

ОСМАН ЭЛИАС

**АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА –
ИНГИБИТОРОВ КИНАЗЫ GSK3 β**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Волгоград, 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
заведующий кафедрой организации
фармацевтического дела,
фармацевтической технологии и
биотехнологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ
Минздрава России, доцент

СИРОТЕНКО Виктор Сергеевич

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук,
профессор кафедры фармакологии и
биоинформатики ВолгГМУ,

БАБКОВ Денис Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры фармакологии и
клинической фармакологии НИУ
«БелГУ»,

ГУРЕЕВ Владимир Владимирович

доктор медицинских наук, доцент,
профессор кафедры фармакологии
ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ
Минздрава России,

КАНТЕМИРОВА Бэла Исмаиловна

Ведущее учреждение: «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Ольга Викторовна Шаталова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

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

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

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

Задачи исследования:

1. Изучение GSK3 β -ингибирующей активности производных 2-оксиндола. Определение величин ИК50. Выявление закономерностей структура-активность.
2. Изучение антиагрегантной активности новых производных 2-оксиндола на моделях АДФ-индуцированной и коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*. Выявление закономерностей структура-активность.
3. Определение влияния наиболее активных соединений на секрецию медиаторов воспаления ЛПС-стимулированными макрофагами. Определение цитотоксичности.
4. Исследование величины острой суточной токсичности соединений, проявляющих наибольшую антиагрегантную активность, расчет условно-терапевтического индекса. Определение соединения-лидера для изучения специфической фармакологической активности.
5. Изучение аспектов механизма действия соединения-лидера на рецепторные (GP VI, P2Y₁, P2Y₁₂, T α R, PARs) и сигнальные механизмы активации тромбоцитов (T α A₂, 6-кето-простагландин F₁ α , внутриклеточный пул кальция, секреция АТФ).
6. Изучение влияние наиболее активного соединения на тромбогенный потенциал крови крыс в норме и при экспериментальной патологии, вызванной введением ЛПС.

Степень разработанности проблемы.

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения. Ключевая роль в развитии указанной нозологии отводится процессам тромбообразования. Ведущим звеном в лечении и профилактике

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

Научная новизна исследования.

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

Научно-практическая значимость.

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

Методология и методы исследования.

Для реализации поставленных задач были использованы высокотехнологичные чувствительные методы исследования, имеющиеся в Волгоградском государственном медицинском университете. Объектом исследования явились новые производные 2-оксиндола. Эксперименты выполнены с использованием лабораторных животных: кролики породы Шиншилла (опыты *in vitro*), нелинейные мыши- и крысы-самцы (опыты *ex vivo* и *in vivo*), как виды, рекомендованные для изучения новых веществ, влияющих на систему гемостаза. Исследования выполнены согласно руководству по доклиническим исследованиям под редакцией А.Н. Миронова, а также в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии №81 от 03.11.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Степень достоверности полученных результатов.

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

ПО MS Excel 2020, методы регрессионного анализа, критерии попарного и множественного сравнения данных.

Положения, выносимые на защиту.

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

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

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

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

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 таблицами, 10 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VII), обсуждения результатов, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 12 отечественных и 179 иностранных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 представляет собой обзор современных литературных данных по функциональной активности тромбоцитов, социальной значимости проблемы повышенного тромбообразования, а также анализ существующих в практике антиагрегантных средств. Отдельное внимание уделено киназе GSK3b и ее роли в регуляции функциональной активности тромбоцитов. Отражены данные о перспективности данной мишени с целью создания высокоэффективных

антиагрегантных средств. Представлен спектр фармакологической активности производных 2-оксиндола, включая антиагрегантную.

Во **2 главе** подробно изложены материалы и методы исследования. Объектом исследования явились 20 новых производных 2-оксиндола, синтезированных на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством к.х.н. Н.А. Лозинской.

