исследуемых соединений

No॒	шифр соединения	$R_1$	$R_2$			
	Производные гидроксибензойных кислот и ГАМК					
	$O \longrightarrow N \longrightarrow (CH_2)_3 \longrightarrow R2$					
	R <sub>1</sub>					
1						
2	C-50	4-Ac	OLi			
	Производн	ые гидроксибензойных ки	слот и глицин			
$\begin{array}{c c}  & O \\  & H \\  & C \\  & H_2  \end{array}$ R2						
3	C-9	2-ONa	ONa			
4	C-10	4-Ac	ONa			
5	C-24	2-OK	OK			
6	C-40	4-Ac	OK			
	Производны	е гидроксибензойных кис.	лот и морфолин			
	O N-N O					
7	C-14	4-OLi	-			
8	C-16	2-OK	-			
	Производн	ые гидроксибензойных ки	слот и таурин			
$ \begin{array}{c}                                     $						
9	C-56	2-OLi	OLi			
10	C-57	3-OLi	OLi			
11	C-58	4-OLi	OLi			
12	C-59	2-OK	OK			
13	C-60	3-OK	OK			
14	C-61	4-OK	OK			

Острую суточную токсичность веществ определяли по инструкциям Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Миронов А.Н. и др., 2012). Все протоколы исследований были

одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер: IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP), протокол № 001-2019 от 06.12.2019г., экспертное заключение №001/13.

В работе были использованы следующие реактивы: 0,9% раствор NaCl (Гематек, Россия); натриевая соль лимонной кислоты (ч.д.а., Реахим, Россия); АДФ (Sigma, США); хлоралгидрат (Органика, Россия); FeCl<sub>3</sub> (х.ч., «Мосреактив» Россия); С<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (ч.д.а., Реахим, Россия); альбумин сывороточный бычий (BSA) (Sigma, США); тромбин (Sigma, США); динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) («ICN», США); АСК («Sigma», США), ницерголин (АВВА РУС, Россия), набор реактивов для определения фибриногена по Клаусу; реактивы для определения тромбинового времени. Для экспериментального сахарного диабета моделирования использовали стрептозотоцин (Sigma-Aldrich, США) и никотинамид (SigmaAldrich, США), которые растворяли соответственно в цитратном буфере (1мМ, рН 4.5) и в растворе 0,9% NaCl. Исследуемые вещества растворяли в дистиллированной воде.

При выполнении исследований пользовались следующим оборудованием: аквадистиллятор ДЭ-4-2 (Россия, Саранск); лазерный агрегометр Biola 220 LA (Россия); центрифуга Multi Centrifuge Elmi CM 6МТ (Латвия); центрифуга CM-50 (Латвия); электронные весы Ohaus (США); портативный глюкометр Countur TS (Германия), ультразвуковой допплерограф (Санкт-Петербург); допплерограф (США), микроскоп Axiocamplus (Германия); цифровая камера Axiocam 105 color (Германия).

#### 2.2. Дизайн исследования

Дизайн исследования (Рисунок 4): вначале проведили скрининговое исследование *in vitro* 14 новых производных гидроксибензойных кислот. На следующем этапе в соответствие с уровнем антиагрегантной активности, было выявлено соединение лидер (С-60). Затем определяли его острую токсичность и терапевтический потенциал. После чего провели комплекс исследований по определению антитромбогенной активности.

Учитывая плейотропные свойства АСК, провели исследования влияния соединения С-60 на психоневрологическое состояние, мозговое кровообращени и эндотелиальную функцию животных с острой или хронической формой нарушения мозгового кровообращения.

Возможные механизмы антиагрегантного действия соединения С-60, а именно его влияние на основные показатели коагуляционного гемостаза, вазодилатирующую функция эндотелия и его простациклин-синтезирующую активность по реакции пиальных сосудов на индометацин изучались на завершающем этапе.

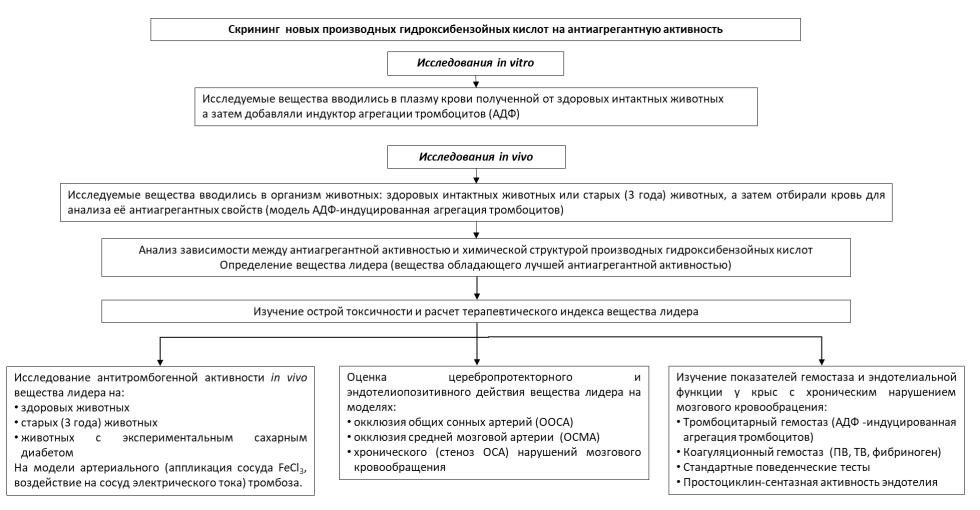


Рисунок 4. Дизайн исследования

#### 2.3. Метод АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов in vitro и in vivo

Влияние веществ на функциональную активность тромбоцитов, как в исследовании *in vitro*, так и в *in vivo* определяли на богатой тромбоцитами плазме по методике автора G.Born в модификации Габбасова В.А. (Габбасов В.А. и др., 1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «Биола» 220LA (Россия), данная методика подробно описана (Тянь М., 2014; Волотова Е.В., 2016). В исследовании *in vitro* кровь получали от интактных животных, а в *in vivo* у животных с различными патологиями или интактных, но которым за 1 час внутрижелудочно вводили исследуемые соединения.

Для исследований in vitro кровь забирали ИЗ брюшной артерии (наркотизация хлоралгидратом 400 мг/кг), а в *in vivo* из подъязычной вены (Heimann M. et al., 2009). Сбор крови проводили у животных, находящихся под общей анестезией (хлоралгидрат 400 мг/кг), кожу шеи брали так, чтобы обеспечить частичное скопление яремной и язычной вен. Язык вытягивали, подняв его между большим пальцем и ватным тампоном. Толстую хвостовую часть левого V. Sublingualis прокалывали иглой для подкожных инъекций (24G). Животному придавали вентральное положение и удерживали горизонтально над эппендорфом для сбора крови с раствором цитрата натрия (3,8%) в соотношении 9:1. Объем крови от каждого животного составлял от 300 до 750 мкл. После сбора крови рот животных очищали сухим ватным тампоном для удаления оставшейся крови. Кровь собирали в течение 10-15с. Визуальный осмотр на предмет повреждения языка проводили у анестезированных животных через 2 ч и через три дня после пункции. Животных повторно использовали до трех раз после периода восстановления (примерно 2 недели).

Подготовку богатой тромбоцитами плазмы и определение антиагрегантной активности для метода *in virto* проводили как описано в (Волотова Е.В., 2016).

В исследованиях *in vivo* АСК вводили в дозах 20 мг/кг, 30 мг/кг или 40 мг/кг, а исследуемые соединения в эквимолярных им.

#### 2.4. Определение параметров острой токсичности

Некоторые аспекты лекарственной безопасности исследуемых соединений определяли в соответствии с общепринятыми рекомендациями (Миронов А.Н. и др., 2012).

Острую суточную токсичность изучали на самцах мышей массой 18-22 г. Все вещества вводили внутрижелудочно, однократно. За 12 часов до введения веществ у животных лишали пищи, доступ к питьевой воде не ограничивали. После введения веществ за каждым животным в первые 120 минут наблюдали индивидуально, непрерывно; в последующие 24 часа периодически (не менее 5 раз) и затем, в следующие 14 дней внешнее состояние животных оценивали один раз в день. В процессе наблюдений регистрировали признаки отравления и количество погибших животных. LD<sub>50</sub> рассчитывали методом пробит-анализа.

#### 2.5. Моделирование артериального тромбоза, аппликацией раствором FeCl<sub>3</sub>

Антитромботическое действие производных гидроксибензойных кислот с определяли по их влиянию на скорость образования тромба в сонной артери после нанесения на её адвентицию 50% раствора FeCl<sub>3</sub> (Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E., 1990; Westrick R.J. et al., 2007; Kim K.J. et al., 2019). Исследование проводили через 60 минут после введения исследуемых соединений. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в эквимолярном соотношении. Наркотизацию крыс проводили интраперитониальным введением хлоралгидрата (400 мг/кг) (Куркин Д.В. и др., 2017). Для получения доступа к участку (10-15 мм) сонной артерии вскрывали кожу и ткани в шейном отделе животного, затем проводили отделение нервного пучка и изоляцию сосуда. На выделенный участок наносили 50% раствор FeCl<sub>3</sub> (0,025 мл), окружающие ткани изолировали плёнкой Рагаfilm. Скорость кровотока определяли на приборе «Минимакс-Допплер–К» (Санкт-Петербург), датчик которого устанавливали на сосуд на дистальнее места нанесения окислителя (Рисунок 5). Регистрацию кровотока проводили до полной окклюзии сосуда, фиксируя время её наступления.

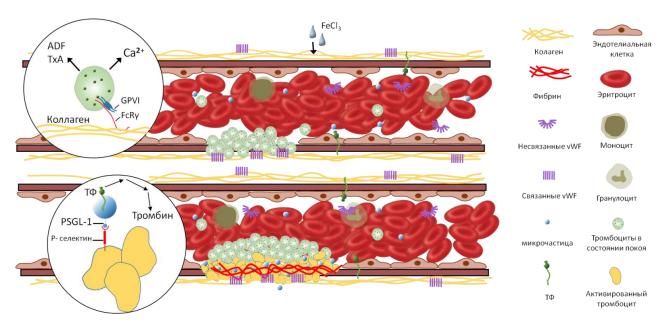


Рисунок 5. Механизм повреждения стенки сосуда хлоридом железа (III) (Furie B., Furie B.C., 2005)

При окислительном повреждении стенки сосуда хлоридом железа эндотелий и субэндотелиальный матрикс обнажаются. Тромбоциты взаимодействуют с матрицей через GPIb-V-IX и αIIbβ3 на мембране тромбоцитов, а также через коллаген и vWF в матрице. Связывание гликопротеина VI (ГПVI) с коллагеном необходимо для активации тромбоцитов, которые в дальнейшем мобилизуют кальций и способствуют высвобождению АДФ и тромбоксана А2 (вставка) для ускорения образования тромба. Эти тромбоциты экспрессируют Р-селектин, а микрочастицы, экспрессирующие PSGL-1 и тканевой фактор, накапливаются в тромбе за счет взаимодействия Р-селектина с PSGL-1 (вставка). Концентрация тканевого фактора приводит к коагуляции, образованию большего количества тромбина и распространению фибринового сгустка (Furie B., Furie B.C., 2005).

#### 2.6. Метод артериального тромбозавызванного электрическим током

Антитромботическую активность производных гидроксибензойных кислот также определяли, моделируя артериальный тромбоз, воздействуя на сосуд электрическим током. Данный подход был описан Guglielmi G. (Guglielmi, G. et al., 1991; Sturgeon S.A. et al., 2006; Спасов А.А. и др., 2021).

Исследуемые соединения вводили перорально за 1 час до начала воздействия на сосуд электрического тока. Животных вводили в состояние наркоза хлоралгидратом (400 мг/кг, внутрибрющинно), фиксировали в положении лежа на спине. Через срединный разрез вентральной стороны шеи сонные артерии животных обнажали тупым рассечением и осторожно отделяли от блуждающего нерва и окружающих тканей, затем обнажали сегмент общей сонной артерии длиной 15-20 мм и рядом с ним размещали миниатюрный импульсный датчик ультразвукового допплерографа частотой 20 МГц (внутренний диаметр 0,75 мм). После хирургических манипуляций, параметрам сердечно-сосудистой системы позволяли стабилизироваться в течение 15 минут перед продолжением эксперимента. Тромбообразование вызывали электрическим током, подаваемым на проволочные электроды с крючками на концах, которые помещали дистальнее датчика регистратора. Для электрической изоляции фрагмент пленки Parafilm (2-5 мм) размещали под сосудом. Степень тромботической окклюзии выражалась снижением кровотока в сонной артерии, который регистрировали непрерывно, до полной окклюзии сосуда, что и считали временем образования тромба.

#### 2.7. Метод моделирования острого нарушения мозгового кровообращения

Общий принцип операции по воспроизведению внутрисосудистой обратимой окклюзии средней мозговой артерии представлен ниже (Рисунок 6) и подробно описан в работах (Koizumi J.Y.Y., Nakazawa T., Ooneda G., 1986; Шмонин А.А., 2011; Мирзоян Р.С., Плотников М.Б., Ганьшина Т.С., 2012; Спасов А.А. и др. 2014; Тюренков И.Н. и др., 2012a, 2014; Morris, G.P. et al., 2016).

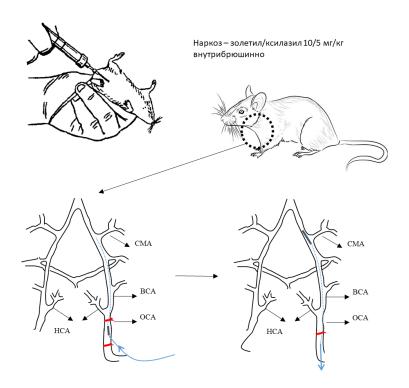


Рисунок 6. Общая схема операции по созданию обратимой окклюзии средней мозговой артерии.

Примечание: OCA — общая сонная артерия; HCA — наружная сонная артерия; BCA — внутренняя сонная артерия; CMA — средняя мозговая артерия

#### 2.8. Метод стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД

Для селективного повреждения β-клеток поджелудочной железы использовали стрептозотоцин, токсическое действие которого смягчали никотинамидом. При введении этой комбинации снижается массы β-клеток и возникает выраженная гипергликемия.

Никотинамид вводили однократно, внутрибрющинно в дозе 230 мг/кг, а затем, через 15 мин. стрептозотоцин в дозе 65 мг/кг, (Sigma-Aldrich, США) (Masiello P. et al., 1998; Спасов А.А. и др., 2011; Мазо В.К. и др., 2016). Продолжительность пищевой депривации составила 12 часов. Доступ к воде не ограничивали. Рабочий раствор стрептозотоцин (в холодном цитратном буфере (1 мМ, с рН 4,5моль/л)) готовили *ех тетрого* и до введения раствор хранили в контейнере из темного не прозрачного стекла; никотинамид растворяли в NaCl (0,9%).

Концентрацию глюкозы в крови определяли через 3 суток после введения токсина. В дальнейшее исследование отбирали животных с уровнем тощаковой гликемии от 8 до 16 ммоль/л. Однородные по уровню гликемии экспериментальные группы формировали по принципу рандомизации.

#### 2. 9. Методика оценки неврологического дефицита животных

Выраженность неврологического дефицита определяли по шкалам: Combs и D'Alecy (Combs D.J., D'Alecy L.G., 1987) (Таблица 3) и Garcia (Garcia J. H. et al., 1995; Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.В., 2014) (Таблица 4).

Таблица 3. Шкала Combs и D'Alecy

П	Начисляемые баллы				
Показатель	0	1	2	3	
Время удерживания на экране-сетке (с.)	0-5	6-10	11-14	>15	
Тест на равновесие на стержне	Отсутствие хвата, падение со стержня	Нахождение на стержне <10 с.	Нахождение на стержне 11-20 с.	Нахождение на стержне 21-30 с.	
Время удерживания передними лапами на натянутой веревке (c.)	0-2	3-4	>5 третья конечность не находится на веревке	>5 третья конечность находится на веревке	

Баллы 3 тестов суммировали, показатели здоровых животных соответствовали – 9 баллам. Для исключения погрешностей состояние животных оценивали 2 раза.

Таблица 4. Шкала Garcia

	Начисляемые баллы				
Показатель	0	1	2	3	
Спонтанная активность (в пустой клетке, в течение 5 мин.)	Движения отсутствуют	Движения почти отсутствуют	Двигается, но не приближается к трем сторонам клетки	Двигается и приближается к трем сторонам клетки	
Симметричность движений (4 конечности)	Одна сторона: отсутствует движение	Одна сторона: небольшое движение	Одна сторона: двигается медленно	Обе стороны: двигаются симметрично	
Симметричность вытягивания предплечий (удерживание крысы за хвост)	Одна сторона: отсутствует вытягивание конечности	Одна сторона: слабая попытка вытянуть конечность	С одной стороны пытается вытянуть конечность меньше, чем с другой стороны	Симметричные вытягивания	

Баллы 6 тестов суммировали, показатели здоровых животных соответствовали – 18 баллам. Для исключения погрешностей состояние животных оценивали 2 раза.

#### 2.10. Методы изучения коагуляционного гемостаза крови

Влияние производных гидроксибензойных кислот на основные показатели гемостаза оценивали на коагулометре Минилаб 701 стандартными наборами определения протромбинового, тромбинового времени, уровня фибриногена.

Протромбиновое время по Квику характеризует первую и вторую фазу плазменного гемостаза. Для проведения исследования кровь собирали в 3,8% пластиковую пробирку цитратом натрия соотношении 9:1 центрифугировали при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3 000 об/мин. Для определения протромбинового времени использовали набор Ренампластин код ПГ-5/2 (производство НПО РЕНАМ, Россия). Во флакон с лиофильно высушенным Ренампластином добавляли 8 мл воды и растворяли при покачивании. Перед проведением анализа реагент прогревали при 37°C в течение 30 мин. В кювету вносили 50 мкл тестируемой плазмы и магнитный якорь, после чего инкубировали при 37°C в течение 2 мин и добавляли 100 мкл ренампластина.

Определение протромбинового времени. Для исследования использовали бедную тромбоцитами плазму. Рабочий раствор тромбина с активностью 3 МЕ/мл получали разведением стабилизированного раствора тромбина в 20 раз (0,1 мл стабилизированного раствора тромбина прибавляли 1,9 мл физиологического раствора) с последующей 15 минутной инкубацией. После внесения магнитной мешалки в кювету с 100 мкл плазмы её инкубировали в течение 2 минут (37°С) и добавляли эквивалентное количество рабочего раствора тромбина. В процессе исследования регистрировали время от момента добавления тромбина до момента образования сгустка, определяя кинетику завершающего этапа свертывания крови. Для исследования использовали Тромбин-тест код ПГ-9 (производство НПО РЕНАМ, Россия).

Концентрация фибриногена по Клаусу. Для анализа использовали Техфибриноген — тест (производство «Технология—Стандарт», Россия). Перед проведением анализа плазму разводили рабочим раствором буфера в 10 раз (0,2 мл плазмы + 1,8 мл рабочего раствора трис-буфера). Готовый раствор тромбина получали после его растворения в 5,0 мл соответствующей жидкости. В кювету коагулометра вносили 0,2 мл разведенной буфером плазмы. Инкубирование проводили в течение 1 мин при 37°С. Рабочий раствор тромбина вносили в кювету в объеме 0,1 мл. Фиксировали время образования первых нитей фибрина.

#### 2.11. Метод моделирования хронического нарушения мозгового кровообращения

Моделирование хронического нарушения МК подробно описано в работах (Куркин Д.В. и др., 2017; Kurkin D.V. et al., 2021). Общий принцип операции представлен на (Рисунок 7).

## 2.12. Методы оценки психоневрологического состояния, когнитивных функций у животных

Влияние производных гидроксибензойных кислот на психоневрологического состояние определяли при наблюдая за их поведением в установках стандартных психофармакологических тестах – «Открытое поле-круг»

(ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ), «Тест экстраполяционного избавления» (ТЭИ) (Климочкин Ю.Н. и др., 2021), которые подробно описаны в работах (Горбунова Ю.В., 2019; Бакулин Д.А., 2016). Условный рефлекс в тесте УРПИ и навык решения экстраполяционной задачи в ТЭИ формировали за 24 часа до моделирования патологий. Нарушения координации движений определяли в тесте «Ротарод», изучение тактильной чувствительности и мелкой моторики в Адгезивнном тесте (АТ) описание которых дано в (Горбунова Ю.В., 2019; Ковалев Н.С., 2021).

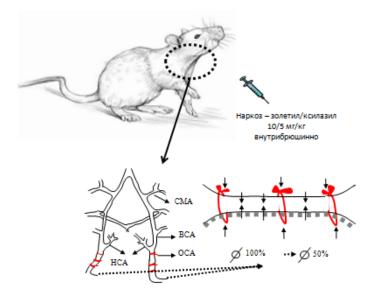


Рисунок 7. Стенозирование общих сонных артерий

Примечание: OCA – общая сонная артерия; HCA – наружная сонная артерия; BCA – внутренняя сонная артерия; CMA – средняя мозговая артерия

Водный лабиринт Морриса. Для оценки пространственного обучения и когнитивных функций. Тестирование проводили при постоянном освещении и температуре воды 25°С. При обучении в течение 4 тренировочных дней животное помещали в воду на расстоянии 10 см от стенки бассейна по определенной схеме и регистрировали латентный период затопленной площадки (фиксированное положение (Рисунок 8). Каждое животное помещали в установку 4 раза максимум на 1 мин с перерывом между подходами 30 с. Если крыса не находила платформу в течение 1 мин, ее помещали на платформу и оставляли на 15 с, после чего

обучение продолжали по указанной схеме (Таблица 5) (Vorhees C.V., Williams М.Т., 2006). Данную методику использовали для оценки способности животного узнавать конкретное местоположение скрытой платформы. Каждое животное должно научиться использовать сигналы окружающей среды, чтобы прокладывать прямой путь к скрытой платформе, когда оно стартует из разных случайных мест по периметру резервуара. Платформу помещали в фиксированное положение на 1 см ниже поверхности воды, что делало ее невидимой для плавающей крысы. По краю лабиринта были обозначены четыре позиции: север (N), юг (S), восток (E), запад (W), разделив лабиринт на четыре квадранта. Платформа всегда располагалась в юго-восточном квадранте. На стенах висели различные картинки (сигналы окружающей среды), которые крысы могли использовать в качестве дополнительных сигналов лабиринта.

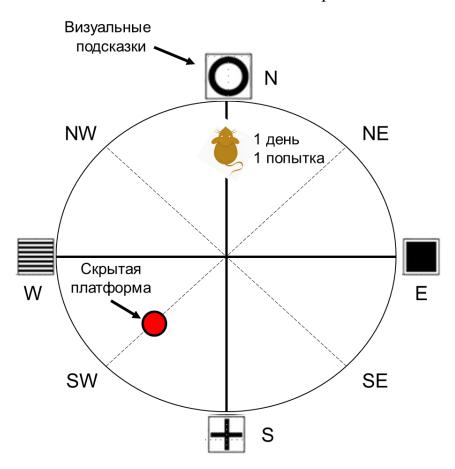


Рисунок 8. Схематическое изображение водного лабиринта Морриса

Таблица 5. Порядок испытаний водного лабиринта Морриса

День	Номер попытки			
испытания	1	2	3	4
1	N	Е	SE	NW
2	SE	N	NW	Е
3	NW	SE	Е	N
4	E	NW	N	SE

Тест оценки когнитивной функции проводили на 10-й день эксперимента. Этот тест позволяет определить, может ли животное запомнить положение скрытой платформы, которая была помещена в то же положение, что и на этапе обучения. Перед испытанием платформу удаляли. Каждая крыса выполняла 4 попытки с северной (NE) позиции, и каждое испытание длилось 60 с.

Повышение времени нахождения, скрытой платформы трактуется как потеря (забывание) животным навыка поиска скрытой платформы, а снижение времени нахождения скрытой платформы на фоне введения исследуемого соединения может указывать на возможное ноотропное действие исследуемого соединения (Kurkin D.V. et al., 2021; Petrikova-Hrebickova I., Sevcikova M., Šlamberová R., 2021).

## 2.13. Методы оценки уровня мозгового кровотока и оценка вазодилатирующей функции эндотелия

Уровень мозгового кровотока у всех животных определяли по стереотаксическим координатам методом лазерной допплерографии (Віорас Systems Inc., США). Опсиание операции по доступу к сосудам гловного мозга представлено в (Куркин Д.В., 2018; Бакулин Д.А., 2016). Вазодилатирующую функцию эндотелия мозговых сосудов оценивали согласно методическому подходу, который был предложен Тюренковым И.Н. и Воронковым А.В. (Тюренков И.Н., Воронков А.В., 2008)

#### 2.14. Метод оценки простациклин-синтезирующей активности эндотелия

Для исследования простациклин-синтезирующей активности эндотелия мозговых сосудов, на наркотизированных хлоралгидратом крысах (400 мг/кг), проводили пробу с индометацином. Фиксация головы животного производилась в стереотаксической установке. Кожа головы на дорсальной поверхности была удалена и очищена от мышечной и соединительной ткани. В черепе животного высверливалось отверствие диаметром 1 см2 при помомщи портативной бормашины (частота вращения 12 000 об/мин). Границы операционного поля выстилали коллагеновой гемостатической губкой. Поверхность мозга непрерывно орошали термостатированным физиологическим раствором (34-35°C).

Микроскопирование мелких пиальных артерий осуществляли на цифровом микроскопе Levenhuk. Прижизненная микроскопия производилась с записью изображения для его обработки в дальнейшем. Определение линейных размеров микрососудов проводилось с точностю до 2 мкм. Для калибровки измерений использовался стандартный объект-микрометром ОШ 1 (цена деления 10 мкм).

Базовым структурным элементом кровеносного русла выступает бифуркация, состоящая из трех сосудов (ствола и двух ветвей), так как именно она обеспечивает реализацию основных функций кровеносного дерева: перенос крови на длину стволового сосуда и распределение (слияние) потоков крови в участке ветвления. Поэтому исследование вазоактивных реакций проводилось в наших экспериментах преимущественно на модулях, состоящих из приносящего и отходящих от него двух сосудов.

Пиальная артериальная сеть имеет сложное строение. По всей длине крупных стволов (артерий) отходят тонкие ветви (артериолы), обеспечивая кровью близлежащие ткани. Как правило, сосудистые разветвления асимметричны, при этом сечение одной ветви больше другой, значит, тройник может включать в себя как артерию, так и артериолу, что учитывалось в наших экспериментах: рассматривались реакции и мелких артерий, и артериол. Для

исследования выбирали прямолинейные участки артерий длиной около 500 мкм и диаметром 60-80 мкм.

Изменение ширины эритроцитарного потока в сосуде отражало характер сосудистого ответа пиальных артерий головного мозга на орошение их поверхности раствором индометацина ( $2 \times 10^{-5}$  M, 20 мин). Ширина потока эритроцитов соответствовала внутреннему диаметру сосуда, а площдь соудов вычисляли по формуле:

$$S = \pi r^2$$

где r – радиус сосуда, равный половине его диаметра.

#### 2.15. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку результатов проводили, учитывая характер полученных данных, в соответствие с которым прменяли параметрические и непараметрические критерии. Различия признавались статистически значимыми при р<0,05. Нормальность распределения данных определяли критерием Шапиро-Уилка. Если данные подчинялись нормальному распределению их анализировали критерием Ньюмена-Кейлса, если нет – установление различий между двумя группами осуществляли с применением критерия Мана-Уитни, между несколькими группами – Краскела-Уоллиса. Множественное сравнение групп между собой проводили критерием Данна. Систематизацию и обработку данных проводили в MS Excel 2016 и GP Prism 6 (США). В таблицах и на рисунках результаты представлены в виде М±m (Гланц С., 1988; Реброва О.Ю., 2002).

# ГЛАВА 3. СКРИНИНГ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИАГРЕГАНТНОЙ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ

В начале исследования изучали антиагрегантную активность соединений іп vitro. После соединения, отвечающие требуемым ЭТОГО показателям ИХ способности растворимости, оценивали ПО влиять агрегацию тромбообразование после перорального введения интактным животным. Дизайн скринингового исследования представлен ниже (Рисунок 9).

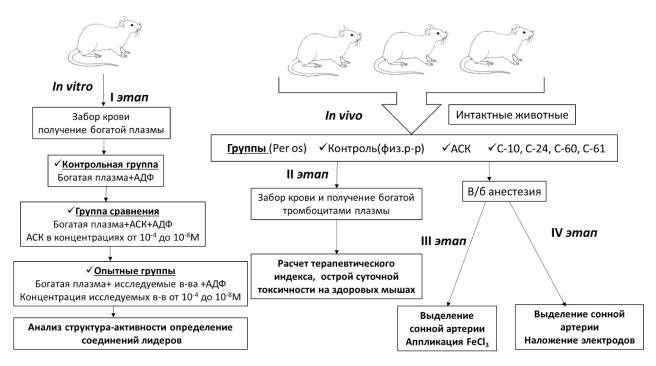


Рисунок 9. Дизайн скринингового исследования

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

Ha первом исследования проводили анализ антиагрегантной этапе производных гидроксибензойных активности 14 новых кислот. соединения тестировали в концентрациях от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  М. Препаратом сравнения служила АСК, как вещество наиболее близкое по химической структуре. После проведенного исследования отмечено четкое дозозависимое антиагрегантное действие (Рисунок 10 и Рисунок 11). Соединения под лабораторными шифрами: С-10, С-24, С-60, С-61 проявили наибольшую активность.

Исследование антиагрегантной активности производных гидроксибензойных кислот с ГАМК

Препараты с ГАМК-ергическим действием обладают широким спектром биологических эффектов, в том числе и антиагрегантными свойствами (Тюренков И.Н. и др., 2012б), наличие которых вызвано влиянием на концентрацию ионов Са<sup>2+</sup> внутри клеток тромбоцитов в результате подавления кальмодулина (Schemmer P. et al., 2013) и/или индукцией синтеза дезагрегантов в эндотелиоцитах основным из которых является NO.

Внесение в плазму соединений С-18, С-50 в концентрациях от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  агрегация клеток, индуцированная АДФ, незначительно изменялась по сравнению с образцами, в которые внесли плацебо. Таким образом, данные структурные соединения салициловой, ГАМК и ионов  $Li^+$  не проявляют антиагрегантных свойств.

Внесение в образцы плазмы соединения С-9 вызывало снижение агрегации тромбоцитов, индуцированную АДФ, на 59% по сравнению с контрольной группой в концентрации  $10^{-4}$  M (p <0,05), на 35% в концентрации  $10^{-5}$  M (p<0,05), на 33% в концентрации  $10^{-6}$  M (p<0,05), на 36% в концентрации  $10^{-7}$  M (p<0,05) и на 12% в концентрации  $10^{-8}$  M.

Аналогичное добавление к образцам плазмы крыс соединения С-10 также значительно понижало тромбоцитарную агрегацию во всех исследованных концентрациях по сравнению с контрольной группой: в концентрации  $10^{-4}$ М на 49% (p<0,05), на 43% в концентрациях  $10^{-5}$ М –  $10^{-7}$ М (p<0,05), в концентрации  $10^{-8}$ М на 19% (данные статистически недостоверны) (Рисунок 10 А).

Анализ степени агрегации тромбоцитов производными гидроксибензойных кислот с глицином.

Добавление соединения C-24 уменьшало агрегацию тромбоцитов на 61% (р <0,05) в максимальной концентрации ( $10^{-4}$  М), на 66% при концентрации  $10^{-5}$  М (р <0,05) и на 58% (р <0,05) с концентрацией  $10^{-6}$  М. При снижении концентрации до  $10^{-7}$ М и  $10^{-8}$ М происходит незначительное увеличение степени агрегации.

Соединение С-40 проявило слабый антиагрегантный эффект в концентрациях с  $10^{-4}$  М до  $10^{-6}$  М. В концентрациях препарата  $10^{-7}$  М и  $10^{-8}$  М происходит увеличение размеров агрегатов на 16% и 30%, соответственно.

Методом western blotting в тромбоцитах крысы и человека ученые определили глициновый рецептор (GlyR) (Schemmer P. et al., 2013), он отнесён к постсинаптическим и представляет собой олигомерный гликопротеин, который при активации глицином временно образует анион-селективный трансмембранный канал (Betz H., Becker C.M., 1988). Комплекс глицина с рецептором стимулирует Сl<sup>-</sup>, приток которого вызывает гиперполяризацию мембраны, которая предотвращается притоком кальция. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что глицин предотвращает агрегацию тромбоцитов дозозависимым образом через механизмы, включающие рецептор глицина (Das J., Roy A., Sil P.C., 2012) (Рисунок 10 Б).

Исследование антиагрегантной активности соединений производных гидроксибензойных кислот с морфолином.

Добавление к образцам плазмы соединения С-14 в концентрации  $10^{-4}$  М выраженно понижало агрегацию тромбоцитов на 35% (p<0,05) и на 42% (p <0,05) в концентрации  $10^{-5}$  М, на 50% в концентрации вещества  $10^{-6}$  М, при дальнейшем разбавлении антиагрегантный эффект ослабевал.

Соединение С-16 при добавлении к плазме в концентрации  $10^{-4}$  М ингибировало агрегацию тромбоцитов на 47% (p<0,05), на 45% при концентрации вещества $10^{-5}$ М (p<0,05), в  $10^{-6}$  М на 50% (p<0,05), по сравнению с группой плацебо. В концентрациях  $10^{-7}$  М и  $10^{-8}$  М происходило увеличение размеров образующихся агрегантов, по сравнению с контролем, на 12% и 18% соответственно (данные статистически недостоверны) (Рисунок 11 А).

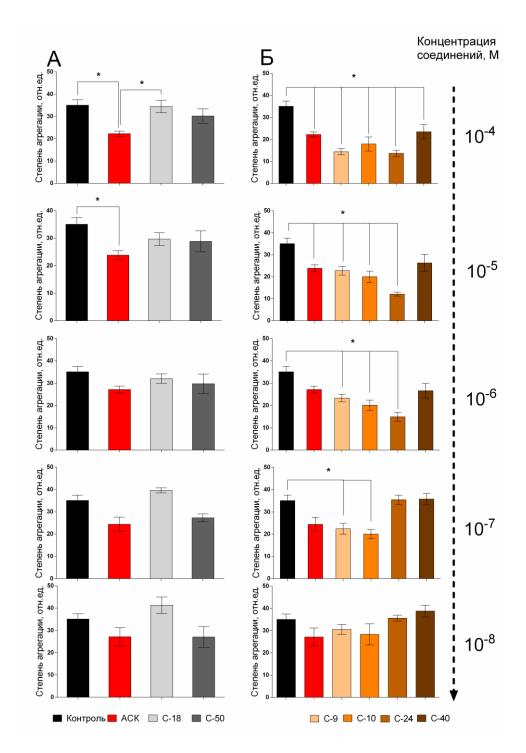


Рисунок 10. Оценка антиагрегантного действия соединений производных гидроксибензойных кислот с ГАМК и глицином

Примечание: A — гидроксибензойные кислоты +  $\Gamma AMK$ ; B — гидроксибензойные кислоты + глицин; скобками обозначены сравниваемые группы; \* — различия статистически значимы по критерию Данна при p < 0.05.

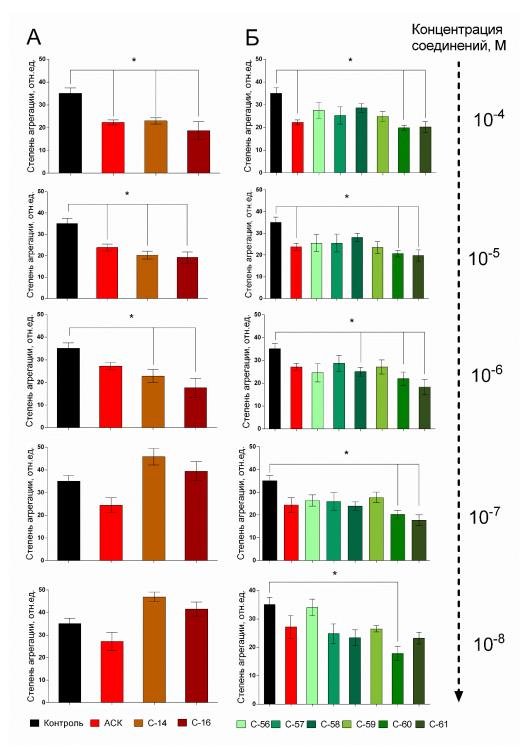


Рисунок 11. Оценка антиагрегантного действия соединений производных гидроксибензойных кислот с морфолином и таурином

Примечание. A — гидроксибензойные кислоты + морфолин; B — гидроксибензойные кислоты + таурин; скобками обозначены сравниваемые группы; \* — различия статистически значимы по критерию Данна при p < 0.05.

Существуют лекарственные препараты, содержащие заместители в виде морфолиновых циклов и оказывающие антиагрегантное действие. К ним относятся, например, ривароксабан (высокоселективный прямой ингибитор фактора Xa) (Sanmartín M. et al., 2019), молсидомин (этиловый эфир N-карбокси-3-морфолино-сиднонимина) (Бастрыгин Д.В., Колыванов Г.Б., Жердев В.П., 2012).

Морфолин легко вступает в различные реакции нуклеофильного замещения, позволяя синтезировать разнообразные по фармакологическому эффекту соединения (Коптева Н.И., 1991).

Доказано, что ривароксабан оказывает эндотолиопротективное действие различными механизмами, включая улучшение эндотелиальной функции и фибринолитической активности в отношении эндотелия, противовоспалительных свойств и тромбоцит-зависимой генерации тромбина (Зинченко Ю.В., Икоркин М.Р., 2016; Новикова Н.А., Шилова А.С., 2017). Исходя из этого, мы можем предположить, что производные салициловой кислоты с заместителем в виде морфолинового цикла имеют схожий механизм действия.

Анализ степени агрегации тромбоцитов производными гидроксибензойных кислот с аминокислотой таурин.

Действие соединения С-56 на агрегацию тромбоцитов ярко выражено при его добавлении к плазме в концентрации  $10^{-7}$  М, что на 50% (р <0,05) меньше, чем у контрольной группы, и на 20% — в сравнении с ацетилсалициловой кислотой, добавленной в аналогичной концентрации. В остальных концентрациях данное соединение проявляло слабые дезагрегантные свойства.

Соединение С-58 выраженно снижало агрегацию тромбоцитов при добавлении в концентрации  $10^{-6}$  M, что на 29% (p<0,05) меньше, чем у контрольной группы, и на 6% – в сравнении с АСК в  $10^{-6}$  M.

Соединение С-60 значительно уменьшало тромбоцитарную агрегацию на 46% (p<0,05) при концентрации  $10^{-4}$  M, на 41% (p<0,05) в концентрации  $10^{-5}$  M и  $10^{-6}$  M, приблизительно на 40% (p<0,05) -  $10^{-7}$  M и на 37% (p<0,05) -  $10^{-8}$  M в

сравнении с контрольной группой. При уменьшении концентрации антиагрегантный эффект незначительно сокращался по отношению к контрольной группе.

Антиагрегантное действие С-61 ярко выражено в концентрациях от  $10^{-4}$  М до  $10^{-7}$  М, при его добавлении к образцам плазмы происходило снижение агрегации тромбоцитов в  $10^{-4}$  М на 46% (p<0,05),  $10^{-5}$  М на 44% (p<0,05),  $10^{-6}$  М на 48% (p<0,05) и  $10^{-7}$  М на 50% (p<0,05), также происходит снижение на 34% при концентрации  $10^{-8}$  М (данные статистически не достоверны) в сравнении с плазмой, в которую внесли плацебо (Рисунок 11 Б).

Таурин — естественный внутриклеточный метаболит, который вызывает различные биологически активные эффекты, включая антиоксидантный, модуляцию движения ионов (в том числе Ca<sup>2+</sup> (Das J., Roy A., Sil P.C., 2012)), осморегуляцию, модуляцию нейротрансмиттеров и конъюгацию желчных кислот, что в совокупности поддерживает физиологический гомеостаз (Ito T., Schaffer S.W., Azuma J., 2012; Jin R. et al., 2018). Известно, что первичный механизм действия этого соединения в организме заключается в модификации тиольной группы поверхностного рецептора АДФ тромбоцита путем присоединения метаболита с образованием смешанного дисульфида (Ding Z. et al., 2003; Рощупкин Д.И. и др., 2007).

Сравнение влияния исследуемых производных гидроксибензойных кислот на степень агрегации с эталонным препаратом.

При анализе влияния веществ, взятых в концентрации  $10^{-4}$  М, на агрегацию тромбоцитов отмечено, что соединения под лабораторными шифрами С-9, С-10, С-16, С-24, С-61 проявили наибольшую активность относительно АСК; С-14 по было сопоставимо с ней, а соединения С-40, С-56, С-57, С-58, С-59, С-60 ей уступали.

Оценка ингибирования тромбоцитов в плазме в концентрации 10<sup>-5</sup> М показала, что соединения С-10, С-24, С-14, С-16 и С-61 по выраженности антиагрегантного действия намного превышают АСК, а действие веществ под

лабораторными шифрами С-9, С-56, С-59 оказалось приблизительно таким же, как у неё; активность соединений под шифрами С-40, С-57, С-58, С-60 значительно уступала АСК.

Соединения под шифрами С-9, С-10, С-24, С-14, С-16, С-56 и С-61 концентрации 10<sup>-6</sup> М вызывали выраженное антиагрегантное действие, превосходящие отмеченное у АСК. Соединения С-40, С-58, С-59 оказывали выраженное антиагрегантное действие, сопоставимое с АСК.

Проанализировав степень влияния соединений на агрегацию в концентрации 10<sup>-7</sup> М, можно сделать следующее заключение: С-10, С-56, С-60, С-61 проявили наиболее выраженную активность относительно АСК; С-9, С-57, С-58, С-59 по активности были сопоставимы с ней, а С-14, С-16, С-24, С-40, С-59 ей значительно уступали.

При оценке влияния исследуемых соединений в концентрации  $10^{-8}$  М на ингибирование тромбоцитов было отмечено, что соединение С-60 снижало степень агрегации существенно более выраженно, чем АСК, действие веществ под лабораторными шифрами С-9, С-10, С-24, С-56, С-57, С-58, С-59, С-61 было сопоставимым с АСК, а соединения С-14, С-16, С-40, С-56 ей уступали.

В результате изучения влияния 14 новых производных гидроксибензойных кислот на антиагрегантную активность тромбоцитов *in vitro*, доказано, что данные соединения являются перспективными для изучения и разработки новых веществ, проявляющих данный вид биологической активности. Наиболее перспективными можно считать соединения под лабораторными шифрами С-10, которое в своем составе содержит остаток аминокислоты глицин и ионы натрия, а также С-24, содержащее ион калия, С-16, которое является калиевой солью морфолина, и производные, содержащие в своем составе остаток аминокислоту таурин и калий – С-60 и С-61. На основании полученных данных можно сделать вывод о рациональности дальнейшего и углубленного изучения обозначенных выше соединений.

#### 3.2. Поиск соединений, ингибирующих агрегацию тромбоцитов in vivo

Терапевтический индекс соединений определяли у здоровых животных на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Исследуемые вещества вводили перорально за 1 час до взятия образцов крови. Вначале определяли степень агрегации тромбоцитов здоровых животных, которая в среднем составила 36,71±2,27. Терапевтическая доза препарата сравнения АСК вначале была взята согласно литературным данным (Dobrzyński M. et al., 2017; Puurunen J. et al., 1983; Guerrero A. et al., 2004; Ulucan C. et al., 2003) и составила 20 мг/кг, а степень агрегации тромбоцитов при её внесении в образцы плазмы составила 24,19±2,59, что можно трактовать как слабовыраженный эффект, и было принято решение для данного препарата сравнения провести внутрилабораторную оценку зависимости антиагрегантного действия от дозы. Основываясь на анализе кривой зависимости, доза-эффект было определено, что терапевтическая доза АСК, ингибирующая степень агрегации тромбоцитов, составляет 39 мг/кг, данная доза была выбрана для дальнейшего исследования.

Для определения терапевтического эффекта соединений-лидеров первую дозу брали в эквимолярном соотношении от минимальной дозы АСК, вторую дозу рассчитывали эквимолярно от терапевтической дозы АСК, последующие дозы увеличивали на 10 и 20 мг, затем строили график зависимости доза-эффекта для всех соединений. Основываясь на анализе кривой зависимости, доза-эффект определили терапевтический индекс. Установленные дозы соединений использовали в дальнейших экспериментах (Таблица 6).