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

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

Активность GSK3B (человеческая активная рекомбинантная) определяли билюминесцентным методом с помощью набора ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили при 27 °C в 96-луночном белом планшете с плоским дном (Greiner Lumitrac 655074, США) в конечном инкубируемом объеме 25 мкл. Тестируемые соединения вносили в 1,25% растворе ДМСО и инкубировали в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 60 мин. Измерение люминесценции проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве положительного контроля использовали экспериментальный ингибитор GSK3b 3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)-1*H*-пиррол-2,5-дион (SB-216763, >98% по ВЭЖХ, Sigma, США) [Lozinskaya N.A., 2019 г.].

Для исследований антиагрегантной активности *in vitro* выбраны половозрелые кролики-самцы породы Шиншилла, а для проведения исследований *in vivo* – половозрелые нелинейные крысы-самцы, как виды, рекомендованные Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н., 2012 г.] и общепринятые для данного этапа исследований. Исследования *in vitro* проводились на богатой тромбоцитами плазме кроликов с помощью двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов Биола АЛАТ-2 (Россия). Исследуемые соединения и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота были изучены в диапазоне концентраций 100,0-1,0 мкМ. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ (Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкМ. Для веществ с наиболее высокой антиагрегантной активностью и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты рассчитывали величину IC₅₀ (концентрация, ингибирующая агрегацию тромбоцитов на 50%).

Перитонеальные макрофаги (ПМ) выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей. Моноциты периферической крови были получены из образцов цельной гепаринизированной крови здоровых, некурящих, молодых взрослых доноров. Накопление нитрит-аниона (стабильного конечного продукта распада NO, продуцируемого iNOS) в супернатантах определяли с помощью стандартного реактива Грисса, который основан на диазотировании нитрит-аниона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии диазосоединения с *N*-(1-нафтил)этилендиамином с образованием окрашенного производного. С целью определения уровня цитокинов

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

Жизнеспособность клеток была определена в МТТ-тесте, а также по уровню активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Изучение влияния соединения К-167 на функциональную активность тромбоцитов *in vivo* проводили согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Биола АЛАТ-2 (Россия). Тестируемыми образцами являлась богатая тромбоцитами плазма 72 беспородных половозрелых крыс самцов массой 250,0-300,0 г, которым за 2 часа до исследования внутривенно вводили соединение лидер К-167. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Соединение К-167 было изучено в дозе 1,7 мг/кг (доза, эквимолярная IC₅₀, полученной в опытах *in vitro*) и в дозах 1, 10 и 20 мг/кг, препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 14,6 (доза, эквимолярная IC₅₀, полученной в опытах *in vitro*), 29,3, 58,6 и 117,3 мг/кг. Для всех тестируемых образцов рассчитывали величину ED₅₀ (эффективная доза, в которой вещество ингибирует агрегацию тромбоцитов на 50%).

Определение LD₅₀ исследуемой субстанции соединения К-167 осуществляли по методу Литчфилда и Уилкоксона, с использованием регрессионного анализа (Microsoft Excel 2016) [Миронов А.Н., 2012]. Также установлена принадлежность соединения-лидера К-167 к классу токсичности лекарственных средств [Березовская И.В., 2003; Саноцкий И.В., 1975].

Функциональную активность тромбоцитов, стимулированных различными индукторами, оценивали согласно вышеописанному методу Born G, в модификации Габбасова В.А. (1989). Исследования выполняли как на богатой тромбоцитами плазме б кроликов (человека в случае использования в качестве индуктора PAR1-агонист) по вышеописанному способу, так и на суспензии отмытых тромбоцитов кролика. Влияние К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и коллагеном, было изучено на богатой тромбоцитами плазме кролика. Действие К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную агонистом PAR1 рецепторов, изучалось на богатой тромбоцитами плазме здоровых доноров. Влияние на агрегацию тромбоцитов, вызванную U46619, исследовали на суспензии отмытых тромбоцитов кролика. Для оценки активности соединений определяли $\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов и величину IC₅₀.

Влияние на уровень внутриклеточного кальция определяли в отмытых тромбоцитах. Измерение уровня внутриклеточного кальция проводили дважды: в суспензии отмытых тромбоцитов кроликов, индуцированных тромбином, с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AMv кальциевой (CaCl₂ 1мМ) и безкальциевой среде согласно методике [Ryu S.K., 2006] на планшетном ридере TECAN (Австрия). Исследуемое соединение К-167 было изучено в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ с последующим вычислением значения IC₅₀, препарат сравнения верапамил был исследован в концентрации 100 мкМ.

Определение влияния на секрецию АТФ тромбоцитами было выполнено на цельной крови б кроликов-самцов с использованием двухканального люмиагрегометра Chronolog 700 (Chronolog, США) [Ambrosio A.L., 2017]. Исследуемое соединение К-167 изучали в диапазоне концентраций 100-1 мкМ.

Влияние соединения К-167 и препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты на уровень тромбоксана В2 (TxV2) и 6-кето простагландина (PGF1 α) осуществляли

методом иммуноферментного анализа с использованием набора на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200, который воспроизводили спустя 2 часа после однократного внутрижелудочного введения тестируемых образцов с помощью стандартных наборов ELISA kit (Enzo, США) [Rao M.L., 2014]. Исследуемое соединение и препарат сравнения были изучены в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *ex vivo*, которые составили для соединения К-167 11,2 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты – 92,3 мг/кг.

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

Антитромботическое действие соединения К-167 и препаратов сравнения было изучено с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990]. Соединение К-167 и препарат сравнения вводились крысам внутрижелудочно однократно за 2 часа до инициации процессов тромбообразования. Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота были исследованы в дозах 11,2 и 92,3 мг/кг соответственно. С целью расчета показателя ED₅₀ в дальнейшем соединение К-167 было изучено в дозах 5,6 и 2,8 мг/кг. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота исследовалась в дозах 46,2 и 184,6 мг/кг. Оценку антитромботического действия тестируемых образцов проводили по показателю времени образования тромба. Далее производили расчет показателя ED₅₀ с использованием метода регрессионного анализа.

Моделирование тромбоза электрическим током проводили 42 беспородным крысам самцам массой 250,0-300,0 г. Воспроизведение данной модели тромбоза выполняли спустя 2 часа после внутрижелудочного однократного введения тестируемых образцов [Guglielmi G., 1991; Zhao X., 2016]. Наркотизацию животных проводили хлоралгидратом (400 мг/кг внутривнутрибрюшинно), затем послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. Индукция тромбоза сонной артерии проводилась постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока при этом соответствует 50 мА. Воздействие на сосуд осуществлялось до момента полной окклюзии сонной артерии тромбом. Исследуемое соединение К-167 исследовали в дозах 2,8, 5,6 и 11,2 мг/кг. Препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту изучали в дозах 46,2, 92,3 и 184,6 мг/кг.

С целью изучения антитромботического действия соединения К-167 и препарата сравнения в отношении венозной системы была выбрана модель перевязки нижней полой вены крыс [Спасов А.А., 2021; Albadawi H., 2017; Jin Q.-Q., 2017]. Эксперименты были выполнены на 24 половозрелых беспородных крысах самцах массой 250-300 г. У крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг внутривнутрибрюшинно), проводили послойную лапаротомию, оттеснение кишечника, разделение нижней полой вены и аорты, и осуществляли перевязку нижней полой вены на 1 см выше места бифуркации. Брюшная часть аорты при этом должна быть незатронутой. Затем брюшную полость ушивали и через 24 часа крыс повторно наркотизировали и производили лапаротомию с последующим извлечением тромбов из нижней полой вены. Тромбы взвешивали.

Тестируемое соединение К-167 и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота вводились внутривенно за 2 часа до осуществления перевязки нижней полой вены, в дозах 11,2 и 92,3 мг/кг, соответственно (ED_{50} антиагрегантной активности *ex vivo*).

Формирование некоронарного инфаркта миокарда проводили изопротеренолом 12 белым беспородным крысам самцам массой 250-300 г. Изопротеренол вводили двукратно с интервалом 24 часа в дозе 85 мг/кг подкожно в область паховой складки [Mohamed A.R., 2014]. Введение раствора тестируемого образца крысам начинали не ранее, чем через 24 часа после последней инъекции изопротеренола. Через 2 часа после введения тестируемого образца проводили исследование антитромботического действия с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990].