Таблица 6. Данные об эффективной дозе

<b>№</b> п/п	Шифр соединения	Доза, мг/кг	Степень агрегации (M±m)	% относительно контроля	ЕД <sub>50</sub> мг/кг
1.	Плацебо		36,71±2,27		
	АСК	20	24,19±2,59*	-34,09	
2.		30	22,56±2,08*	-38,53	39
		40	17,75±1,36*	-51,64	
	C-10	56	24,33±1,44*	-33,72	
3.		28	24,91±1,88*	-32,14	83
3.		18	36,29±2,31	-1,13	03
		8	35,67±2,85	-2,83	
	C-24	59	26,38±1,93*	-28,13	
4.		30	26,67±3,46*	-27,34	105
4.		20	34,66±2,60	-5,58	100
		10	33,98±3,48	-7,42	
	C-60	69	25,20±2,82*	-31,36	
5.		35	25,16±2,11*	-31,45	19
5.		25	18,73±0,91*	-48,98	1)
		15	14,87±0,69*	-59,48	
	C-61	69	15,40±1,16*	-58,85	
6.		35	15,10±0,44*#	-58,05	23
		25	19,77±0,58*	-46,14	
		15	21,10±1,25*	-42,53	

Примечание. \* — различия между контролем и опытом статистически достоверны, p < 0.05; критерий Kruskal — Wallis.

## 3.3. Изучение антитромботической активности соединений на модели артериального тромбоза, вызванного нанесением раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс

После нанесения на сонную артерию  $FeCl_3$  наблюдали постепенное тромбирование сосуда, оканчивающееся его полной окклюзией (остановка кровотока) (Кигz К.D., Main B.W., Sandusky G.E., 1990). В группе животных, которым вводили плацебо (физиологический раствор), окклюзия сосуда наступала в среднем через  $14,8\pm0,77$  минут. У животных, которым вводили АСК в дозе 39 мг/кг показатель был больше на 69% (p<0,05).

Соединения, содержащие в своём составе АК глицин, не значительно влияли на образование тромба в сосуде. Так, пероральное введение соединения С-

10 пролонгировало полную окклюзию сосуда до 17,5 ±0,66 мин, что на 19% больше, чем у животных, которым вводили плацебо, и на 30% меньше в сравнении с группой АСК, различия были статистически не достоверны. Пероральное введение соединения С-24 незначительно замедляло образование тромба. Так, время полной остановки кровотока по сосуду было на 20% и на 29% соответственно больше в сравнении с показателями животных, которым вводили плацебо или АСК, соответственно (различия статистически не достоверны).

Соединение с остатком таурина (С-60) проявляло выраженную антитромбогенную активность и пролонгировало время тромбоза на 3% эффективнее, чем препарат сравнения, и на 73% (р<0,05) в сравнении с контрольной группой. Исследуемое соединение С-61 увеличивало время окклюзии сосуда в 2 раза по сравнению с контрольной группой (р<0,05), но различий в данном показателе с препаратом сравнения АСК не наблюдалось (Рисунок 12).

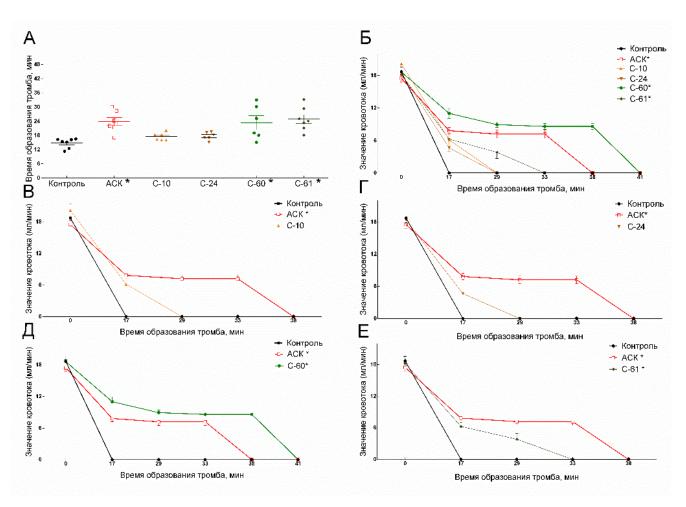


Рисунок 12. Влияние исследуемых соединений на динамику тромбообразования в сонной артерии крыс после нанесения на неё раствора 50% FeCl<sub>3</sub>

Примечание. A — время полной окклюзии сосудов под влиянием исследуемых соединений, ACK или плацебо; B — динамика тромбообразования под влиянием исследуемых соединений, ACK или плацебо; B — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-10;  $\Gamma$  — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-60; E — динамика тромбообразования под влиянием соединения E-60; E — динамика тромбообразования под влиянием соединения E-61 \* — E-0,05 изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий E-Стьюдента с поправкой Бонферрони.

### 3.4. Исследование антитромботического действия веществ на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током

После наложения электродов на сонную артерию животных, которым вводили плацебо, окклюзия сосуда наступала в среднем через 13,6±0,63 минут. У животных, которым вводили АСК, этот показатель был на 55% больше (p<0,05).

Соединения С-10 и С-24 оказывали слабый антитромботический эффект, увеличивая время окклюзии на 22% и 4%, соответственно. Соединения С-60 и С-61 проявляли выраженный антитромботический эффект, пролонгируя время наступления полной окклюзии до 72% и 76%, соответственно (p<0,05), в сравнении с животными, которым вводили плацебо.

При сравнении влияния исследуемых соединений с эффектом эталонного препарата были получены следующие результаты: С-10, С-24 уменьшало время наступления окклюзии на 21%, 33%, соответственно (p<0,05); соединения С-60 и С-61 на 11% и 14%, соответственно, его увеличивали, различия были статистически не значимы, что может указывать на сопоставимость выраженности антитромботического действия исследуемых соединений и АСК (Рисунок 13).

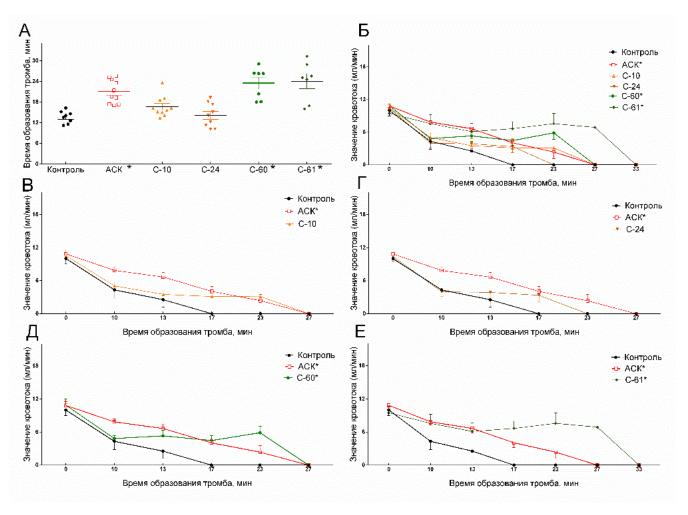


Рисунок 13. Влияние исследуемых соединений на тромбообразование в сонной артерии крыс, вызванного электрическим током

Примечание. A — время полной окклюзии сосудов под влиянием исследуемых соединений, ACK или плацебо; B — динамика тромбообразования под влиянием исследуемых соединений, ACK или плацебо; B — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-10;  $\Gamma$  — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-60; E — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-60; E — динамика тромбообразования под влиянием соединения E-61 \* — E-0,05 изменения статистически значимы по отношению E-61 контролю критерий E-61 статистически значимы по отношению E-61 контролю критерий E-61 статистически значимы по отношению E-61 статистически значимы E

### 3.5. Изучение острой токсичности и расчет терапевтического индекса

Признаки развития токсического действия исследуемых соединений изучали, наблюдая за общесоматическим состоянием мышей-самок (масса тела 30-40г), после их острого однократного внутрижелудочного введения в виде

водных растворов. Наблюдение за объектами вели в течение суток, регистрируя количество погибших и животных с симптомами интоксикации (отсутствие движений, аномальное дыхание, тремор, гиперсаливация и подобные признаки общетоксического действия). ЛД<sub>50</sub> рассчитывали пробит-анализом.

Исследование острой токсичности показали, что по классификации токсичности веществ при их введении в желудок исследуемые вещества можно отнести к классу малотоксичных (Таблица 7).

Таблица 7. Показатели острой суточной токсичности (ЛДы), новых производных гидроксибензойных кислот и ацетилсалициловой кислоты

№п/п	Шифр	ЛД50	95% доверительный
	соединения	мг/кг	интервал
1.	C-10	2920,24	2793,94÷3048,54
2.	C-24	3519,87	3407,60÷363214
3.	C-60	2209,98	2209,98÷3232,81
4.	C-61	2441,22	2158,82÷2760,57
5.	АСК	245,7*	287,4÷210,1*

Примечание. \* — Данные взяты из патента РФ 2420532 диалкил-бета-(о-салицилоил)этилфосфонаты, обладающие жаропонижающей активностью.

#### 3.6. Заключение

В ходе выполненных экспериментов по изучению антиагрегантной и 14 антитромботической активности оригинальных производных гидроксибензойных кислот in vitro и in vivo выделено 4 соединения лидера. Для тех, которые проявили высокую антиагрегантную активность, был произведен расчет терапевтического индекса и оценка острой суточной токсичности. По результатам изучения острой суточной токсичности соединений С-10, С-24, С-60 и С-61 установлено, что они по эффективным дозам превосходят препарат сравнения в 12, 14, 8 и 10 раз, соответственно. По показателю ЕД50 соединения С-10 и С-24 превышают АСК в 2 и 3 раза, соответственно. Производные, содержащие в своём составе фрагмент таурина С-60 и С-61, были эффективны в дозе в 2,1 и 1,7 раза меньше, чем АСК, что позволяет сделать вывод, о том, что их терапевтическая широта значительно больше.

В исследованиях антитромботической активности С-60 и С-61 их введение в в дозах 19 мг/кг и 23 мг/кг статистически значимо пролонгировали время тромбоза сонной артерии у экспериментальных животных в сравнении с показателями, зафиксированными у животных, которым вводили плацебо. Соединения С-10 и С-14 антитромботического эффекта не оказывали.

На основе полученных данных в условиях *in vitro* и *in vivo* представилось целесообразным изучить влияние данных соединений на антиагрегантную и антитромботическую активность у животных с преморбидным фоном (старые или животные с экспериментальным сахарным диабетом).

# ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ У ЖИВОТНЫХ С ПРЕМОРБИДНЫМ ФОНОМ

Процессы старения приводят к нарушению функции эндотелия, повышая риск развития ССЗ с увеличением возраста. Старение, как правило, протекает со сложными структурными и функциональными изменениями сосудов, что способствует более высокой заболеваемости и распространенности ССЗ среди пожилых людей (Le Couteur D.G., Lakatta E.G., 2010). Наиболее важным клиническим изменением сосудов является развитие эндотелиальной дисфункции, важнейшего патофизиологического звена в увеличении риска сердечно-сосудистых осложнений. В «старых» сосудах этот процесс в основном характеризуется снижением биодоступности NO, что является следствием нарушенного синтеза NO или высокой скоростью его деградации (Rodríguez-Mañas L. et al., 2009; El Assar M. et al., 2012; Chiao Y.A. et al., 2021). Возрастная эндотелиальная дисфункция – прогрессирующее явление и основная причина атеросклероза и тромбозов, предиктора ССЗ. Следовательно, стратегии по минимизации влияния старения на функцию эндотелия могут быть важной терапевтической целью в случаях, связанных с возрастной васкулопатией (Del Campo L. et al., 2018; Chi C. et al., 2019; Li T. et al., 2020).

Проблема артериальных тромбозов неразрывно связана с системой гемостаза (Науbar H. et al., 2018). Тромбозы — частая причина смерти, ИИ, инфаркта, сосудистых осложнений сахарного диабета, ампутаций. Поиск и исследования атромбогенного действия потенциальных антитромботических средств остается важной задачей фармакологии. Доклинические исследования антитромботического действия новых потенциальных молекул должно оцениваться не только на здоровых и молодых животных, но и на тех, которым смоделировали состояние максимально близкое к клиническим условиям назначения антиагрегантов. По мнению ученых из США и Бразилии (Carson D.S. et al., 2015; Moreira H.S. et al., 2018) которые в своих работах сделали вывод о том,

что, если мы хотим, чтобы эксперименты на модельных организмах соответствовали патофизиологии болезни у человека и одинаково отвечали на фармакотерапию, то необходимо выполнять экспериментальные исследования в условиях близких к клиническим.

При проведении антиагрегантной терапии её безопасность наряду с эффективностью является важным фактором выбора средства фармакотерапии. Определение риска возникновения кровотечений на фоне применения антиагрегантов (свойственен всем антитромбоцитарным средствам) обязательно при тестировании препаратов этой группы (Ueno M. et al., 2011). Поэтому в нашей работе мы определили влияние соединенний лидеров на показатель «времени кровотечения».

Антитромботическую и антиагрегантную активности соединений проводили на старых (3 годовалых) и животных с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа (Рисунок 14).

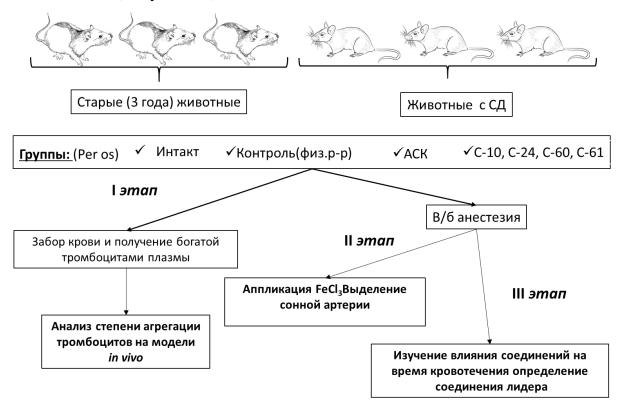


Рисунок 14. Дизайн исследования по изучению антиагрегантной активности производных гидроксибензойных кислот у животных с преморбидным фоном

## 4.1. Исследование антиагрегантной активности на модели АДФ индуцированной агрегации (in vivo)

Влияние веществ на функциональную активность тромбоцитов *in vivo* определяли у животных с преморбидным фоном, в качестве которого были выбраны возраст и СД, который в настоящее время рассматривается в качестве модели ускоренного старения. В качестве экспериментальной модели сахарного диабета выбирали введение стрептозотоцина и никотинамида. В исследование отбирали животных с выраженной гипергликемией, которую определяли после 6-часового голодания. Изначально, по уровню гликемии, все животные были сопоставимы, а животные в интактной оставались здоровыми.

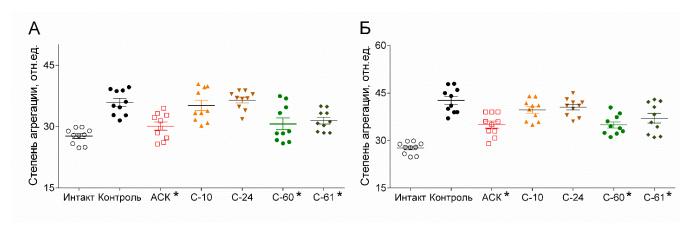


Рисунок 15. Влияние исследуемых соединений на агрегацию тромбоцитов у животных с преморбидным фоном

Примечание: A — старые животные; B — животные с  $\mathcal{I}(\mathcal{I})$  \* — различия статистически значимы по отношению к контрольной группе животных, по критерию Данна p<0,05.

Степень агрегации старых животных и животных с СД была на 30% и 54% соответственно выше, чем у интактных крыс. В проведенном исследовании степень агрегации тромбоцитов у старых животных составила 35,91±0,96 (Рисунок 15). У животных, которым перорально вводили АСК в дозе 39 мг/кг, степень агрегации была на 16% (30,11±1,26) ниже, чем у животных, которым вводили плацебо. У животных, которым вводили соединения С-10 (83 мг/кг) или С-24 (105 мг/кг), степень агрегации тромбоцитов не отличалась от животных

контрольной группы. У животных, которым вводили С-60 или С-61, степень агрегации была на 15% и 13% соответственно ниже, чем у образцов крыс, которым вводили плацебо.

Уровень агрегации у животных с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД) составил 42,68±1,25, а у тех, которым вводили АСК – 34,97±1,12, (разница с контрольными образцами составила 18%). В группе животных, которым вводили соединения С-10 или С-24, степень агрегации тромбоцитов была на 7% и 5% соответственно меньше, чем у контрольных. У животных с ЭСД и которым вводили С-60 или С-61 степень агрегации тромбоцитов была сопоставима со значениями животных, которым вводили АСК и была на 18% и 13%, соответственно (р<0,05), чем в образцах тех, которым вволи плацебо.

Представленные результаты позволяют считать не перспективным дальнейшее исследование соединений под лабораторными шифрами C-10 и C-24.

# 4.2. Оценка противотромботического действия на модели артериального тромбоза, вызванного нанесением хлорида железа (III) на сонную артерию крыс

Антитромботическое действие соединений С-60 и С-61, как и в предыдущем блоке работы исследовали на старых и животных с ЭСД.

В результате исследования на старых животных было выявлено, что полная окклюзия сонной артерии у тех, которым вводили плацебо, происходила к  $16,50\pm0,89$  минуте (Рисунок 16), а в группе, которой вводили АСК, на 22% (р<0,05) дольше и составило  $20,14\pm0,55$  минут. У животных, которым вводили соединение С-60, тромб образовывался на 25% (р<0,05) дольше, чем у контрольных и на 3% быстрее чем у тех, которым вводили АСК (время полной окклюзии составило  $20,67\pm1,20$  минут). У животных, которым вводили С-61, время образования тромба было на 10% больше по сравнению с временем крыс, которым вводили плацебо, и меньше на 10% по сравнению с группой АСК (время полной окклюзии сосуда составило  $18,17\pm1,56$  минут).

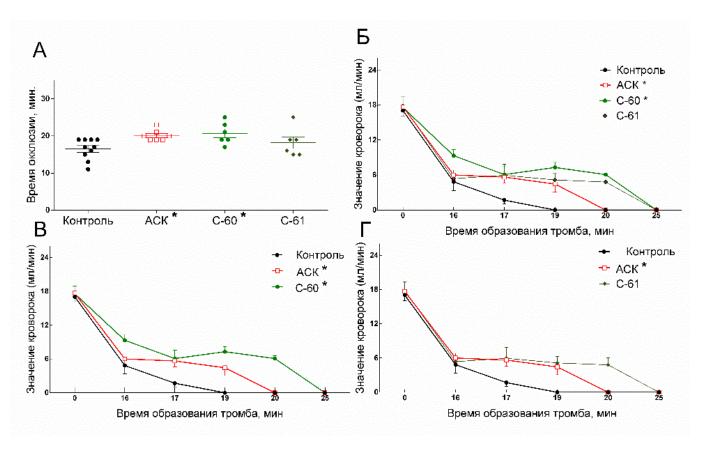


Рисунок 16. Время образования тромба после нанесения 50% хлорида железа на сонную артерию у 3 годовалых (старых) животных

Примечание: A — время полной окклюзии сосудов под влиянием исследуемых соединений, ACK или плацебо; B — динамика тромбообразования под влиянием исследуемых соединений, ACK или плацебо; B — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-60;  $\Gamma$  — динамика тромбообразования под влиянием соединения C-61; \* — p<0,05 изменения статистически значимы по отношению к контролю критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони.

В группе контрольных животных с ЭСД образование тромба в сонной артерии происходило на  $10,3\pm0,78$  минуте (Рисунок 17). В группе животных, которым предварительно вводили препарат сравнения АСК, время образования тромба, наступало к  $17,0\pm1,36$  минуте, что в 1,7 раза медленнее относительно контрольной группы (p<0,05). В группе животных, которым предварительно вводили соединение С-60, время образования тромба наступало к  $26,3\pm0,94$  минуте, что в 2,6 раза (p<0,01) медленнее относительно контрольной группы и в

1,5 раза медленнее относительно группы животных, получавших препарат сравнения АСК (p<0,05). В группе животных, предварительно получавших соединение C-61, время образования тромба наступало к  $19,9\pm1,18$  минуте, что в 1,9 раза (p<0,01) медленнее относительно контрольной группы и в 1,2 медленнее, чем у животных, которым вводили препарат сравнения АСК.

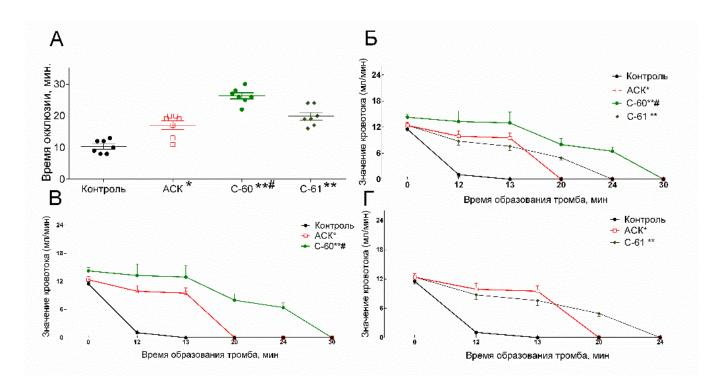


Рисунок 17. Время образования тромба после нанесения 50% хлорида железа на сонную артерию у животных с ЭСД

#### 4.3. Изучение влияния соединений на время кровотечения

У животных, которым вводили плацебо, время кровотечения составило  $177,1\pm17,45$  секунд. Исследуемые производные в дозах, взятых в эквимолярных концентрациях, пролонгировали время кровотечения. Референтный препарат увеличивал время кровотечения на 81% ( $320,0\pm18,29$  с).

В группе животных, которым были введены соединение под лабораторным шифром С-60, время кровотечения пролонгировалось до 237,9±11,54 секунд, что на 34% медленнее относительно показателей группы контроля и на 26% быстрее, чем у группы животных, которым вводили препарат сравнения.

Соединение С-61 увеличивало время кровотечения до 285,7±19,29 секунд; что было на 61% медленнее, чем у животных, которым вводили физиологический раствор и на 11% быстрее относительно группы животных, которым вводили ацетилсалициловую кислоту (Рисунок 18).