Исследование влияния соединения К-167 на время кровотечения выполнялось на 24 белых беспородных мышях самцах массой 20-25 г. У мышей, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) отсекали 3 мм с кончика хвоста. Хвост быстро помещали в пробирку с физиологическим раствором, температуру которого (37°C) поддерживали с помощью термостата и регистрировали время от момента отсекания кончика хвоста до момента прекращения вытекания крови из хвостовой вены [Greene T.K., 2010]. После прекращения кровотечения кончик хвоста обрабатывали раствором бриллиантового зеленого. Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота были изучены в дозах ED_{50} антиагрегантной активности, полученных в опытах *ex vivo*, которые составили 511,2 и 92,3 мг/кг, соответственно.

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

Исследование выполнено на 18 крысах-самцах. Забор образцов крови и метод определения параметров тромбоэластограммы осуществляли по способу, описанному в пункте 2.10. Экспериментальный сепсис моделировали с помощью раствора липополисахарида (ЛПС) (2 мг/кг, внутривенно) за 4 часа до введения исследуемых веществ.

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

В 3 главе диссертации описан экспериментальный поиск ингибиторов киназы GSK3 β в ряду производных 2-оксиндола. После оценки IC_{50} соединение 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (К-167) было идентифицировано как наномолярный ингибитор GSK3 β . Это послужило основанием для его дальнейшего более углубленного изучения.

4 глава посвящена экспериментальному изучению антиагрегантных свойств производных 2-оксиндола. В таблице 1 представлены данные скрининга соединений с

установленной GSK-3b-ингибирующей активностью на предмет антиагрегантного действия. Из 20 исследуемых соединений было выявлено 4 соединения, проявивших дозозависимое ингибирование агрегации тромбоцитов *in vitro* на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. По значению IC₅₀ уровень активности всех 4 соединений превосходил таковой для препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. Так, соединение под шифром К-165 было активнее ацетилсалициловой кислоты в 6 раз, образец К-167 проявлял активность в 10,3 раза выше, чем препарат сравнения. Вещества под шифрами К-215 и К-248 также оказывали антиагрегантное действие более выраженное, чем ацетилсалициловая кислота и превосходили ее по активности в 9,1 и 4,4 раза, соответственно.

Таблица 1.

Антиагрегантная активность соединений проявляющих GSK3b-ингибирующую активность и ацетилсалициловой кислоты на модели АДФ индуцированной (5 мкМ) агрегации тромбоцитов *in vitro* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов			IC ₅₀ антиагрегантной активности, мкМ
		100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
1.	Ацетилсалициловая кислота	56,5±2,1*	20,51±5,4*	11±3,7	81,0
2.	К-215	84,0±3,3*	47,8±3,4*	22,6±7,2	8,9
3.	К-165	67,2±4,1*	43,1±6,5	33,0±8,1	13,5
4.	К-248	72,3±6,9*	37,2±6,2	19,3±5,4	18,5
5.	К-167	75,6±3,0*	55,6±9,2*	26,5±5,8*	7,9
6.	OIP-NO2-O	40,3±3,9*	-	-	-
7.	OIP-NO2-O2	38,5±4,3*	-	-	-
8.	К-237	20,9±5,4	-	-	-
9.	К-170	4,5±1,3	-	-	-
10.	К-110	26,7±8,4*	-	-	-
11.	KL-29	47,1±5,4*	-	-	-
12.	KL-33	48,3±2,4*	-	-	-
13.	KL-30,2	27,9±1,3	-	-	-
14.	KL-34	31,6±5,7*	-	-	-
15.	KL-15	17,1±7,2	-	-	-
16.	KL-16	15,2±9,9	-	-	-
17.	KL-3	18,1±4,3	-	-	-
18.	KL-4	41,2±5,3	-	-	-
19.	KL-6	38,9±6,9	-	-	-
20.	KL-7	31,1±5	-	-	-
21.	KL-9	41,5±9,9	-	-	-

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

В ходе анализа структурных формул исследуемых соединений и уровня их антиагрегантного действия было установлено, что безусловный вклад в наличие активности вносит базовая структура. Высокий уровень активности для производных 2-оксидола характерен при наличии в положении R1 шестичленных ароматических

заместителей с короткой углеродной цепочкой, а в положении R2 -бензамида или -метилкарбамата, или же отсутствие заместителя.