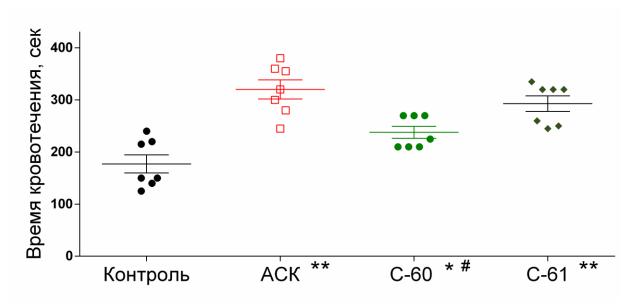


Рисунок 18. Влияние исследуемых соединений и АСК на время кровотечения из хвостовой вены

Примечание: \*-p<0.05; \*\*-p<0.01 — изменения статистически значимы по отношению к контролю, #-p<0.05 изменения статистически значимы по отношению к АСК, критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони

#### 4.4. Заключение

Повышение агрегационной активности тромбоцитов ведет к увеличению скорости тромбообразования и снижению атромбогенного потенциала эндотелия, особенно при состояниях вызввающих его дисфункцию. На данном этапе исследования была выявлена высокая антиагрегантная активность соединений С-60 и С-61, а также низкая антиагрегантная активность соединений С-10 и С-24, на основании полученных данных было принято решение, что дальнейшее углубленное изучение данных соединений не является необходимым.

Изучение влияния соединений на процесс тромбообразования, вызванного окислителем (раствор FeCl<sub>3</sub>), выявлена высокая антитромботическая активность исследуемых соединений на животных с преморбидным фоном.

влияния соединений на продолжительность результате изучения хвостовой вены наблюдалось статистически кровотечения ИЗ значимое увеличение данного времени у животных всех экспериментальных групп. У животных, которым вводили С-60, продолжительность образования тромба была на 26% меньше, чем у тех, которым вводили АСК. Данные результаты указывают целесообразность проведения дальнейших исследований цереброэндотелиопротективных свойств этого соединения.

## ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ C-60

Различные варианты цереброваскулярной недостаточности являются одним из самых тяжелых заболеваний на всех этапах терапии, что обусловлено сложностью первичной диагностики и верификации диагноза, различными ограничениями для проведения первичной нейропротекции и реабилитации. Нарушения или отсутствие восприятия окружающих процессов, адекватного вербального контакта существенно осложняют репаративую терапию.

Чаще всего НМК (нарушение мозгового кровообращения) поражают людей старшей возрастной группы, состояние которых отягощено сопутствующими заболеваниями. Результаты международных мультицентровых исследований указывают на то, что ИИ развивается в 80-85% случаев, а гемморагический только в 15-20%.

Медикосоциальное значение НМК огромно, ведь именно заболевания этой группы часто сопровождаются инвалидизацией и дезадаптацией. Всего небольшая часть пациентов (5-10%) после перенесения ИИ способна к самообеспечению и относительно полноценной жизни остальные становятся инвалидами.

Таким образом, церебральный инсульт является проблемой чрезвычайной медицинской и социальной значимости (Рисунок 19).

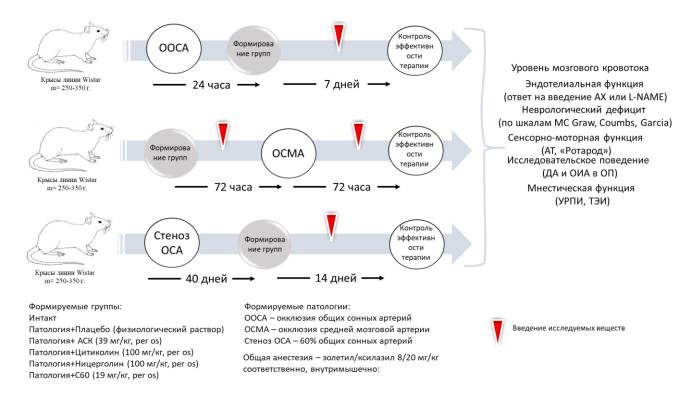


Рисунок 19. Дизайн исследования церебротективной активности

# 5.1. Изучение влияния соединения C-60 на психоэмоциональный статус животных с ишемией головного мозга, смоделированной методом необратимой перевязки общих сонных артерий

Курсовое введение нового производного гидроксибензойных аминокислот, соединения с лабораторным шифром С-60 и препаратов Цитиколин, Ницерголин и ацетилсалициловая кислота статистически значимо снижали тяжесть ишемии поскольку неврологический балл этих животных согласно шкалам Combs and D'Alecy и Garcia был статистически значимо меньше, чем у животных, которым вводили плацебо. Также животные, которым вводили обозначенные вещества, статистически значимо дольше держались на вращающемся стержне установки Ротарод (Рисунок 20).

Изучение различных поражений ЦНС невозможно без определения и характеристики поведенческих отклонений, что даёт возможность определить локализацию и тяжесть поражения отделов нервной системы (Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.В., 2014). Показатели двигательной и ориентировочно-

исследовательской активности, а также памяти животных проводили через 8 суток после перевязки общих сонных артерий.

Число поведенческих актов, свидетельствующих о двигательной и ориентировочно-исследовательской активность у животных с перевязанными ОСА (общими сонными артериями) было достоверно ниже, чем у интактных (p<0,05).

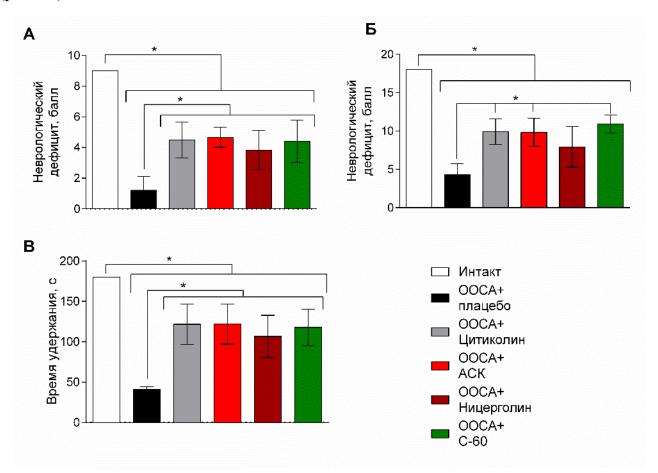


Рисунок 20. Влияние исследуемых веществ на неврологический дефицит по шкалам Combs and D'Alecy (A), Garcia (Б) и удержание на вращающемся стержне (В) у животных с необратимой окклюзией общих сонных артерий

Примечание: \* — p<0,05 — различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна).

Животным, которым в течение 7 дней после перевязки ОСА вводили соединение с лабораторным шифром С-60 или препараты Цитиколин,

Ницерголин и ацетилсалициловую кислоту, двигательная и ориентировочноисследовательская активности были выше (p<0,05), чем в группе животных, которой вводили плацебо (Рисунок 21 A, Б).

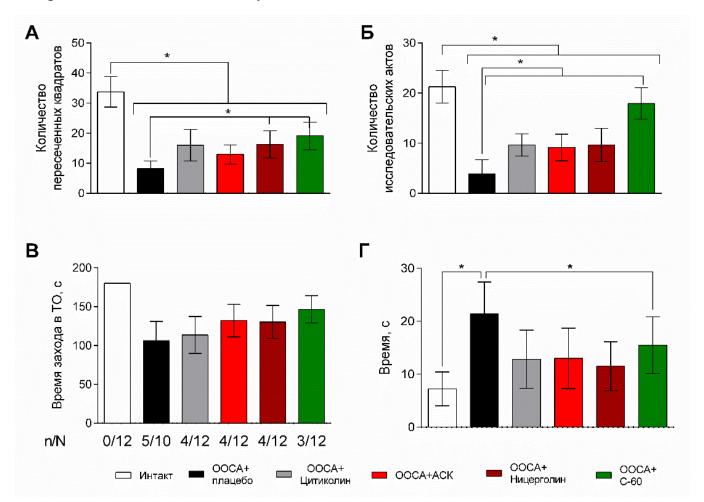


Рисунок 21. Влияние исследуемых веществ на двигательную (A), ориентировочно-исследовательскую (Б) активности в тесте Открытое поле, латентный период захода в темный отсек установки УРПИ (В) и латентный период решения экстраполяционной задачи в ТЭИ (Г) у животных с ООСА

Примечание: n- количество животных, зашедших в темный отсек, N- количество животных в группе \*-p<0.05- различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна). \*-p<0.05- различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна).

После первого тестирования животных в УРПИ и ТЭИ был сделан вывод, о том, что все протестированные крысы запомнили электро-болевое раздражение, нанесённое им в темном отсеке установки УРПИ, а также способ решения экстраполяционной задачи в ТЭИ. Повторно животных тестировали через 8 дней после перевязки общих сонных артерий и было выявлено, что у тех, которым после ООСА вводили исследуемые вещества, латентный период захода в темный отсек установки УРПИ статистически значимо не отличался от показателей животных, которым вводили плацебо (Рисунок 21 В). Латентный период решения эктраполяционной задачи в ТЭИ у всех животных, которым перевязали ОСА был выше, чем у интактных. У тех крыс, которым в течение 7 дней после ООСА (окклюзии общих сонных артерий) вводили соединение С-60, показатель скорости решения экстраполяционной задачи был статистически значимо ниже (р<0,05), чем у тех, которым вводили плацебо, и практически не отличался от выявлено у интактных (Рисунок 21 Г).

Тяжесть постишемической деструкции ГМ коррелирует с выраженностью и длительностью микро- и макроциркуляции, а их количественное определение носит важный прогностический характер, давая возможность обоснованного выбора терапевтических стратегий. При меньшем снижении интенсивности микроциркуляции вероятность компенсаторного развития коллатералей выше, а сохранение вазодилатирующей функции эндотелия важно для поддержания адекватного поддержания локальной гемоперфузии в величинах близких к физиологическим.

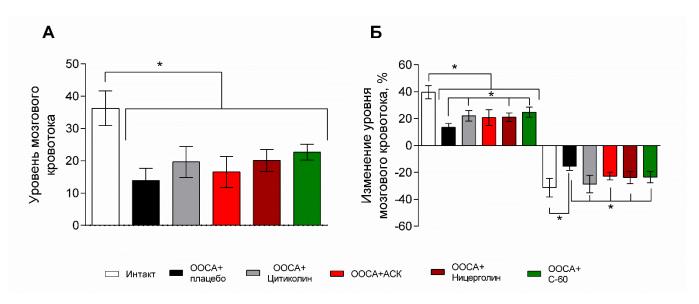


Рисунок 22. Влияние исследуемых веществ на уровень ЛМК (A) в проекции средней мозговой артерии после неполной ишемии головного мозга на фоне введения исследуемых соединений и его изменения в ответ на введение АХ или L-NAME (Б)

Примечания \* — p<0,05 — различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений).

Уровень ЛМК определяли в бассейне средней мозговой артерии оперированных крыс через 84 часа после ООСА. Эндотелийзависимую вазодилатацию стимулировали внутривенными введение АХ и блокировали введением L-NAME.

Уровень ЛМК у животных, которым вводили плацебо был достоверно ниже (p<0,05), чем в группе интактных. Увеличение уровня кровотока в ответ на введение АХ в группе интактных животных было более выраженным, чем у животных, которым вводили плацебо.

У животных, которым терапевтическим курсом (7 дней) вводили исследуемые вещества, уровень мозгового кровотока был выше, чем у тех, которым вводили плацебо, но различия этих показателей не достигали

статистической значимости (Рисунок 22 A). При оценке стимулированной (введение AX) и базальной (после введения L-NAME) секреции NO, было отмечено, что у тех животных, которым после ООСА вводили Цитиколин, АСК, Ницерголин или С-60, эти показатели были статистически значимо выше, чем у крыс, которым вводили плацебо, что указывает на большую сохранность эндотелия и лучшее его функционирование (Рисунок 22 Б).

# 5.2. Изучение влияния соединения C-60 на психоэмоциональный статус животных с ишемией головного мозга, смоделированной методом интравазальной окклюзии левой средней мозговой артерии

После окклюзии левой средней мозговой артерии (ОСМА) у животных развивался выраженный неврологический дефицит по шкалам Garcia и «Combs & D'Alecy». Через 3 суток после операции психоневрологическое состояние прооперированных животных статистически значимо отличалось от интактных. У животных с ишемией головного мозга отмечали схожие по выраженности симптомы неврологического дефицита (манежные движения, слабость конечностей, нарушение координации и др.).

Через 72 часа после ОСМА и ежедневного введения исследуемых веществ во всех группах тяжесть неврологического дефицита по шкалам Garcia и «Combs & D'Alecy» была в разной степени меньше, чем у животных, которым вводили плацебо.

Курсовое лечебно-профилактическое введение (в течение 3 дней до операции и в течение 3 дней после) Цитиколина, ацетилсалициловой кислоты, Ницерголина или соединения С-60 животным с окклюзией средней мозговой артерии оказывало выраженное церебропротективное действие, поскольку тяжесть неврологического дефицита, оцениваемого по шкалам Garcia и «Combs & D'Alecy» у этих крыс была значительно ниже (р<0,05), чем у тех, которым вводили плацебо (Рисунок 23 A, Б). Показатель цепкости и тяги, характеризующий моторику конечностей у обозначенных животных, также был

на статистически значимом уровне – выше (p<0,05), чем у тех, которым вводили плацебо (Рисунок 23 В).

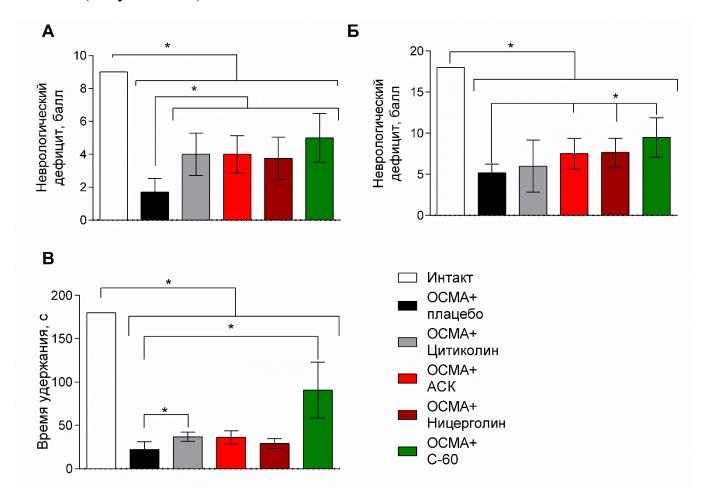


Рисунок 23. Влияние исследуемых веществ на неврологический дефицит по шкалам Combs and D'Alecy (A), Garcia (Б) и удержание на вращающемся стержне (В) у животных с окклюзией средней мозговой артерии

Примечание: \* — различия статистически значимы в сравнении с группой «ОСМА + плацебо» при p<0.05 (критерий Данна); ОСМА — окклюзия средней мозговой артерии.

По результатам теста «Открытое поле» через 3 дня с начала терапии в группе, животных которым вводили плацебо, двигательная и ориентировочно-исследовательская активности были значимо ниже, чем у интактных животных: крысы не обследовали арену полностью, редко выполняли исследовательские акты.

В группах, животным которых вводили исследуемые вещества, значение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности были статистически значимо выше (p<0,05), чем у тех, которым вводили плацебо (Рисунок 24 A, Б).

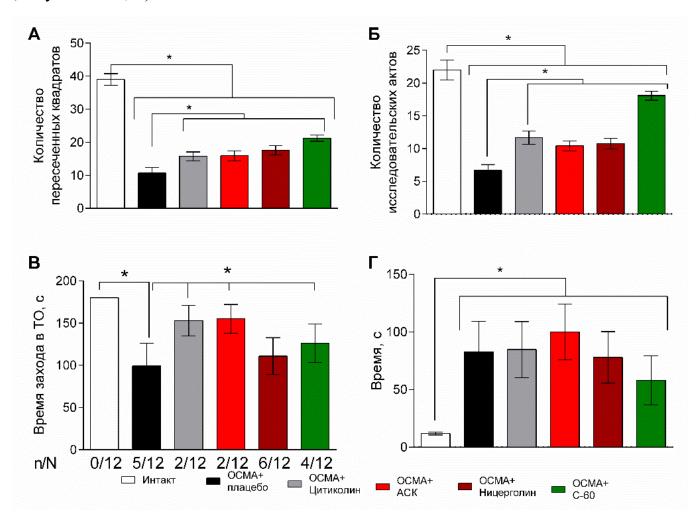


Рисунок 24. Влияние исследуемых веществ на двигательную (A), ориентировочно-исследовательскую (Б) активности в тесте Открытое поле, латентный период захода в темный отсек установки УРПИ (В) и латентный период решения экстраполяционной задачи в ТЭИ (Г) у животных с ОСМА

Примечание: n- количество животных, зашедших в темный отсек, N- количество животных в группе \*-p<0.05- различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна).

Оценку влияния исследуемых препаратов на сохранность памятного следа после моделирования ОСМА были проведены тесты УРПИ и ТЭИ. Формирование

и проверку выработки условного рефлекса пассивного избегания в тесте УРПИ и навыка решения экстраполяционной задачи в тесте ТЭИ проводили за 24 часа до моделирования ОНМК. Все животные, включенные в исследование, при воспроизведении навыков до операции не заходили в темный отсек с электродным полом (в тесте УРПИ) и быстро решали экстраполяционную задачу (в ТЭИ).

Сохранность памятного следа в тестах УРПИ и ТЭИ оценивали через 3 дня после моделирования ОСМА. У животных, которым вводили плацебо, отмечали выраженные когнитивные нарушения — значительное количество крыс зашли в темный отсек (5 из 10) и сделали это быстрее, чем в других группах, также животные этой группы дольше интактных решали экстраполяционную задачу. Все интактные крысы избегали посещения темного отсека в тесте УРПИ и быстрее всех решали экстраполяционную задачу в ТЭИ.

У животных с ОСМА и которым курсом вводили Цитиколин, ацетилсалициловую кислоту или С-60 латентный период захода в темный отсек установки УРПИ был значительно и статистически значимо выше (p<0,05), чем у тех, которым вводили плацебо, что свидетельствует о лучшей сохранности памятного следа об электро-болевом раздражении, полученном при обучении (Рисунок 24 В). Скорость решения экстраполяционной задачи у всех животных с ОСМА статистически значимо не различалась (Рисунок 24 Г).

Полученные результаты указывают на наличие выраженных церебропротективных свойств у соединения С-60, которое проявилось в его выраженном влиянии на показатели неврологического дефицита, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных и их памяти (в тесте УРПИ) у животных с ОСМА.

Уровень мозгового кровотока у интактных крыс был значимо выше, чем у тех, которым смоделировали ОСМА и в течение последующих 3 дней вводили плацебо. В группах, которым вводили исследуемые вещества, статистически значимо не отличался от показателей крыс с ишемией. Как и в предыдущей серии

экспериментов, выраженность эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных оценивали по степени эндотелийзависимой стимулированной и базальной секреции оксида азота (NO) (Рисунок 25 A).

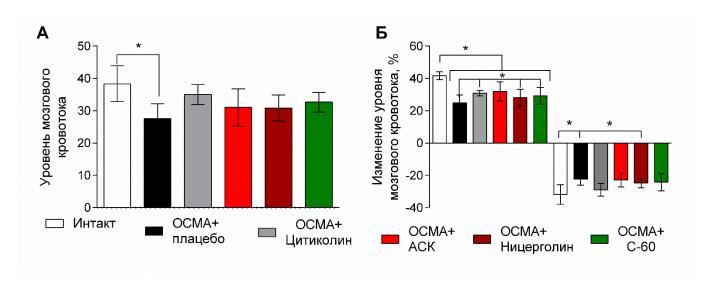


Рисунок 25. Влияние исследуемых веществ на уровень ЛМК (A) в проекции средней мозговой артерии после ОСМА на фоне введения исследуемых соединений и его изменения в ответ на введение АХ или L-NAME (Б)

Примечания: \*-p<0.05 — различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений).

Эндотелийзависимую стимулированную и базальную секрецию NO оценивали по относительному изменению мозгового кровотока в бассейне СМА после введения стимулятора синтеза NO – AX или ингибитора – нитро-Lаргинина (L-NAME)).

В группе интактных животных после введения АХ и L-NAME отмечалось выраженное изменение мозгового кровотока: он повышался на 41% и снижался на 36%, соответственно, напротив, в группе, которым давали плацебо, введение модификаторов синтеза NO приводило к значительно менее выраженному

изменению мозгового кровотока: он повышался всего на 22% и снижался только на 20%, соответственно.

В группах, которым течение 3 дней вводили Цитиколин, C-60.ацетилсалициловую кислоту, Ницерголин или наблюдали выраженную и статистически значимую, по сравнению с контрольной группой (p<0,05), реакцию в ответ на введение АХ, что указывает на меньшее проявление эндотелиальной дисфункции у этих животных.

При оценке базальной секреции NO, отмечено, что у интактных животных и тех, которым вводили Ницерголин, кровоток снижался более выраженно и статистически значимо по сравнению с животными, которым вводили плацебо (p<0,05) (Рисунок 25 Б).

# 5.3. Изучение влияния соединения C-60 на психоэмоциональный статус животных с ишемией головного мозга, смоделированной методом стенозирования общих сонных артерий

Животные, которым стенозировали ОСА и тем самым смоделировали хроническое нарушение мозгового кровообращения и затем в течение 14 дней вводили Цитиколин, Ницерголин или С-60, быстрее обнаруживали инородный предмет, закрепленный на передних лапах (Рисунок 26 A). Животные с ишемией и те, которым вводили Ницерголин, АСК или С-60, статистически значимо (р<0,05) справлялись с данной задачей быстрее контрольных (которым вводили плацебо, (Рисунок 26 Б). Также животные, которым вводили ацетилсалициловую кислоту или соединение С-60, статистически значимо (р<0,05) дольше контрольных (вводили плацебо) держались на стержне установки Ротарод (Рисунок 26 В).

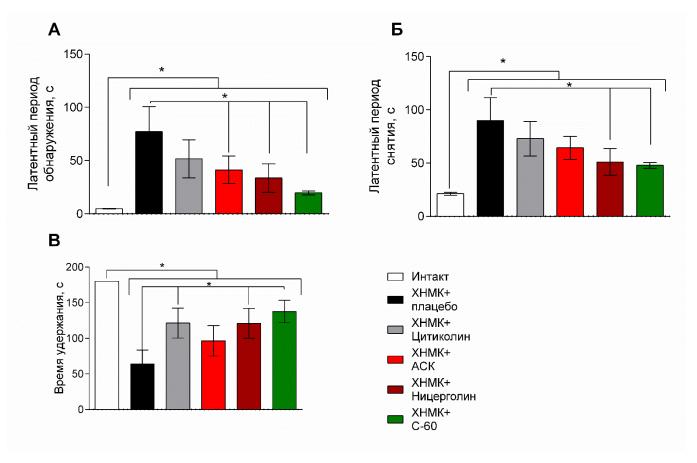


Рисунок 26. Влияние исследуемого вещества на латентный период обнаружения инородного предмета, закреплённого на ладонной поверхности передних лап в адгезивном тесте (A), латентный период его снятия (Б) и удержание на вращающемся стержне (В) у животных со стенозом общих сонных артерий

Примечание: \* — p<0,05 — различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

Всем животным, которым смоделировали стеноз ОСА и через 40 дней начали вводить исследуемые вещества, были значительно менее активными в тесте «Открытое поле». Так, показатели их двигательной и ориентировочно-исследовательской активности были статистически значимо ниже, чем у животных, которым вводили плацебо (р<0,05). Значения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у животных, которым в течение

14 дней курсом вводили Цитиколин, Ницерголин, АСК или С-60, были статистически значимо выше, чем у тех, которым вводили плацебо (p<0,05, Рисунок 27 А, Б). Животные этих групп статистически значимо дольше контрольных (плацебо) не заходили в темный отсек установки УРПИ и быстрее решали экстраполяционную задачу в ТЭИ (p<0,05, Рисунок 27 В, Г).

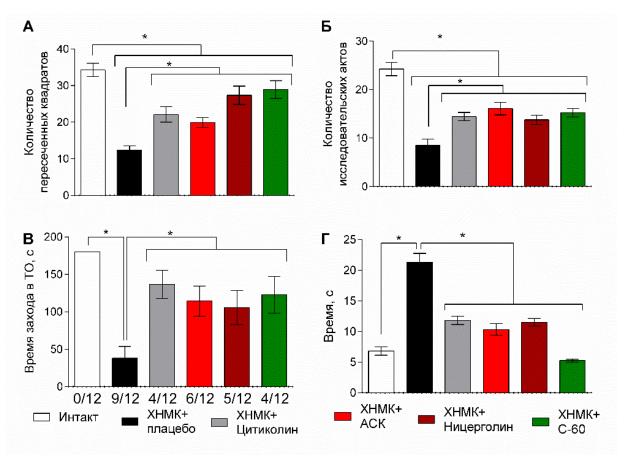


Рисунок 27. Влияние исследуемых веществ на двигательную (A), ориентировочно-исследовательскую (Б) активности в тесте «Открытое поле», латентный период захода в темный отсек установки УРПИ (В) и латентный период решения экстраполяционной задачи в ТЭИ (Г) у животных со стенозом ОСА

Примечание:  $n - \kappa$ оличество животных, зашедших в темный отсек,  $N - \kappa$ оличество животных в группе \*-p<0.05- различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна).

Уровень мозгового кровотока у животных со стенозом ОСА определяли через 40 дней после его моделирования и 14 дней перорального введения исследуемых веществ (общая продолжительность стеноза составила 54 дня). Было отмечено, что у всех прооперированных животных скорость мозгового кровотока была статистически значимо ниже (р < 0,05), чем у интактных (Рисунок 28 A), а у тех животных, которым курсом вводили ацетилсалициловую кислоту или соединение С-40 скорость мозгового кровотока была статистически значимо (р < 0,05) выше, чем у тех, которым вводил плацебо (Рисунок 28 A).

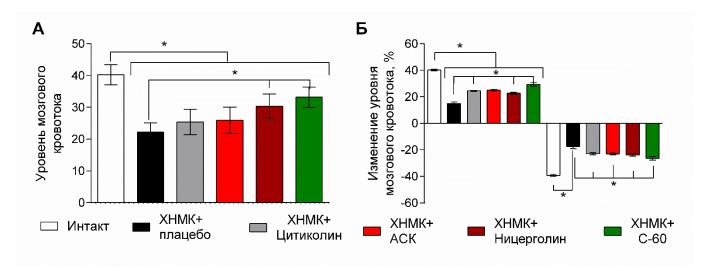


Рисунок 28. Влияние исследуемых веществ на уровень ЛМК (A) в проекции средней мозговой артерии после стеноза ОСА на фоне введения исследуемых соединений и его изменения в ответ на введение АХ или L-NAME (Б)

Примечание: \* — p<0,05 — различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений).

При оценке вазодилатирующей функции эндотелия у животных со стенозом ОСА было отмечено, что уровень базальной и стимулируемой секреции NO у всех прооперированных животных статистически значимо ниже, чем у интактных (р<0,05, Рисунок 28 Б). Но у животных со стенозом ОСА и которым в течение 14 дней вводили Ницерголин, Цитиколин, ацетилсалициловую кислоту (только в

ответ на введение L-NAME) или соединение С-60, вазодилатация или вазоконстрикция в ответ на введение АХ или, соответственно, L-NAME были статистически значимо более выраженными, чем у тех, которым вводили плацебо (p<0,05, Рисунок 28 Б).

#### 5.4. Заключение

Выполненное исследование показало, что новое производное гидроксибензойных кислот, соединение под лабораторным шифром С-60, оказывает выраженное церебропротективное действие в условиях острых (ООСА или ОСМА) и хронического (стеноз ОСА) нарушений мозгового кровообращения. Соединения С-60 на уровне препаратов — Цитиколин, Ницерголин или ацетилсалициловая кислота снижает тяжесть психоневрологических последствий ишемии головного мозга, способствует меньшему падению уровня ЛМК и менее выраженной эндотелиальной дисфункции.

Учитывая химическую структуру соединения С-60 (производное гидроксибензойных аминокислот), его церебропротективные эффекты могут быть связаны с антиагрегантными, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. Данное предположение основывается на химической структуре соединений и её сходстве с салициловой кислотой, для которой характерны обозначенные эффекты.

#### ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ **C-60** HA ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ дефицит, **НЕКОТОРЫЕ** ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОСТАЗА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ У **ХРОНИЧЕСКИМ** НАРУШЕНИЕМ КРЫС $\mathbf{C}$ **МОЗГОВОГО** КРОВООБРАЩЕНИЯ

Основной причиной смерти и инвалидности во всем мире является инсульт. В последние годы были получены новые данные в области профилактики и лечения, позволившие добиться снижения смертности от острых нарушений мозгового кровообращения (Spence J.D., 2020; Del Brutto V.J., Rundek T., Sacco R.L., 2022). Риск смерти особенно высок в первые 30 дней после начала инсульта и составляет от 3% до 20%, выжившие пациенты сталкиваются с большим риском развития других состояний, таких как сердечные приступы, инвалидность и физические недостатки, низкое качество жизни, депрессия, снижение когнитивных функций и деменция. Несмотря на прогресс и тенденции к снижению заболеваемости, рецидивирующие инсульты остаются одной из острых проблем современной медицины. Их частота составляет: от 7–20% через 1 год до 16–35% через 5 лет. Основная цель стратегий вторичной профилактики после ИИ или транзиторной ишемической атаки – снизить риск повторного инсульта, обеспечить условия для максимальной эффективности вторичной профилактики, снижение факторов риска рецидива и смерти (Zhang Y., Chen Y., Ma L., 2018).

Важную роль при лечении ИИ играет антитромботическая терапия, которая предупреждает развитие атеротромбоза. После острого приступа, длительная антитромботическая терапия необходима с целью вторичной профилактики рецидивов и осложнений инсульта. Текущие рекомендации Американской ассоциации инсульта сосредоточены, в первую очередь, на применении аспирина для вторичной профилактики инсульта у пациентов с сосудистыми событиями, такими как ИИ некардиоэмболической причины или транзиторная ишемическая атака. Данный вид антиагрегантной терапии, помимо подавления острого

артериального тромбоза, нарушает физиологический гемостаз (Florescu C. et al., 2019).

Исследования, проводимые на животных, считаются моделями с самым высоким трансляционным потенциалом результатов фундаментальных наук в клиническую практику. Доклинические исследования на животных моделях играют важную роль в понимании патофизиологии и раскрытии новых терапевтических возможностей терапии ИИ. За последние десятилетия было разработано несколько экспериментальных моделей инсульта, которые в максимальной степени сходны с этапами течения заболевания у человека, а применение современных инструментов диагностики и оценки эффективности терапии позволяют повысить научную ценность исследовательских проектов и их трансляционный потенциал, предоставляя учёным четкие и убедительные доказательства. Всё это может помочь в разработке новых нейропротективных препаратов (Narayan S.K. et al., 2021).

На основе изложенных в литературе данных была выбрана и реализована данная модель эксперимента — дизайн исследования представлен ниже (Рисунок 29).

Эксперимент проводили на 50 здоровых половозрелых крысах-самцах линии Wistar (массой 250-350 г), одинаковой возрастной группы с экспериментальным НМК.

Моделирование НМК проводили поэтапно методом билатеральной ООСА. Данная модель была выбрана с целью отслеживания восстановительной динамики в период между операциями, а также для снижения уровня летальности прооперированных животных. Вначале выполняли необратимую ООСА левой сонной артерии, а через год – правой, после чего у животных провели:

1. оценку поведения животных в стандартных психофармакологических тестах: ориентировочно-исследовательскую активность определяли в тесте ОП, пространственную память и процесс обучения в водном лабиринте Морриса, моторную координацию и сопротивляемость усталости в тесте «Ротарод»,

одностороннее координационное неврологическое повреждение в Адгезивном тесте, когнитивную функцию оценивали по изменению латентного периода захода в темный отсек установки УРПИ;

- 2. оценку сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза определяли по: функции тромбоцитов АДФ-индуцированная агрегация, способность крови формировать сгусток за определенное время (определяли по протромбиновому времени по Квику (c)); скорости превращения фибриногена в фибрин под действием тромбина (тромбиновое время (c)); формированию тромба (показатель фибриногена (г/л));
- 3. оценку эндотелийзависимых реакций пиальных сосудов проводили, используя тесты с индометоцином, АХом и L-NAME.

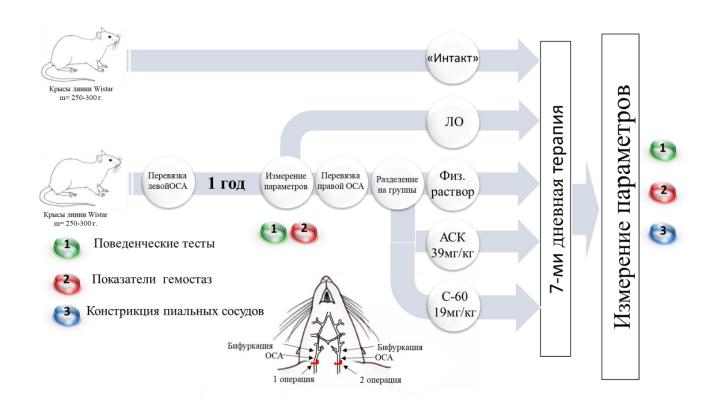


Рисунок 29. Дизайн исследования оценки влияния соединения C-60 на психоневрологический дефицит, некоторые показатели гемостаза и эндотелиальную функцию у крыс с XHMK

## 6.1. Влияние соединения С-60 на поведение животных на модели ХНМК в постишемический период

В ходе эксперимента было установлено, что у животных, которым вводили исследуемое соединение, двигательная и ориентировочно-исследовательская активности в тесте «Открытое поле» были достоверно выше, чем у крыс, которым вводили плацебо. Значение показателя двигательной активности было выше в 2 раза для группы С-60 и 2,3 раз в группе АСК. Ориентировочно-исследовательская активность была выше в 2,4 раза для группы С-60 и в 2,5 раз в группе АСК. Сравнение проводили с группой контрольных животных (р<0,05; Рисунок 30).

В тесте водный лабиринт «Морриса» время нахождения платформы крысами, которым вводили С-60 или АСК, было меньше на 33% и на 46%, соответственно, по сравнению с группой контрольных животных (p<0,05), что свидетельствует о лучшем состоянии памяти (Рисунок 31).

В адгезивном тесте у животных, которым вводили исследуемое соединение или препарат сравнения, время, затраченное на обнаружение, было на 47% (С-60) и на 40% (АСК) меньше, чем у тех, которым вводили плацебо, а также время, затраченное на снятие инородного предмета с ладонной поверхности передних лап, на 27% у животных группы С-60 и на 24% у АСК меньше по сравнению с группой контрольных животных (р<0,05, критерий Данна), что свидетельствует о лучшем состоянии когнитивной и сенсорно-моторных функций мозга (Рисунок 32 А, Б).

В тесте «Ротарод» животные до момента первого падения держались дольше (в 3 раза (С-60) и 5 раз (АСК) по сравнению с группой контрольных животных, р<0,05), что свидетельствует о лучшей моторной координации этих крыс и большей их сопротивляемости усталости (Рисунок 32 В).

В тесте УРПИ ни одна крыса, которым вводили С-60, не вошла в темный отсек и только одна из группы АСК вошла, что свидетельствует о лучшем состоянии когнитивных функций у крыс этой группы (Рисунок 32 Г).

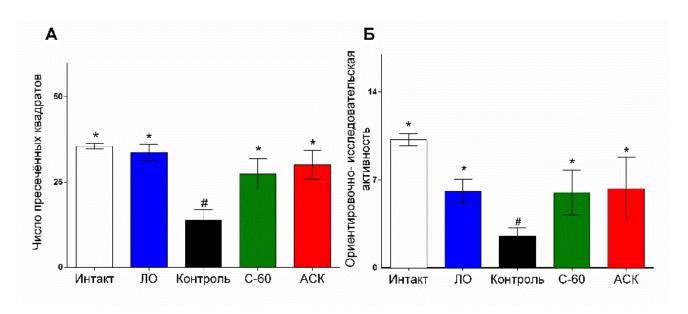


Рисунок 30. Влияние соединения C-60 на показатели двигательной (A) и ориентировочно-исследовательской активности (Б) в тесте «Открытое поле»

Примечание: \*-p<0.05- различия достоверны по сравнению с контрольной группой, #-p<0.05- различия статистически значимы по отношению к интактной группе (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

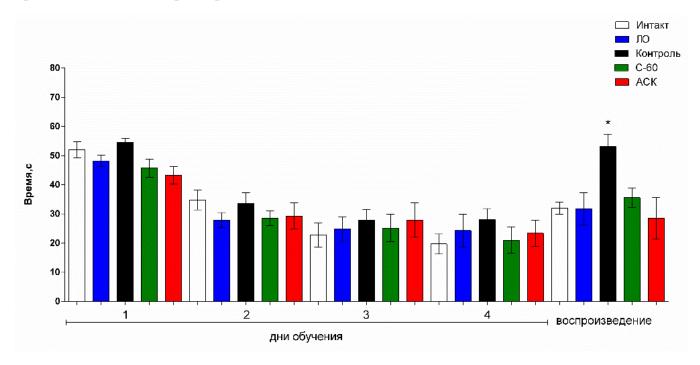


Рисунок 31. Оценка пространственной памяти и процесса обучения

Примечание: \*-p<0.05- различия достоверны по сравнению с контрольной группой (критерий Данна)

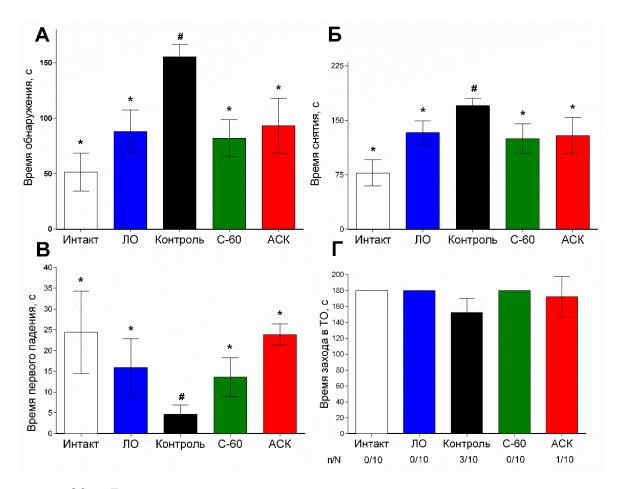


Рисунок 32. Влияние исследуемого вещества на латентный период обнаружения инородного предмета, закреплённого на ладонной поверхности передних лап в адгезивном тесте (A), латентный период его снятия (Б), удержание на вращающемся стержне (В), латентный период захода в темный отсек установки УРПИ (Г).

Примечание: \*-p<0.05 — различия достоверны по сравнению с контрольной группой, #-p<0.05 — различия статистически значимы по отношению к интактной группе, n — колличество животных, зашедших в темный отсек, N — количество животных в группе (критерий Данна).

# 6.2. Анализ влияния соединения С-60 на показатели гемостаза на модели хронического нарушения мозгового кровообращения

Степень агрегации тромбоцитов у животных контрольной группы составила  $47,4\pm2,4$ , что на 29% (p<0,05) больше, чем у интактных. Введение

соединения C-60 статистически значимо снижало степень агрегации тромбоцитов на 37% (p<0,05) в сравнении с контрольной группой. Ацетилсалициловая кислота уменьшала этот показатель на 41% (p<0,05) по сравнению с контрольной группой и на 24% (p<0,05) по сравнению с показателями интактных животных (Рисунок 33 A).

Протромбиновое время в крови животных контрольной группы составило  $26,4\pm1,8$  (p<0,05), что на 57% больше, чем у интакных. Полученные данные свидетельствуют TOM, что В постишемический период наблюдается гиперкоагуляция, что может косвенно указывать на снижение активности факторов свертывания крови зависящих от витамина К. Протромбиновое время (ПВ) характеризует скорость образования тромбина (2 фаза свёртывания), удлинение этого показателя является маркером наличия в крови непрямых антикоагулянтов и (или) дефицита витамина К – зависимых свертывания (II, VII, IX, X). Соединение С-60 снижает ПВ на 19% (p<0,05) в сравнении с контрольной группой и этот показатель был на 30% (p<0,05) больше, чем у интакных животных. Препарат сравнения АСК уменьшал ПВ на 23% (p<0,05) в сравнение с контрольной группой (Рисунок 33 Б).

Тромбиновое время контрольной группы животных составило  $42,3\pm0,8$  (p<0,05), что на 20% меньше, чем у интактных. Полученные данные свидетельствуют о повышенном риске тромбообразования в данной группе. Соединение C-60 увеличивает ТВ на 9% (p>0,05) по отношению к контрольной группе животных, что на 20% (p<0,05) было ниже, чем у интактных. На фоне введение препарата сравнения АСК ТВ было выше на 12% (p<0,05) по отношению к контрольной группе и на 10% меньше, чем у интактных (Рисунок 33 В).

Концентрация фибриногена у животных контрольной группы составила  $3.5\pm0.1$  г/л (p<0.05), что на 58% выше, чем у интактных. Увеличение уровня содержания фибриногена в постишемическом периоде и возрастание протромбинового времени, указывают на гипокоагуляционные сдвиги в системе

свертывания крови и могут свидетельствовать об активации воспалительного процесса в результате развития оксидативного стресса. На фоне введения соединения С-60 этот показатель был на 18% (p<0,05) меньше по отношению к контрольной группе и на 30% (p<0,05) больше, чем у интакной. В группе, которой вводили АСК, этот показатель был на выше 20% (p<0,05), чем у контрольных (Рисунок 33  $\Gamma$ ).

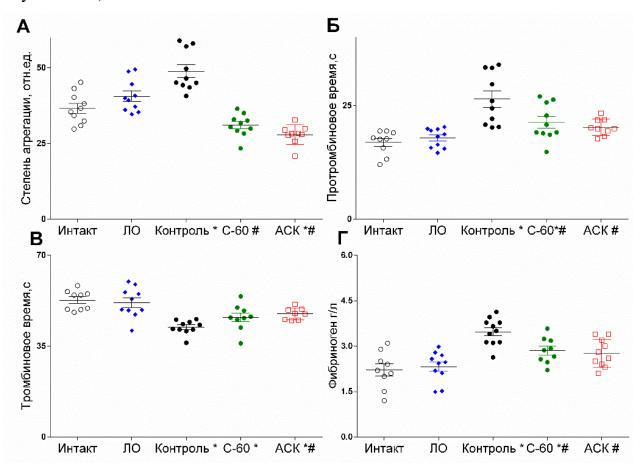


Рисунок 33. Оценка показателей гемостаза в постишемический период

Примечание: Тромбоцитарный гемостаз: A — оценка AД $\Phi$ -индуцированной агрегации тромбоцитов; Коагуляционный гемостаз B — оценка  $\Pi B$ , c; B — оценка T B, c;  $\Gamma$  — концентрация фибриногена c/n;\* — p<0,05 — изменения статистически значимы по отношению к интакту, # — p<0,05 изменения статистически значимы по отношению к контролю. (критерий Манна-Уитни)

## 6.3. Исследование влияния соединения С-60 на простациклин-синтезирующую и вазодилатирующую функции эндотелия на модели ХНМК

Для анализа простациклин-синтезирующей активности эндотелия сосудов в постишемическом периоде мы проводили пробу с индометацином (Рисунок 34).

Площадь пиальных сосудов для интактной группы после их орошения индометацином уменьшалась в среднем на  $51,1\pm2,2\%$ , при в/в АХ данный показатель увеличился на  $57,7\pm3,3\%$ , а при введении L-NAME уменьшился на  $53,7\pm1,6\%$ .

У животных контрольной группы после орошения индометацином площадь пиальных сосудов увеличилась на 29% (p<0,05), при в/в АХ снизилась на 25 % (p<0,05), а при в/в L-NAME на 43 % (p<0,05) по сравнению с интактной группой.

У животных, которым курсом вводили соединения С-60, после орошения индометацином площадь сосудов была на 25% меньше, чем у интактных (p<0,05) или на 42% больше, чем у контрольных (p<0,05); после введения АХ на 25% меньше, чем у интактных (p<0,05) и на 58% больше, чем у контрольных (p<0,05); после введения L-NAME на 33% меньше чем у интактных (p<0,05) и на 16% больше, чем у контрольных животных (p>0,05).