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

Таблица 2.

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

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

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

Исходя из полученных данных далее было проведено исследование острой токсичности наиболее активного соединения под шифром К-167. Данные по изучению острой токсичности соединения К-167 позволили рассчитать значение ЛД₅₀ и условный терапевтический индекс (таблица 3).

Таблица 3.

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

№ п/п	Тестируемый образец	LD ₅₀ , мг/кг	УТИ
1.	К-167	754,4	67,4
2.	Ацетилсалициловая кислота	350,0	3,8

Исследования по изучению острой токсичности позволили установить значение ЛД₅₀ для соединения К-167, которое составило 754,4 мг/кг. По значению условного терапевтического индекса соединение К-167 превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 17,7 раза, что указывает на более высокий уровень безопасности данного соединения.

В 5 главе представлены результаты исследования влияния соединения К-167 на различные звенья системы гемостаза. При изучении влияния соединения К-167 на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов было установлено, что в концентрации 100 мкМ соединение К-167 способствует ингибированию агрегации кровяных пластинок на 99,8%. В концентрациях 10 и 1 мкМ соединение К-167

подавляет процессы агрегации на 94,5 и 18,8% соответственно. Значение IC₅₀ для соединения К-167 при этом составило 3,0 мкМ, в то время как для препарата сравнения данный параметр составил 4,5 мкМ (таблица 4). Схожий уровень активности соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты, при использовании в качестве индуктора процессов агрегации тромбоцитов коллагена, объясняется тем, что при активации гликопротеинового рецептора VI на поверхности тромбоцитов передача сигнала внутрь клетки осуществляется как через путь PI3K-Akt-GSK-3b, так и с дальнейшей активацией процессов синтеза тромбоксана A₂ [Chen H., 2022; Sun Y., 2023].

Таблица 4.

Антиагрегантная активность соединения К-167 на модели коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* (M±m) (n=6)

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

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

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

В ходе активности внутриклеточной циклооксигеназы тромбоцитов происходит синтез и секреция тромбоксана A₂, мощного проагрегантного вещества. Секретируемый тромбоксан оказывает стимулирующее действие на свои рецепторы на поверхности циркулирующих тромбоцитов. Соединение К-167 способствовало дозозависимому ингибированию агрегации тромбоцитов, стимулированных селективным агонистом тромбоксановых рецепторов U46619 (таблица 5). Значение IC₅₀ для соединения К-167 при этом составило 43,7 мкМ

Таблица 5.

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

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

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

В концентрации 1 мкМ вещество сравнения MRS-2179 (селективный антагонист P2Y₁ рецепторов тромбоцитов) способствовало ингибированию активации P2Y₁ рецепторов тромбоцитов на 93,4%. Исследуемое соединение К-167 в концентрации 1

мкМ способствовало снижению уровня активации тромбоцитов на 7,1%. В качестве референсного средства при изучении P2Y₁₂-антагонистического действия был выбран клопидогрел. Соединение К-167 при однократном внутривенном введении способствовало ингибированию активации P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов на 12,4%, в то время как клопидогрел в дозе, эквивалентной дозе соединения К-167, способствовал подавлению активации P2Y₁₂ рецепторов на 56,7%. Проведенное исследование позволяет исключить влияние на пуриновые рецепторы тромбоцитов из возможного механизма антиагрегантного действия соединения К-167.