При курсовом введении соединения АСК у животных после орошения индометацином площадь сосудов была на 28% меньше, чем у интактных (p<0,05) и на 44% больше, чем у контрольных (p<0,05); после введения АХ на 17% меньше, чем у интактных (p<0,05, интактных животные) и на 75% больше, чем у контрольных (p<0,05); после введения L-NAME на 35% меньше, чем у интактных (p<0,05) и на 13% больше, чем у контрольных (p>0,05).

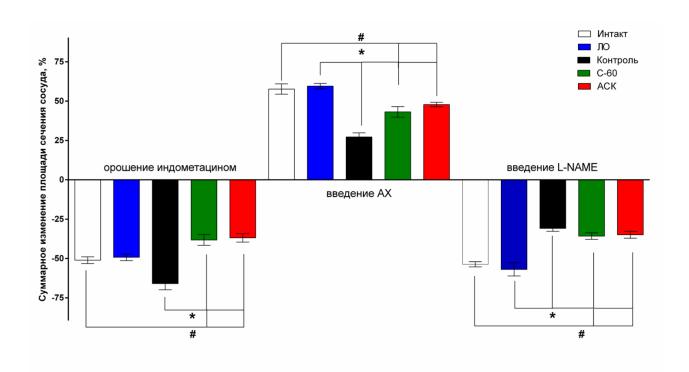


Рисунок 34. Влияние С-60 на изменения суммарной площади сечения сосудов у крыс в постишемический период на 7 дней лечения (М±т) после их орошения индометоцином или внутривенного введения АХ, L-NAME (относительные значения)

Примечание: \* — p<0,05 — изменения статистически значимы по отношению к интакту (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

## 6.4. Заключение

Курсовое 7-дневное введение соединения С-60 оказывает выраженное церебропротективное действие, повышает эндотелийзависимую вазодилатацию мозговых сосудов, улучшает поведенческую активность и снижает тяжесть психоневрологических нарушений у животных с ХНМК, положительно влияет на показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза.

### ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Патологические состояния, связанные cповышенной агрегацией тромбоцитов, являются одной ИЗ основных причин заболеваемости, инвалидизации и смертности людей в большинстве стран мира. Актуальной задачей и одним из приоритетных направлений современной фармакологии является поиск и разработка новых эффективных и безопасных антиагрегантов.

Тромбоциты играют важную роль в гемостазе, их основная функция – остановка кровотечения после повреждения сосудов путем быстрого связывания в участке нарушения целостности эндотелия и образования тромба. Являясь основным фактором первичного гемостаза, тромбоциты участвуют в процессах адгезии, агрегации, уплотнения и секреции. Однако активированные тромбоциты также образуют агрегаты во время эрозии или разрыва атеросклеротической бляшки, стимулируя образование тромба способствуя И тяжелым атеротромботическим заболеваниям, таким как острая ишемия конечностей или инфаркт миокарда, а также имеют решающее значение при тромбозах, в том числе провоцирующих ИИ. Новые данные указывают на пагубную роль тромбоцитов не только в контексте нейроваскулярного тромбоза, но и в других нейровоспалительных состояниях (Rawish E. et al., 2020). Учитывая тяжесть этих заболеваний и низкое качество жизни пациентов после перенесённого ИИ, существует острая потребность в разработке новых терапевтических агентов.

Один из путей создания новых лекарственных препаратов молекул. Химическая модификация дериватизация известных позволяет уменьшить терапевтическую дозу, снизить риски развития побочных эффектов, а свойства существующих также выявить новые соединений. Металлорганические, антрахиноновые или производные гидроксибензойных кислот с коричным альдегидом, проявляют различные виды противоопухолевой активности (рак желудка, колоректальный, поджелудочной железы) (Lu S., Obianom O.N., Ai Y., 2018; Kowalski K., 2019; Lin S. et al., 2021). Синтезированные галогенированные соединения азо-аспирина проявляют антибактериальную активность (Yang X. et al., 2020).

Активно ведутся разработки новых лекарственных форм, которые предупреждают развитие побочных эффектов. Так, измельченный вместе с коллагеном АСК обладает такой же эффективностью, как и стандартный пероральный препарат, в подавлении агрегации тромбоцитов, но с меньшим раздражающим действием в отношении слизистых оболочек ЖКТ (Mollace V. et al., 2017). Также ведутся разработки различных коньюгатов АСК с жирными эйкозапентаеновая более кислотами (линолевая, И др.) ДЛЯ высокой проницаемости через клеточные мембраны, которые, являясь ингибиторами агрегации тромбоцитов, устраняют побочные эффекты аспирина (Roy J. et al., 2016).

Ha основании обзора литературных кафедре данных на химии Волгоградского государственного медицинского университета были синтезированы 14 новых солевых форм производных гидроксибензойных кислот. По химической структуре производные гидроксибензойных кислот, условно разделили на 4 группы согласно химической структуре с различными радикалами: производные с ГАМК, глицином, морфолином и таурином.

Скрининг наиболее активных соединений в ряду новых производных гидроксибензойных кислот был проведен на основе определения их антиагрегантных свойств на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*.

В качестве препарата сравнения выбрали АСК как широко используемый антиагрегант с большой доказательной базой. Данное соединение также является структурным аналогом исследуемых.

Оценка антиагрегантных свойств производных гидроксибензойных кислот позволила выявить 4 соединения лидера под лабораторными шифрами: С-10, С-24, С-60 и С-61. Данные соединения эффективно подавляли функциональную активность тромбоцитов. Для данных соединений определили показатели острой

суточной токсичности и дозозависимой активности. Полученные результаты были выше, чем у АСК – по острой суточной токсичности – С-10 в 12 раз, С-24 в 14 раз, С-60 в 8 раз и С-61 в 10 раз.

Соединения под лабораторными шифрами С-60 и С-61 были активны в дозах в 2,1 и 1,7 раза меньше, чем АСК, что позволяет сделать вывод, о том, что данные производные гидроксибензойных кислот обладают большей активностью, чем референтный препарат.

Исследованные производные гидроксибензойных кислот в различной степени проявляли антиагрегантный эффект, что, очевидно, является следствием их родоначальной структуры. Их химическая модификация позволила в значительной степени повысить «целевую» активность и снизить эффективную дозу.

Анализ влияния заместителей на антиагрегантную активность позволил установить важную роль АК глицина или таурина, а также ионов натрия и калия в антиагрегантном действие изучаемых соединений.

Все изученные в работе производные гидроксибензойных кислот ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*, различаясь выраженностью эффекта.

Тромбозы часто вызывают инфаркт, ИИ, сосудистые осложнения сахарного диабета, снижают результативность хирургического лечения ИБС (Hagedom I., Vogtle T., Nieswandt B., 2010). В артериях они формируются при повреждении сосудистой стенки их структуру составляют в основном тромбоциты, связанные между собой нитями фибрина (белые тромбы). Тромбин (главный медиатор активации тромбоцитов и превращения фибриногена в фибрин) определяет тактику патогенетической терапии артериальных тромбов, а именно применение антиагрегантов. Поэтому, в своих исследованиях, мы стараемся придерживаться комплексного подхода И определения антитромботической активности соединений на моделях артериального тромбоза, индуцированного нанесением на сосуд 50% раствора FeCl<sub>3</sub> или воздействия электрического тока.

Модель тромбоза, индуцированного нанесением 50% раствора FeCl<sub>3</sub> вызывает: агрегацию тромбоцитов, образование фибрина и адгезию эритроцитов к эндотелию (Dogne J.M. et al., 2004), а также возникновению реакции Хабера-Вейса (взаимодействие железа с перекисью водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы).

Модель электроиндуцированного артериального тромбоза сонной артерии крысы вызывает изменение электростаического заряда на наружной стороне мембраны клеток, что сопровождается их агрегацией (Emerson G.G., Segal S.S., 2001), также происходит инфильтрация внутренней среды элементами крови, особенно тромбоцитами, запуская тем самым процесс тромбообразования (Potvliege P.R., Bourgain R.H., 1979).

Из 4 соединений лидеров лишь два (С-60 и С-61) примерно в 2 раза увеличивали время наступления полной окклюзии сосуда, т.е. на уровне сопоставимом с данными, полученными от животных, которым вводили препарат сравнения. Это позволяет сделать вывод об их благоприятном и протективном действии на эндотелий.

Ha следующем этапе провели исследования антиагрегантых И антитромботических свойств соединений, моделируя у животных склонность к тромбообразованию. Была выбрана модель стрептозотоцин-никотинамидиндуцированного СД и животные с естественным старением до возраста 3 лет, что соответствует людям старшей возрастной группы. Пожилые и люди с СД2 подвержены потери эластичности сосудов, их ломкости и повреждению эндотелия, что влечет за собой процессы тромбообразования.

Полученные данные в исследованиях антитромботической активности в экспериментах на старых животных и животных с СД подтвердили, что соединения С-10 и С-24 не оказывают выраженного антиагрегантного и антитромботического эффекта как на здоровых животных, так на крысах с экспериментальными моделями нарушений. На основании этого было принято решение об исключении данных соединений из дальнейших исследований.

Соединения C-60 и C-61 проявили сопоставимый с АСК антиагрегантный эффект.

Исследование антитромботической активности у старых животных показало, что соединение С-60 пролонгировало время образования тромба на 25% (р<0,05), по сравнению с контрольной группой и было сопоставимо с эффективностью АСК. У животных с ЭСД соединение С-60 значительно и достоверно увеличивало время образования тромба в сравнении с группами, животным которых вводили плацебо (в 2,6 раза) или АСК (в 1,5 раза). В группе животных, которым предварительно вводили соединение С-61, время образования тромба наступало медленнее (данные статистически достоверны), чем у групп плацебо (в 1,9 раза) и АСК (в 1,2 раза).

Введение С-60 пролонгировало время кровотеченя из хвостовой вены, что свидетельствует об ингибировании агрегации тромбоцитов. Однако, в сравнении с АСК, это показатель под действием соединения С-60 был меньше, что свидетельствует о возможно меньшем побочном действии (кровотечение), чем у препаратов АСК.

Учитывая представленные выше результаты было принято решение, что наиболее перспективным для дальнейшего изучения является соединение под лабораторным C-60.

Разработка методов профилактики и лечения сосудистых деменций относится к числу приоритетных задач современной медицины. Однако существующие на сегодняшний день лекарственные препараты, применяемые для лечения и профилактики дементных нарушений у постинсультных пациентов и/или с ХНМК, не в полной мере удовлетворяют по своей эффективности клиницистов и не позволяют достичь адекватного восстановления данной категории больных. Учитывая полиморбидный характер цереброваскулярных заболеваний и широкий спектр патогенететических факторов, лежащих в основе патологий этих И осложнений: их дементных, сенсомоторных, психоэмоциональных и др. нарушений, для лечения этих патологий необходимы

лекарственные средства с политаргетным механизмом действия и поливалентным спектром нейропсихотропных эффектов. Создание лекарственного средства для предупреждения и лечения снижения когнитивной функции у лиц с острыми и/или ХНМК, в том числе терапии больных, перенесших ишемический или геморрагический инсульты, черепно-мозговую травму, позволит расширить возможности фармакотерапии, дополнив её новым отечественным лекарственным препаратом с оригинальным механизмом действия и повысить эффективность проводимых медико-профилактических мероприятий, направленных на реабилитацию таких пациентов.

Выполненное исследование на моделях острого (ООСА или ОСМА) и хронического (стеноз ОСА) нарушений мозгового кровообращения показало, что новое производное гидроксибензойных кислот, соединение под лабораторным шифром С-60 оказывает выраженное церебропротективное действие. Исследуемое соединение эффективно снижает тяжесть психоневрологических последствий ИИ, способствует меньшему падению мозгового кровотока и менее выраженной эндотелиальной дисфункции, на уровне сопоставимом с отмеченным у препаратов – Цитиколин, Ницерголин или АСК.

В экспериментальной фармакологии актуальной проблемой остается минимизация количества животных и максимальная близость дизайнов к реальным клиническим случаям. Для того, чтобы экспериментальные модели в большей степени соотносились с патофизиологией болезней человека и были бы одинаково с ними восприимчивы к фармакотерапии, следует выполнять исследования в максимальной степени соответствия клиническим (Carson D.S. et al., 2015).

Учитывая современные требования и опираясь на описание клинических случаев, был смоделирован экспериментальный вариант рецидива ИИ у животных с последующей оценкой их состояния по трем группам параметров: сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов), когуаляционный гемостаз (ПВ, ТВ, фибриноген), стандартные

поведенческие тесты (ОП, «адгезивный тест», УРПИ, водный лабиринт «Морриса», Ротород) и изучение влияния на простациклин-синтетическую и вазодилатирующую функции эндотелия крыс через 7 дней после обострения хронической ишемии головного мозга.

Установлено, что рецидив ишемии головного мозга (перевязка второй общей сонной артерии) вызывает изменения механизмов в системе свертывания крови. На 7-й день происходит снижение активности процессов, составляющих внешний каскад системы свертывания крови, что проявляется в увеличении протромбинового времени в группе контрольных животных, и указывает на изменение механизма формирования протромбинкиназной активности, т.е. о гипокоагуляционных сдвигах. Изменения коагуляционного гемостаза сопровождаются увеличением уровня фибриногена, что является показательным при ишемии. Постишемические нарушения в системе гемостаза связаны с изменениями простациклин-синтетической активности эндотелия мозговых сосудов, из-за чего, согласно мнению (Горшкова О.П., Шуваева В.Н., 2018) происходит увеличение площади пиальных.

В проведенном нами исследовании было установлено, что у животных с ишемией головного мозга, наблюдались более выраженные неврологические нарушения (сенсомоторный, когнитивный и поведенческий дефицит), а также ослабленные реакции сосудов на АХ или L-NAME. Курсовое введение соединения С-60 препятствовало развитию выраженого неврологического дефицита (симптомы психоневрологических, мнестических и сенсомоторных нарушений были выражены в меньшей степени).

Таким образом, проведенные комплексные исследования позволили оценить основной (антиагрегантный) и плейотропные (антитромботический, церебро- и эндотелиопротективный) эффекты в условиях приближенных к реальным клиническим случаям. Современные методики синтеза новых соединений помогают модернизировать структуру молекулы, изменить её

физические и химические, а также улучшить фармакологические свойства, уменьшить эффективную дозу и побочные эффекты.

### **ВЫВОДЫ**

- 1. Среди 14 производных гидроксибензойных кислот, для которых проводили исследование антиагрегантной активности *in vitro* в диапазоне концентраций 10<sup>-4</sup> до 10<sup>-8</sup>M, эффектом обладали производное ГАМК С-18, производные с глицином С-9, С-10, С-24, С-40, производные с морфолином С-16, С-18 и производные с таурином С-56, С-58, С-59, С-60, С-61.
- 2. Наиболее выраженный антиагрегантный эффект проявляют натриевая соль и наличие ацетильного радикала в положении 4 (C-10), дикалиевая соль в положении 2 (C-24) с аминокислотой глицин и дикалиевые соли производных с таурином в положении 3 (C-60) и 4 (C-61).
- 3. Эффективная доза соединений составила С-10-83 мг/кг, С-24-105 мг/кг, С-60-19 мг/кг, С-61-23мг/кг; ЛД<sub>50</sub> составила С-10-2920,24 мг/кг (2793,94÷3048,54), С-24-3519,87 мг/кг (3407,60÷3632,14), С-60-2209,98 мг/кг (2209,98÷3232,81), С-61-2441,22 мг/кг (2158,82÷2760,57).
- 4. Соединения С-60 или С-61, по сравнению с плацебо, пролонгировали время окклюзии сонной артерии на 73% (p<0,05) и 68% (p<0,05) на модели артериального тромбоза индуцированного хлоридом железа, и на 72% (p<0,05) и 76% (p<0,05) на модели тромбоза, вызванного электрическим током.
- 5. У животных с преморбидным фоном (старение или ЭСД), которым вводили С-60 или С-61, степень агрегации тромбоцитов была меньше на 13-15% (p<0,05) и на 13-18% (p<0,05) соответственно ниже, чем у тех, которым вводили плацебо, при этом оказываемый эффект был сопоставим с АСК.
- 6. После введения соединений С-60 и С-61 время образования тромба у животных с преморбидным фоном (старение или ЭСД) увеличивалось на 25% (p<0,05) или 10% (p<0,05) и на 78% (p<0,05) или 50% (p<0,05), соответственно. Продолжительность кровотечения после введения С-60 уменьшалась на 26% (p<0,05), по сравнению с показателями животных, которым вводили АСК.
- 7. У животных с острым или хроническим нарушением мозгового кровообращения, которым вводили соединение С-60, двигательная активность,

координация движений, мышечный тонус и состояние эндотелиальной функции были значительно лучше, чем у тех, которым вводили плацебо, что свидетельствует о дополнительном церебропротективном и эндотелиопозитивном действии указанного соединения.

# НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. Целесообразно продолжить синтез и дальнейший поиск соединений с антиагрегантным и антитромбодическими эффектами в ряду производных гидроксибензойных кислот, имеющих в своем составе остаток сульфокислоты таурина.
- 2. Соединение С-60 дикалиевая соль N-(3-гидроксибензоил)таурина является перспективным соединением для дальнейшего доклинического изучения с целью разработки на его основе нового оригинального лекарственного средства с антиагрегантной активностью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Бакулин, Д.А. Психоневрологические нарушения у животных с ишемией головного мозга на фоне сахарного диабета и их коррекция новым агонистом GPR119 и его комбинациями с метформином и цитиколином / Д.А. Бакулин, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019. Т. 63. № 3. С. 96-104.
- 2. Бакулин, Д.А. Церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета: Дисс... канд. мед. наук. Волгоград, 2016. с. 146.
- 3. Бастрыгин, Д.В. Биотрансформация и фармакокинетика морфолинсодержащих лекарственных препаратов / Д.В. Бастрыгин, Г.Б. Колыванов, В.П. Жердев // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2012. № 1. С. 3-17.
- 4. Брель, А.К. N-(ацетилсалицилоил)пиразол, обладающий церебропротекторным действием при недостаточности мозгового кровообращения / А.К. Брель, И.Н. Тюренков, С.В. Лисина [и др.] // Патент на изобретение RU 2632005 C1, 02.10.2017. Заявка № 2016139886 от 10.10.2016.
- 5. Брель, А.К. Применение N-гидроксибензоил хлоридов для получения конъюгатов с биологически активными дипептидами / А.К. Брель, С.В. Лисина, Ю.Н. Будаева // Журнал органической химии. 2021. Т. 57. № 4. С. 517-523.
- 6. Бубнова, М.Г. Аспирин в профилактике атеротромбоза и коронарной болезни сердца / М.Г. Бубнова // Российский кардиологический журнал. 2010. №4. С.115-120.
- 7. Быков, В.В. Антиагрегантная активность и фармакокинетика производного индолинона (экспериментальное исследование): Дисс... канд. мед. наук. Томск, 2020. с. 106.
- 8. Волотова, Е.В. Фармакологическая коррекция нарушений мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции (в эксперименте) : Дисс... докт. мед. наук. Волгоград, 2016. с. 344.
- 9. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия / Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- 10. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых

- фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. С. 308-320.
- 11. Всемирная организация здравоохранения. Сердечно-сосудистые заболевания. 2017. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds) (дата обращения: 22.02.2022).
- 12. Габбасов, В.А. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов *in vitro* / В.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1989. №10. С.437-439.
- 13. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц М.: Практика. 1999. 459 с.
- 14. Горбунова, Ю.В. Психотропная и нейропротективная активность новых производных хиназолина: Дисс... канд. фарм. наук. Волгоград, 2019. с. 183.
- 15. Горшкова, О.П. Влияние постишемических изменений синтетической активности эндотелия на коагуляционный гемостаз / О.П. Горшкова, В.Н. Шуваева // Смоленский медицинский альманах. 2018. № 4. С. 180-183.
- 16. Дайнеко, А.С. Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода / А.С. Дайнеко, А.А. Шмонин, А.В. Шумеева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. − 2014. − Т.13. − № 1. − С.68-78.
- 17. Дедов, И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений / И.И. Дедов // Сахарный диабет. 2013. № 3 (60). С. 4-11.
- 18. Дедов, И.И. Сосудистые поражения головного мозга при сахарном диабете: решенные и нерешенные вопросы / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. T115. № 8. С.79-82.
- 19. Дедов, И.И. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в российской федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021 / Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. [и др.] // Сахарный диабет. 2021. Т. 24. № 3. С. 204-221.
- 20. Зиганшин, А.У. Агонисты и антагонисты Р2У-рецепторов в современной клинической практике / А.У. Зиганшин, О.С. Калинина // Вестник современной клинической медицины. 2017. № 10(1). С. 22-28.
- 21. Зинченко, Ю.В. Применение ривароксабана при восстановлении синусового ритма у больных с трепетанием предсердий / Ю.В. Зинченко, М.Р. Икоркин // Украинский кардиологический журнал. 2016. № 4. С. 87-96.
- 22. Калинская, А.И. Особенности тромбообразования и эндогенного фибринолиза у пациентов с острым коронарным синдромом / А.И. Калинская,

- П.П. Саввинова, Е.Ю. Васильева, А.В. Шпектор // Российский кардиологический журнал. -2018. Т. 23. № 9. С. 12-16.
- 23. Климочкин, Ю.Н. Синтез и оценка психотропной активности каркасных производных альфа-пирролидона / Ю.Н. Климочкин, И.М. Ткаченко, А.Н. Резников [и др.] // Биоорганическая химия. 2021. Т. 47. № 6. С. 823-836.
- 24. Ковалев, Н.С. Психотропная активность адамантовых производных ГАМК и альфа-пирролидона: Дисс... канд. мед. наук. Волгоград, 2021. с. 170.
- 25. Константинова, Е.В. Антиагрегантная терапия острого коронарного синдрома: современные возможности / Е.В. Константинова, М.Ю. Гиляров, Н.А. Шостак, Д.А. Аничков // Клиницист. 2018. Т. 12. № 1. С. 10-16.
- 26. Коптева, Н.И. Химия соединений с морфолиновым циклом. Воронеж: издво воронеж. ун-та. 1991. 140 с.
- 27. Корокин, М.В. 11–аминокислотный пептид, имитирующий структуру а— спирали b эритропоэтина, улучшает функцию эндотелия, но стимулирует тромбообразование у крыс / М.В. Корокин, В.О. Солдатов, А. Титце [и др.] // Фармация и фармакология. 2019. Т. 7. № 6. С. 312-320.
- 28. Косарев, В.В. Клиническая фармакология современных антиагрегантов и их место в фармакотерапии ишемической болезни сердца и ассоциированных состояний / В.В. Косарев, С.А. Бабанов // Русский Медицинский Журнал. 2013. Т. 21. № 27. С. 1378-1383.
- 29. Кубатиев, А.А. Тромбоциты: современный взгляд на структуру и функции / А.А. Кубатиев, Т.Г. Боровая, В.Г. Жуховицкий [и др.] // Патогенез. -2016. Т. 14. № 1. С. 4-13.
- 30. Куркин, Д.В. Влияние наркотизации хлоралгидратом на выживаемость животных при перевязке общих сонных артерий / Д.В. Куркин, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 1. С. 23.
- 31. Куркин, Д.В. Влияние нового агониста рецептора GPR119 соединения ZB-16 на коагуляционный гемостаз крыс при экспериментальном сахарном диабете / Д.В. Куркин, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2016. № 1 (57). С. 48-51.
- 32. Куркин, Д.В. Изменение скорости мозгового кровообращения у крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий / Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, Д.В. Верхоляк [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2017. № 1 (61). С. 36-39.
- 33. Куркин, Д.В. Противодиабетические свойства и некоторые плейотропные эффекты агонистов GPR119 и их комбинаций с гипогликемическими препаратами: Дисс... докт. фарм. наук. Волгоград, 2018. с. 353.

- 34. Лагута, П.С. Ацетилсалициловая кислота при первичной и вторичной профилактике инсульта / П.С. Лагута // Атеротромбоз. 2017. № 1. С. 54-66.
- 35. Лобастов, К.В. Современные представления об этиологии и патогенезе венозного тромбоза: переосмысление триады Вирхова / К.В. Лобастов, Г.И. Дементьева, Л.А. Лаберко // Флебология. 2019. Т. 13. № 3. С. 227-235.
- 36. 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.
- 37. Мазо, В.К. Стрептозотоциновые модели сахарного диабета / В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова, С.Н. Зорин, А.А. Кочеткова // Вопросы питания. 2016. Т. 85. № 4. С. 14-21.
- 38. Малинова, Л.И. Антиагрегантная терапия при остром коронарном синдроме с подъемом сегмента ST в условиях реальной клинической практики: динамика функциональной активности тромбоцитов / Малинова Л.И., Фурман Н.В., Долотовская П.В. [и др.] // Российский кардиологический журнал. 2017. Т. 22. № 1. С. 82-88.
- 39. Мандель, И. Д. Кластерный анализ / И. Д. Мандель. М.: Финансы и статистика, 1988. 176 с.
- 40. Марковчин, А.А. Физиологические особенности тромбоцитов / А.А. Марковчин // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6. URL: https://science—education.ru/ru/article/view?id=16888 (дата обращения: 22.02.2022).
- 41. Мирзоян, Р.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012. С. 478-485.
- 42. Мирзоян, Р.С. Нимодипин и сочетанные нарушения мозгового и коронарного кровообращения в экспериментаз / Р.С. Мирзоян, Н.А. Хайлов, И.Б. Цорин, Т.С. Ганьшина // Эксперим. и клин. фармакол. − 2009. − №2. − С. 24-28.
- 43. Миронов, А.Н. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- 44. Напалков, Д.А. Современная антиагрегантная терапия у пациентов высокого сердечно—сосудистого риска / Д.А. Напалков // Consilium Medicum. 2015. Т. 17 (12). Р. 36-39.

- 45. Новикова, Н.А. Особенности назначения тройной антитромботической терапии с применением ривароксабана у пациентов с фибрилляцией предсердий, перенесших стентирование коронарных артерий / Н.А. Новикова, А.С. Шилова // Атеротромбоз. 2017. № 1. С. 114-121.
- 46. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. М.: Медиасфера. 2006. 312 с.
- 47. Родионова, О.В. Антиагрегантная терапия в профилактике нарушений мозгового кровообращения / О.В. Родионова, В.А. Сорокоумов, Т.В. Вавилова [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 2017. Т. 24. № 1. С. 15-21.
- 48. Рощупкин, Д.И. Избирательность ковалентного действия биохлораминовых антиагрегантов на обогащенную тромбоцитами плазму крови / Д.И. Рощупкин, М.А. Мурина, Н.Н. Кравченко, В.И. Сергиенко // Биофизика. 2007. Т 52. № 3. С. 527-533.
- 49. Рыжикова, О.П. Сравнительная характеристика реактивности пиальных артериальных сосудов у нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс: Дисс... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 2002. с. 144.
- 50. Сонькин, И.Н. Выраженность проявлений посттромботической болезни после применения различных вариантов консервативного лечения тромбоза глубоких вен нижних конечностей / И.Н. Сонькин, Д.В. Крылов, В.Ю. Мельник, А.И. Атабеков // Флебология. 2018 Т. 12. №3. С. 118-122
- 51. Спасов, А.А. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте / А.А. Спасов, В.Ю. Федорчук, Н.А. Гурова [и др.] // Ведомости НЦЭСМП. 2014. №4. С. 39-45.
- 52. Спасов, А.А. Антиагрегантная активность ангипура на моделях артериального и венозного тромбоза / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, В.С. Сиротенко [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021. Т. 84. № 9. С. 20-23.
- 53. Спасов, А.А. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А.А. Спасов, В.И. Петров, Н.И. Чепляева, К.В. Ленская // Вестник Российской Академии медицинских наук. 2013. №2. С. 43-49.
- Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур [и др.] // Биомедицина. 2011. Т.1. №. 3. С. 12-19.
- 55. Тюренков, И.Н. (a) Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий

- дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. T. 115. № 8. C. 061-063.
- 56. Тюренков, И.Н. (б) Коррекция нарушений гемостаза у самок с экспериментальным гестозом с помощью производных ГАМК / И.Н. Тюренков, Л.Б. Иванова, В.И. Карамышева, С.А. Лебедева // Журнал акушерства и женских болезней. 2012. Т. 61. № 4. С. 119-123.
- 57. Тюренков, И.Н. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77. № 9. С.8-12.
- 58. Тюренков, И.Н. Методический подход К оценке эндотелиальной эксперименте / И.Н. Тюренков, дисфункции A.B. Воронков Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2008. — Т. 71. — № 1. — С. 49-51.
- 59. Тюренков, И.Н. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. − 2013. − № 2.− С. 80-84.
- 60. Тянь МинганАнтитромбогенные свойства новых производных индола: Дисс... канд. мед. наук. Волгоград, 2014. с. 180.
- 61. Чазов, Е.И. Пути снижения смертности от сердечно–сосудистых заболеваний / Чазов Е.И. // Терапевтический архив. 2008. № 8. С. 11.
- 62. Чарная, М.А. Современные антиагрегантные препараты и их применение в клинике / М.А. Чарная, Ю.А. Морозов // Болезни аорты и ее путей. 2009. №1. С.34-40.
- 63. Шмонин, А.А. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы / А.А. Шмонин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2011. Т. 10. № 3. С. 68-76.
- 64. Эффекты и механизм действия таурина как лекарственного средства (реферат) // РМЖ. -2020. − Т. 28. № 6. − С. 10-14.
- 65. Alexander, R.W. Signal transduction in vascular smooth muscle / R.W. Alexander, K.K. Griendling // J. Hypertens. Suppl. 1996. Vol. 14. P. S51-54.
- 66. Alphonsus, C.S. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier / C.S. Alphonsus, R.N. Rodseth // The Anaesthesia. 2014. Vol. 69. P. 777-784

- 67. Ashorobi, D. Sickle Cell Trait. / D. Ashorobi, A. Ramsey, S.N.S. Yarrarapu, R. Bhatt // In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021. URL: https://europepmc.org/article/NBK/nbk537130 (дата обращения: 22.02.2022).
- 68. Ashorobi, D. Thrombosis / D. Ashorobi, M.A. Ameer, R. Fernandez // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538430/ (дата обращения: 22.02.2022).
- 69. Badrnya, S. Platelets directly enhance neutrophil transmigration in response to oxidised low-density lipoprotein / S. Badrnya, L.M. Butler, C. Söderberg–Naucler [et al] // Thromb. Haemost. − 2012. − Vol. 108. − № 4. − P. 719-729.
- 70. Baigent, C. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: Collaborative meta–analysis of individual participant data from randomised trials / C. Baigent, L. Blackwell, R. Collins [et al] // Lancet. 2009. Vol. 373. P. 1849-1860.
- 71. Berger, J.S. Low-dose aspirin in patients with stable cardiovascular disease: a meta–analysis / J.S. Berger, D.L. Brown, R.C. Becker // Am. J. Med. 2008. Vol. 121. P. 43-49.
- 72. Betz, H. The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein / H. Betz, C.M. Becker // Neurochem. Int. − 1988. Vol. 13. № 2. P. 137-146.
- 73. Bibbins-Domingo, K. Aspirin use for the primary prevention of cardiovascular disease and colorectal cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement / K. Bibbins-Domingo // Ann. Intern. Med. 2016. Vol. 164. P. 836-845.
- 74. Boehlen, F. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? / F. Boehlen, K.J. Clemetson // Transfus. Med.  $-2001. \text{Vol.} 11. \cancel{N} 06. \text{P.} 403-417.$
- 75. Bohlen, M. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination / M. Bohlen, A. Cameron, P. Metten [et al.] // J. Neurosci. Methods. 2009. Vol. 178. № 1. P. 10-14.
- 76. Born, G. Antiplatelet drugs / G. Born, C. Patrono // Br. J. Pharmacol. 2009. Vol. 147(Suppl. S1). P. S241-S251.
- 77. Bouet, V. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice / V. Bouet, M. Boulouard, J. Toutain [et al.] // Nat. Protoc. 2009. Vol. 4. № 10. P.1560-1564.
- 78. Bowman, L. Effects of aspirin for primary prevention in persons with diabetes mellitus / L. Bowman, M. Mafham, K. Wallendszus [et al.] // N. Engl. J. Med. 2018. Vol. 379. № 16. P. 1529-1539.

- 79. Capodanno, D. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular disease: Latest evidence / D. Capodanno, S. Ingala, D. Calderone, M.J. Angiolillo // Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 2019. Vol. 17. P. 633-643.
- 80. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet. 1996. Vol. 348. № 9038. Р. 1329-1339. URL: https://doi.org/10.1016/s0140–6736(96)09457–3 (дата обращения: 22.02.2022).
- 81. Carson, D.S. Arginine vasopressin is a blood-based biomarker of social functioning in children with autism / D.S. Carson, J.P. Garner, S.A. Hyde [et al] // PLoS One. -2015. Vol. 10.  $\cancel{N}$  $_{2}$  7. P. e0132224.
- 82. Cena, C. Antiinflammatory, gastrosparing, and antiplatelet properties of new NO–donoresters of aspirin / C. Cena, M. L. Lolli, L. Lazzarato [et al] // J. Med. Chem. 2003. Vol. 46. P. 747-754.
- 83. Chamberlain, J.J. Cardiovascular disease and risk management: review of the american diabetes association standards of medical care in diabetes 2018 / J.J. Chamberlain, E.L. Johnson, S. Leal [et al] // Ann. Intern. Med. 2018. Vol. 168. P. 640-650.
- 84. Chattopadhyay, M. Hydrogen sulfide–releasing aspirin inhibits the growth of leukemic Jurkat cells and modulates  $\beta$ –catenin expression / M. Chattopadhyay, N. Nath, R. Kodela [et al] // Leuk. Res. 2013. Vol. 37. P. 1302-1308.
- 85. Chi, C. Vascular smooth muscle cell senescence and age-related diseases: State of the art / C. Chi, D.J. Li, Y.J. Jiang [et al] // Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 2019. Vol. 1865. № 7. P. 1810-1821.
- 86. Chiao, Y.A. Chapter 15 Cardiac aging / Y.A. Chiao, D.F. Dai, R.J. Wessells, P.S. Rabinovitch // Handbook of the Biology of Aging (Ninth Edition), Editors: N. Musi, P.J. Hornsby. Academic Press. 2021. pp. 323-344. URL: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815962-0.00015-9 (дата обращения: 22.02.2022).
- 87. Combs, D.J. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol / D.J. Combs, L.G. D'Alecy // Stroke. 1987. Vol. 18. № 2. P.503-511.
- 88. Das, J. Mechanism of the protective action of taurine in toxin and drug induced organ pathophysiology and diabetic complications: a review / J. Das, A. Roy, P.C. Sil // Food Funct. 2012. Vol. 3. № 12. P. 1251-1264.
- 89. Dautaj, A. Hereditary thrombophilia / A. Dautaj, G. Krasi, V. Bushati [et al] // Acta. Biomed. 2019. Vol. 90(10-S). P. 12044-12046.
- 90. Del Brutto, V.J. 17 Prognosis after stroke / V.J. Del Brutto, T. Rundek, R.L. Sacco // Stroke (Seventh Edition). 2022. P. 207-220. URL:

- https://doi.org/10.1016/b978-0-323-69424-7.00017-х (дата обращения: 22.02.2022).
- 91. Del Campo L. Mechanisms of vascular aging: What can we learn from Hutchinson-Gilford progeria syndrome? / L. Del Campo, M.R. Hamczyk, V. Andrés [et al] // Clin. Investig. Arterioscler. 2018. Vol. 30. № 3. P. 120-132.
- 92. Diener, H.C. Effects of aspirin plus extended–release dipyridamole versus clopidogrel and telmisartan on disability and cognitive function after recurrent stroke in patients with ischaemic stroke in the Prevention Regimen for Effectively Avoiding Second Strokes (PRoFESS) trial: A double–blind, active and placebo–controlled study / H.C. Diener, R.L. Sacco, S. Yusuf [et al] // Lancet Neurol. 2008. Vol. 7. P. 875-884.
- 93. Diener, H.C. MATCH investigators aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): Randomised, double-blind, placebo-controlled trial / H.C. Diener, J. Bogousslavsky, L.M. Brass [et al] // Lancet. 2004. Vol. 364. P. 331-337.
- 94. Ding, Z. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270 / Z. Ding, S. Kim, R.T. Dorsam [et al] // Blood. 2003. Vol. 101. № 10. P. 3908-3914.
- 95. Dinicolantonio, J.J. Meta-analysis of cilostazol versus aspirin for the secondary prevention of stroke / J.J. Dinicolantonio, C.J. Lavie, H. Fares [et al] // Am. J. Cardiol. 2013. Vol. 112. № 8. P. 1230-1234.
- 96. Dobrzyński, M. Tooth development disorders in infants of rat dams exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and protective role of tocopherol and acetylsalicylic acid / M. Dobrzyński, U. Kaczmarek, P. Kuropka [et al] // Pol. J. Vet. Sci. − 2017. − Vol. 20. − № 4):769-778.
- 97. Dogne, J.M. Pharmacological characterization of N-tert-Butyl-N-[2-(4-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-5730, a novel Thromboxane A2 eceptor antagonist and thromboxane synthase ingibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time / J.M. Dogne, J. Hanson, X. Leval [et al.] // J. of Pharmacol. And Exp. Therap. 2004. Vol. 309. № 2. P.498-505.
- 98. Eisele, G. Acetylsalicylic Acid Inhibits Monocyte Adhesion to Endothelial Cells by an Antioxidative Mechanism / G. Eisele, E. Schwedhelm, B. Schieffer [et al] // Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2002. Vol. 43. P. 514-521.
- 99. El Assar, M. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction / M. El Assar, J. Angulo, S. Vallejo [et al] // Front. Physiol. 2012. Vol. 3. P. 132.

- 100. Emerson, G.G. Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries / G.G. Emerson, S.S. Segal // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. − 2001. − Vol. 280. − № 1. − P. H160-167.
- 101. FitzGerald, G.A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists / G.A. FitzGerald // Am. J. Cardiol. 1991. Vol. 68. P. 11B-15B.
- 102. Florescu, C. Antiplatelet therapy in secondary ischemic stroke prevention a short review / C. Florescu, E.R. Mustafa, E.A. Târtea [et al] // Rom. J. Morphol. Embryol. 2019. Vol. 60. № 2. P. 383-387.
- 103. Fowkes, G. Aspirin for Prevention of Cardiovascular Events in a General Population Screened for a Low Ankle Brachial Index: A Randomized Controlled Trial / G. Fowkes, J.F. Price, M.C.W. Stewart [et al] // JAMA. 2010. Vol. 303. P. 841-848.
- 104. Frenette, P.S. Platelet–endothelial interactions in inflamed mesenteric venules / P.S. Frenette, C. Moyna, D.W. Hartwell [et al] // Blood. 1998. Vol. 91. № 4. P. 1318-1324.
- 105. Furie, B. Thrombus formation *in vivo* / B. Furie, B.C. Furie // The American Society for Clinical Investigation. 2005. Vol. 115 (12). P. 3355-3362. URL: https://www.jci.org/articles/view/26987 (дата обращения: 22.02.2022).
- 106. Galley, H.F. Physiology of the endothelium / H.F. Galley, N.R. Webster // Br. J. Anaesth. 2004. Vol. 93. N0 1. P. 105-113.
- 107. Garcia, G.H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation / G.H. Garcia, S. Wagner, K.F. Liu [et al.] // Stroke. − 1995. − Vol. 26. − № 4. − P. 627-634.
- 108. Gaziano, J. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial / J. Gaziano, C. Brotons, R. Coppolecchia [et al] // Lancet. 2018. Vol. 392. P. 1036-1046.
- 109. Ghasemzadeh, M. 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? / M. Ghasemzadeh, E. Hosseini, Z.O. Roudsari, P. Zadkhak // Thromb. Res. 2018. Vol. 163. P.153-161.
- 110. Gotoh, F. Cilostazol stroke prevention study: A placebo—controlled double—blind trial for secondary prevention of cerebral infarction / F. Gotoh, H. Tohgi, S. Hirai [et al] // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2000. Vol. 9. P. 147-157.

- 111. Gouya, G. Antiplatelet treatment for prevention of cerebrovascular events in patients with vascular diseases: a systematic review and meta-analysis / G. Gouya, J. Arrich, M. Wolzt [et al] // Stroke. − 2014. − Vol. 45. − № 2. − P. 492-503.
- 112. Guerrero, A. Antioxidant effects of a single dose of acetylsalicylic acid and salicylic acid in rat brain slices subjected to oxygen-glucose deprivation in relation with its antiplatelet effect / A. Guerrero, J.A. González-Correa, M.M. Arrebola [et al] // Neurosci. Lett. − 2004. − Vol. 358. − № 3. − P. 153-156.
- 113. Guglielmi, G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience / G. Guglielmi, F. Viñuela, J. Dion, G. Duckwiler // J. Neurosurg. 1991. Vol. 75. № 1. P.8-14.
- 114. Hagedom, I. Arterial thrombus formation. Novel mechanisms and targets / I. Hagedom, T. Vogtle, B. Nieswandt // Hemostaseologie. 2010. Vol. 30. № 3. P. 127-135.
- 115. Hawrylowicz, C.M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production / C.M. Hawrylowicz, G.L. Howells, M. Feldmann // J. Exp. Med. − 1991. − Vol. 174. − № 4. − P. 785-790.
- 116. Haybar, H. Platelet activation polymorphisms in ischemia / H. Haybar, E. Khodadi, K. Zibara, N. Saki // Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. 2018. Vol. 18. № 2. P. 153-161.
- 117. Heeschen, C. CAPTURE study investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes / C. Heeschen, S. Dimmeler, C.W. Hamm [et al] // N. Engl. J. Med. 2003. Vol. 348. № 12. P. 1104-1111.
- 118. Heimann, M. Blood collection from the sublingual vein in mice and hamsters: a suitable alternative to retrobulbar technique that provides large volumes and minimizes tissue damage / M. Heimann, H.P. Käsermann, R. Pfister [et al] // Lab Anim. 2009. Vol. 43. № 3. P. 255-260.
- 119. Heinzmann, A.C. Combined Antiplatelet Therapy Reduces the Pro-Inflammatory Properties of Activated Platelets [abstract] / A.C. Heinzmann, D.M. Coenen, T. Vajen [et al] // Res Pract Thromb Haemost. 2021. Vol. 5 (Suppl 2). URL: https://abstracts.isth.org/abstract/combined-antiplatelet-therapy-reduces-the-pro-inflammatory-properties-of-activated-platelets (дата обращения: 22.02.2022).
- 120. Hua, H. Complex roles of the old drug aspirin in cancer chemoprevention and therapy / H. Hua, H. Zhang, Q. Kong [et al] // Med. Res. Rev. -2019. Vol. 39. No 1. P. 114-145.
- 121. Huang, Y. Antitumor and antiangiogenic effects of aspirin–PC in ovarian cancer / Y. Huang, L.M. Lichtenberger, M. Taylor [et al] // Mol. Cancer Ther. 2016. Vol. 15. P. 2894-2904.

- 122. Hundelshausen, P. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium / P. Hundelshausen, R.R. Koenen, M. Sack [et al] // Blood. -2005. Vol. 105. No 3. P. 924-930.
- 123. Ikeda, Y. Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular events in japanese patients 60 years or older with atherosclerotic risk factors / Y. Ikeda, K. Shimada, T. Teramoto [et al] // JAMA. 2014. Vol. 312. P. 2510-2520.
- 124. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edition. 2021. Brussels: IDF, P. 141. www.idf.org/diabetesatlas
- 125. Iqbal, A.M. Antiplatelet medications / A.M. Iqbal, R.A. Lopez, O. Hai // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537062/ (дата обращения: 22.02.2022).
- 126. Ito, T. The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications / T. Ito, S.W. Schaffer, J. Azuma // Amino Acids. 2012. Vol. 42. № 5. P. 1529-1539.
- 127. Jacob, J.N. Glucose–aspirin: synthesis and *in vitro* anti-cancer activity studies / J.N. Jacob, M.J. Tazawa // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. Vol. 22. P. 3168-3171.
- 128. Jauch, E.C. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke / E.C. Jauch, J.L. Saver, H.P. Adams [et al] // Stroke. 2013. Vol. 44. P. 870-947.
- 129. Jin, R. Taurine Reduces tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator)-Induced Hemorrhage and Microvascular Thrombosis After Embolic Stroke in Rat / R. Jin, A.Y. Xiao, S. Liu [et al] // Stroke. 2018. Vol. 49. № 7. P. 1708-1718.
- 130. Jin, R.C. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function / R.C. Jin, B. Voetsch, J. Loscalzo // Microcirculation. 2005. Vol. 12. № 3. P. 247-258.
- 131. Kalgutkar, A.S. Aspirin–like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase–2 / A.S. Kalgutkar, B.C. Crews, S.W. Rowlinson [et al] // Science. 1998. Vol. 280. P. 1268-1270.
- 132. Kambayashi, J. Cilostazol as a unique antithrombotic agent / J. Kambayashi, Y. Liu, B. Sun [et al] // Curr. Pharm. Des. 2003. Vol. 9. № 28. P. 2289-2302.
- 133. Kastrati, I. Anovel aspirin prodrug inhibits NFκB activity and breast cancer stem cell properties / I. Kastrati, V.A. Litosh, S. Zhao, M. Alvarez // BMC Cancer. 2015. Vol. 15. P. 845-856.
- 134. Kernan, W.N. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association / American Stroke Association / W.N. Kernan, B. Ovbiagele, H.R. Black [et al] // Stroke. 2014. Vol. 45. P. 2160-2236.

- 135. Kim, K.J. Antithrombotic Effect of Artemisia princeps Pampanini Extracts *in vitro* and in FeCl3 -Induced Thrombosis Rats / K.J. Kim, M.S. Kim, P.R. Seok [et al] // J. Food Sci. 2019. Vol. 84. № 10. P. 3037-3044.
- 136. Kodela, R. NOSH-aspirin (NBS-120), a novel nitric oxide— and hydrogen sulfide—releasing hybrid has enhanced chemo—preventive properties compared to aspirin, is gastrointestinal safe with all the classic therapeutic indications / R. Kodela, M. Chattopadhyay, C.A. Velázquez—Martínez, K. Kashfi // Biochem. Pharmacol. 2015. Vol. 98. P. 564-572.
- 137. Koizumi, J.Y.Y. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area / J.Y.Y. Koizumi, T. Nakazawa, G. Ooneda // Jpn. J. Stroke. 1986. Vol. 8. P.1-8.
- 138. Kolandaivelu, K. Antiplatelet therapy in coronary heart disease prevention / K. Kolandaivelu, D.L. Bhatt // Cardiol. Clin. 2011. Vol. 29. P. 71-85.
- 139. Kowalski, K. Insight into the biological activity of organometallic acetylsalicylic acid (aspirin) derivatives / K. Kowalski // Chempluschem. 2019. Vol. 84. № 4. P. 403-415.
- 140. Kuge, Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats / Y. Kuge, K. Minematsu, T. Yamaguchi, Y. Miyake // Stroke. 1995. Vol. 26. № 9. P. 1655-1657.
- 141. Kurkin, D.V. Neuroprotective action of Cortexin, Cerebrolysin and Actovegin in acute or chronic brain ischemia in rats / D.V. Kurkin, D.A. Bakulin, E.I. Morkovin [et al] // PLoS One. 2021. Vol. 16. № 7. P. e0254493.
- 142. Kurz, K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride / K.D. Kurz, B.W. Main, G.E. Sandusky // Thromb. Res. 1990. Vol. 15. P.269-280.
- 143. Kwiatek, D. Surface modification of luminescent LnIII fluoride core—shell nanoparticles with acetylsalicylic acid (aspirin): synthesis, spectroscopic and *in vitro* hemocompatibility studies / D. Kwiatek, L. Mrówczyńska, N. Stopikowska [et al] // ChemMedChem. − 2020. − Vol. 15. − № 15. − P. 1490-1496.
- 144. Kwon, H.W. Antiplatelet and antithrombotic effects of cordycepin–enriched WIB–801CE from Cordycepsmilitaris ex vivo, *in vivo*, and *in vitro* / H.W. Kwon, J.H. Shin // BMC Complementary and alternative medicine. 2016. Vol. 16. № 1. P. 508110.
- 145. Langer, H. ADAM 15 is an adhesion receptor for platelet GPIIb–IIIa and induces platelet activation / H. Langer, A.E. May, A. Bültmann, M. Gawaz // Thromb. Haemost. 2005. Vol. 94. № 3. P. 555-561.
- 146. Le Couteur, D.G. A vascular theory of aging / D.G. Le Couteur, E.G. Lakatta // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. − 2010. − Vol. 65. − № 10. − P. 1025-1027.

- 147. Li, T. Age-related cerebral small vessel disease and inflammaging / T. Li, Y. Huang, W. Cai [et al] // Cell Death. Dis. 2020. Vol. 11. № 10. P. 932.
- 148. Lin, S. Preparation of novel anthraquinone—based aspirin derivatives with anticancer activity / S. Lin, Y. Zhang, Z. Wang [et al] // Eur. J. Pharmacol. 2021. Vol. 900. P. 174020.
- 149. Lu, B. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1–deficient mice / B. Lu, B.J. Rutledge, L. Gu [et al] // J. Exp. Med. 1998. Vol. 187. № 4. P. 601-608.
- 150. Lu, S. Novel cinnamaldehyde-based aspirin derivatives for the treatment of colorectal cancer / S. Lu, O.N. Obianom, Y. Ai // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018. Vol. 28. № 17. P. 2869-2874.
- 151. Lusis, A.J. Atherosclerosis / A.J. Lusis // Nature. 2000. Vol. 407. P. 233-241.
- 152. Maezono-Kandori, K. Elevated CA125 is related to stroke due to cancerassociated hypercoagulation / K. Maezono-Kandori, T. Ohara, J. Fujinami [et al] // J Stroke Cerebrovasc Dis. 2021. Vol. 30. № 12. P. 106126.
- 153. Marcinczyk, N. Antithrombotic potential of tormentil extract in animal models / N. Marcinczyk, D. Jarmoc, A. Leszczynska [et al] // Front. Pharmacol. 2017. Vol. 8. P. 534.
- 154. Marcinczyk, N. Multidirectional Effects of Tormentil Extract on Hemostasis in Experimental Diabetes / N. Marcinczyk, A. Gołaszewska, A. Gromotowicz-Poplawska [et al] // Front. Pharmacol. 2021. Vol. 12. 8. P. 682987.
- 155. Masiello, P. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide / P. Masiello, C. Broca, R. Gross [et al.] // Diabetes. 1998. Vol. 47. P. 224-229.
- 156. Mattheolabakis, G. Phospho-aspirin (MDC–22) prevents pancreatic carcinogenesis in mice / G. Mattheolabakis, I. Papayannis, J. Yang [et al] // Cancer Prev. Res. 2016. Vol. 9. P. 624-634.
- 157. McNeil, J.J. Effect of ASA on cardiovascular events and bleeding in the healthy elderly / J.J. McNeil, R. Wolfe, R.L. Woods [et al] // Contemp. Clin. Trials. 2013. Vol. 36. P. 555-564.
- 158. Michalis, H. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options / H. Michalis, P. Stylianos, P. Fragiskos // Cardiovasc Diagn Ther. 2018. Vol. 8 (5). P. 568-580.
- 159. Mollace, V. Aspirin wears smart / V. Mollace, G. Rosano, N. Malara [et al.] // Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother. 2017. Vol. 3. № 4. P. 185-188.

- 160. Moncada, S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators / S. Moncada // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006. Vol. 361. P. 735-759.
- 161. Moreira, H.S. Phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol reverses endothelial dysfunction with ageing in rat mesenteric resistance arteries / H.S. Moreira, G.A. Lima-Leal, J. Santos-Rocha [et al.] // Eur. J. Pharmacol. 2018. Vol. 822. P. 59-68.
- 162. Morris, G.P. A comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice / G.P. Morris, A.L. Wright, R.P. Tan [et al.] // PLoS One. − 2016. − Vol. 11. − № 2. − P. e0148503.
- 163. Narayan, S.K. Preclinical animal studies in ischemic stroke: Challenges and some solutions / S.K. Narayan, S.G. Cherian, P.B. Phaniti [et al.] // Animal Model. Exp. Med. 2021. Vol. 4. № 2. P. 104-115.
- 164. Nassar, T. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells / T. Nassar, B.S. Sachais, S. Akkawi [et al] // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 6187-6193.
- 165. Nemmani, K.V. NO-NSAIDs: gastric-sparing nitric oxide—releasable prodrugs of non—steroidal anti-inflammatory drugs / K.V. Nemmani, S.V. Mali, N. Borhade [et al] // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. Vol. 19. P. 5297-5301.
- 166. Ngaini, Z. Synthesis of halogenated azo-aspirin analogues from natural product derivatives as the potential antibacterial agents / Z. Ngaini, N.A. Mortadza // Nat. Prod. Res. 2019. Vol. 33. № 24. P. 3507-3514.
- 167. Ogawa, H. Investigators Low-Dose Aspirin for Primary Prevention of Atherosclerotic Events in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial / H. Ogawa, M. Nakayama, T. Morimoto [et al] // JAMA. 2008. Vol. 300. P. 2134-2141.
- 168. Ostrowska, M. Stratified Approaches to Antiplatelet Therapies Based on Platelet Reactivity Testing / M. Ostrowska, J. Kubica, P. Adamski [et al] // Front. Cardiovasc. Med. 2019. Vol. 6. P. 176.
- 169. Patrono, C. Role of aspirin in primary prevention of cardiovascular disease / C. Patrono, C. Baigent // Nat. Rev. Cardiol. 2019. Vol. 16. P. 675-686.
- 170. Pereira-Leite, C. Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: a journey toward safety / C. Pereira-Leite, C. Nunes, S.K. Jamal [et al] // Med. Res. Rev. 2017. Vol. 37. P. 802-859.
- 171. Petrikova-Hrebickova, I. The impact of neonatal methamphetamine on spatial learning and memory in adult female rats / I. Petrikova-Hrebickova, M. Sevcikova, R. Šlamberová // Front Behav Neurosci. 2021. Vol. 15. P. 629585.

- 172. Piepoli, M.F. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice / M.F. Piepoli, A.W. Hoes, S. Agewall [et al] // Eur. Heart J. 2016. Vol. 37. P. 2315-2381.
- 173. Potvliege, P.R. Thrombosis induced *in vivo* in the femoral artery of rats. An electron microscopic study of myointimal growth / P.R. Potvliege, R.H. Bourgain // Br. J. Exp. Pathol. 1979. Vol. 60. № 4. P. 382-388.
- 174. Prandoni, P. Venous and arterial thrombosis: two aspects of the same disease? / Prandoni P. // Eur. J. Intern. Med. -2009. Vol. 20. No 6. P. 660-661.
- 175. Previtali, E. Risk factors for venous and arterial thrombosis / E. Previtali, P. Bucciarelli, S.M. Passamonti, I. Martinelli // Blood Transfus. 2011. Vol. 9. № 2. P. 120-138.
- 176. Puurunen, J. Interactions between ethanol and acetylsalicylic acid in damaging the rat gastric mucosa / J. Puurunen, P. Huttunen, J. Hirvonen // Acta. Pharmacol. Toxicol. (Copenh.). − 1983. − Vol. 52. − № 5. − P. 321-327.
- 177. Rainsford, K.D. Gastric irritancy of aspirin and its congeners: antiinflammatory activity without this side–effect / K.D. Rainsford, M.W. Whitehouse // J. Pharm. Pharmacol. 1996. Vol. 28. P. 599-601.
- 178. Rawish, E. Platelets as mediators of neuroinflammation and thrombosis / E. Rawish, H. Nording, T. Münte, H.F Langer // Front. Immunol. 2020. Vol. 11. P. 548631.
- 179. Ren, F.C. Antibacterial prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives from oberonia myosurus and identification of putative prenyltransferases / F.C. Ren, L. Liu, Y.F. Lv [et al] // J. Nat. Prod. − 2021. − Vol. 84. − № 2. − P. 417-426.
- 180. Rengasamy, K.R.R. Bioactive peptides and proteins as alternative antiplatelet drugs / K.R.R. Rengasamy, H. Khan, I. Ahmad [et al] // Med. Res. Rev. 2019. Vol. 39. № 6. P. 2153-2171.
- 181. Ridker, P.M. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women / P.M. Ridker, N.R. Cook, I.M. Lee [et al] // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. P. 1293-1304.
- 182. Rist, P.M. Effect of low-dose aspirin on functional outcome from cerebral vascular events in women / P.M. Rist, J.E. Buring, C.S. Kase, T. Kurth // Stroke. 2013. Vol. 44. P. 432-436.
- 183. Rodríguez-Mañas, L. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation / L. Rodríguez-Mañas, M. El-Assar, S. Vallejo [et al] // Aging Cell. − 2009. − Vol. 8. − № 3. − P. 226-238.
- 184. Roger, V.L. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics 2011 update: a report

- from the American Heart Association / V.L. Roger, A.S. Go, D.M. Lloyd–Jones [et al.] // Circulation. -2011. Vol. 123. N @ 4. P. e 18-e 209.
- 185. Roncaglioni, M.C. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: A randomised trial in general practice. Collaborative group of the primary prevention project / M.C. Roncaglioni, G. De Gaetano // Lancet. 2001. Vol. 357. P. 89-95.
- 186. Rosen, B. The effects of angiotensin II, endothelin–1, and protein kinase C inhibitor on DNA synthesis and intracellular calcium mobilization in vascular smooth muscle cells from young normotensive and spontaneously hypertensive rats / B. Rosen, J. Barg, R. Zimlichman // Am J Hypertens. 1999. Vol. 12(12 Pt 1–2). P. 1243-1251.
- 187. Roy, J. Development of poly unsaturated fatty acid derivatives of aspirin for inhibition of platelet function / J. Roy, R. Adili, R. Kulmacz [et al] // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2016. Vol. 359. № 1. P. 134-141.
- 188. Sacco, R.L. ASA and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. / R.L. Sacco, H.C. Diener, S. Yusuf [et al] // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 359. P. 1238-1251.
- 189. Sanmartín, M. Role of rivaroxaban in the prevention of atherosclerotic events / M. Sanmartín, S. Bellmunt, J. Cosín–Sales [et al.] // Expert Rev. Clin. Pharmacol. 2019. Vol. 12. № 8. P. 771-780.
- 190. Schemmer, P. Glycine reduces platelet aggregation / P. Schemmer, Z. Zhong, U. Galli [et al.] // Amino Acids. 2013. Vol. 44. № 3. P. 925-931.
- 191. Scheuerer, B. The CXC–chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages / B. Scheuerer, M. Ernst, I. Dürrbaum–Landmann [et al] // Blood. 2000. Vol. 95. № 4. P. 1158-1166.
- 192. Seretis, C. Hypercoagulation in colorectal cancer: what can platelet indices tell us? / C. Seretis, H. Youssef, M. Chapman // Platelets. 2015. Vol. 26. № 2. P. 114-148.
- 193. Shinohara, Y. CSPS 2 group. Cilostazol for prevention of secondary stroke (CSPS 2): an aspirin–controlled, double–blind, randomised non–inferiority trial / Y. Shinohara, Y. Katayama, S. Uchiyama [et al] // Lancet Neurol. − 2010. − Vol. 9. − № 10. − P. 959-968.
- 194. Signorelli, S.S. Insights from experiences on antiplatelet drugs in stroke prevention: a review / S.S. Signorelli, I. Platania, S.D. Tomasello [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public. Health. − 2020. − Vol. 17. − № 16. − P. 5840.
- 195. Sivenius, J. ESPS2 working group second european stroke prevention study: antiplatelet therapy is effective regardless of age / J. Sivenius, L. Cunha, H.C. Diener [et al] // Acta Neurol. Scand. 2009. Vol. 99. P. 54-60.

- 196. Spence, J.D. Recent advances in preventing recurrent stroke / J.D. Spence // F1000Res. 2020. Vol. 9. P. F1000.
- 197. Steering committee of the physicians' health study research group. Final report on the aspirin component of the ongoing physicians' health study. N. Engl. J. Med. 1989. Vol. 321. P. 129-135. URL: https://doi.org/10.1056/nejm198907203210301 (дата обращения: 22.02.2022).
- 198. Sturgeon, S.A. Adaptation of the Folts and electrolytic methods of arterial thrombosis for the study of anti-thrombotic molecules in small animals / S.A. Sturgeon, C. Jones, J.A. Angus, C.E. Wright // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. − 2006. Vol. 53. № 1. P. 20-29.
- 199. Swieringa, F. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow / F. Swieringa, C.C. Baaten, R. Verdoold [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc Biol. 2016. Vol. 36. P. 692-699.
- 200. Trenk, D. Antagonizing P2Y12 receptor inhibitors: current and future options / D. Trenk, L. Hille, S. Leggewie [et al] // Thromb. Haemost. 2019. Vol. 119. P. 1606-1616.
- 201. Tshane, L.S.L. Zinc(II) mineral increased the *in vitro*, cellular and ex vivo antihyperglycemic and antioxidative pharmacological profile of p-hydroxybenzoic acid upon complexation / L.S.L. Tshane, S.S. Mashele, G.R. Matowane [et al] // J. Food Biochem. − 2021. − Vol. 45. − № 2. − P. e13609.
- 202. Uchiyama, S. Aspirin for stroke prevention in elderly patients with vascular risk factors / S. Uchiyama, N. Ishizuka, K. Shimada [et al] // Stroke. 2016. Vol. 47. P. 1605-1611.
- 203. Ueno, M. Role of platelets and antiplatelet therapy in cardiovascular disease / M. Ueno, M. Kodali, A. Tello-Montoliu [et al.] // J. Atheroscler. Thromb. 2011. Vol. 18. № 6. P.431-442.
- 204. Ulucan, C. Effects of acetylsalicylic acid and morphine on neurons of the rostral ventromedial medulla in rat / C. Ulucan, C. Schnell, K. Messlinger, J. Ellrich // Neurosci. Res. 2003. Vol. 47. № 4. P. 391-397.
- 205. Van Gijn, J. Comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke / J. Van Gijn, A. Algra, J. Kappelle [et al] // N. Engl. J. Med. 1991. Vol. 325. P. 1261-1266.
- 206. Vannini, F. NOSH-aspirin inhibits colon cancer cell growth: effects of positional isomerism / F. Vannini, R. Kodela, M. Chattopadhyay, K. Kashfi // Redox Biol. 2015. Vol. 5. P. 421.
- 207. Virani, S.S. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the american heart association. / S.S. Virani, A. Alonso, H.J. Aparicio [et al] // Circulation. 2021. Vol. 143. № 8. P. e254-e743.

- 208. Vorhees, C.V. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory / C.V. Vorhees, M.T. Williams // Nat Protoc. -2006. -Vol. 1. No. 2. P. 848-858.
- 209. Wallace, J.L. The cellular and molecular basis of gastricmucosal defence / J.L. Wallace, D.N. Granger // FASEB J. 1996. Vol. 10. P. 731-740.
- 210. Weber, C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime / C. Weber // Circ. Res. 2005. Vol. 96. P. 612-616.
- 211. Westrick, R.J. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series) / R.J. Westrick, M.E. Winn, D.T. Eitzman // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. −2007. − Vol. 27. − № 10. − P. 2079-2093.
- 212. Willerson, J.T. Endothelial dysfunction / J.T. Willerson, D.J. Kereiakes // Circulation. 2003. Vol. 108. P. 2060-2061.
- 213. Wood, A.J. Aspirin as an Antiplatelet Drug / A.J. Wood, C. Patrono // N. Engl. J. Med. 1994. Vol. 330. P. 1287-1294.
- 214. Yang, X. Translation of microbiota short-chain fatty acid mechanisms affords anti-infective acyl-salicylic acid derivatives / X Yang, E.R. Forster, N. Darabedian [et al] // ACS Chem. Biol. − 2020. − Vol. 15. − № 5. − P. 1141-1147.
- 215. Yusuf, K. Acetylsalicylic acid and ascorbic acid combination improves cognition; Via antioxidant effect or increased expression of NMDARs and nAChRs? / K. Yusuf, K.D. Duygu, K. Esin [et al] // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2014. Vol. 37. P. 916-927.
- 216. Zhang, Y. Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding / Y. Zhang, Y. Chen, L. Ma // J Clin Neurosci. 2018. Vol. 47. P. 1-5.
- 217. Zheng, Y. Toward hydrogen sulfide based therapeutics: critical drug delivery and developability issues / Y. Zheng, B. Yu, L.K. De La Cruz [et al] // Med. Res. Rev. 2018. Vol. 38. P. 57-100.
- 218. Zhu, Y. Novel resveratrol-based aspirin prodrugs: synthesis, metabolism, and anticancer activity / Y. Zhu, J. Fu, K.L. Shurlknight [et al] // J. Med. Chem. 2015. Vol. 58. P. 6494-6506.

# СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

L-NAME – метиловый эфир N-нитро-L-аргинина;

NO – оксид азота;

vWF -фактор фон Виллебранда;

AK – аминокислота;

АСК – ацетилсалициловая кислота;

AX – ацетилхолин;

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГМФ – гуанозинмонофосфат;

 $\Gamma\Pi$  – гликопротеин;

 $\Gamma\Pi$  – гликопротеины;

ИБС – ишемическая болезнь сердца;

ИИ – ишемический инсульт;

ЛМК – локальный мозговой кровоток;

ЛПНП – липопротеины низкой плотности;

МК – мозговой кровоток;

НМК – нарушение мозгового кровообращения;

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ООСА - окклюзия общих сонных артерий;

ОСА –общие сонные артерии;

ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии;

ПВ – протромбиновое время;

СД – сахарный диабет;

СД2 – сахарный диабет 2 типа;

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания;

ТХА2 – тромбоксан А2;

ТВ – тромбиновое время;

ТИА – транзиторная ишемическая атака;

ТФ – тканевой фактор, фактор свёртывания крови III;

ФДЭ – фосфодиэстераза;

ХНМК – хроническое нарушение мозгового кровообращения;

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;

ЦОГ-1 – циклооксигеназа 1 типа;

ЦОГ-2 – циклооксигеназа 2 типа;

ЭД – эндотелиальная дисфункция;

ЭК – эндотелиальные клетки;

ЭСД – экспериментальный сахарный диабет.