В дозе ED₅₀ антиагрегантной активности соединение К-167 способствовало снижению продукции тромбоксана на 75,6%. Дальнейшее изучение соединения К-167 в дозах 5,8 и 2,8 мг/кг, позволило установить, что в указанных дозах соединение К-167 подавляет продукцию тромбоксана на 41,2 и 17,4% соответственно (таблица 6). ED₅₀ для соединения К-167 при этом составило 7,3 мг/кг. По способности оказывать влияние на синтез простагландина соединение К-167 значительно уступало ацетилсалициловой кислоте. В дозах ED₅₀ антиагрегантной активности соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота способствовали снижению синтеза простагландина на 9,0 и 56,4% соответственно (таблица 7).

Таблица 6.

Влияние соединения К-167 на уровень ТхВ₂ в тромбоцитах, стимулированных арахидоновой кислотой *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень ТхВ ₂ , пкг/мл	Δ% снижения уровня ТхВ ₂	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль		172,8±6,9		
2.	К-167	2,8	142,7±8,5	17,4±4,9	7,3
3.		5,6	101,7±9,3*	41,2±5,4*	
4.		11,2	42,2±6,3*	75,6±3,6*	
5.	Ацетилсалициловая кислота	23,1	120,1±10,6*	30,5±6,1*	32,5
6.		46,2	36,5±10,9*	78,9±6,3*	
7.		92,3	20,6±6,2*	88,1±3,6*	

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

Таблица 7.

Влияние соединения К-167 на уровень 6-кето-простагландина F1α в плазме крыс *in vivo* (M±SEM) (n=6)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень 6-кето-простагландина F1α, пкг/мл	Δ% снижения уровня 6-кето-простагландина F1α
1.	Контроль		21304,7±846,6	
4.	К-167	11,2	19388,5±397,4	9,0±1,9
7.	Ацетилсалициловая кислота	92,3	9293,5±709,0*	56,4±3,3*

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

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

Методом флуоресцентного анализа было установлено, что соединение К-167 способно оказывать влияние на содержание внутриклеточного кальция в тромбоцитах как в кальциевой, так и в бескальциевой среде.

Показано, что активация внутриклеточного сигнального пути Akt/PI3K/GSK-3 β сопровождается секрецией молекул АТФ [Xiang K., 2014]. Поэтому представилось необходимым изучить влияние соединения К-167 на секрецию молекул АТФ из плотных гранул тромбоцитов. Соединение К-167 и препарат сравнения способствовали достоверному, дозозависимому снижению концентрации АТФ, что обусловлено их влиянием на внутриклеточный сигнальный каскад. По значению IC₅₀ соединение К-167 превосходило по активности ацетилсалициловую кислоту в 8,6 раза (таблица 8).

Таблица 8.

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

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

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

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

Интегральным методом оценки состояния системы гемостаза является метод тромбоэластографии. Так, по показателю R было установлено, что соединение К-167 и препарат сравнения не оказывают выраженного влияния на данный параметр, что позволяет исключить влияние тестируемых веществ на время образования первых нитей фибрина. Коэффициент K, отражающий время достижения максимальной прочности сгустка, увеличивался под действием соединения К-167 более чем, в 2 раза. Достоверно происходило снижение градуса угла альфа под влиянием соединения К-167, что указывает на способность оказывать влияние на кинетику образования сгустка. При действии соединения К-167 процесс формирования сгустка протекает значительно более медленно, чем в группе контроля и препарата сравнения. Достоверным также было снижение максимальной амплитуды тромбоэластограмм под действием соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты, что указывает на выраженное подавление функциональной активности тромбоцитов.

Таблица 9.

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

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

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

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

В 6 главе представлено изучение антитромботических свойств соединения К-167 с использованием различных моделей артериального и венозного тромбоза.

В таблице 10 представлены результаты исследования антитромботической активности соединения К-167 на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III). В дозе ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* соединение К-167 способствовало пролонгированную времени окклюзии сонной артерии на 114,2%, что послужило основанием для дальнейшего дозозависимого исследования. Снижение дозы до 5,6 и 2,8 мг/кг позволило установить, что в указанных дозах соединение К-67 способствует удлинению времени образования тромба на 57,9 и 22,4%, соответственно. ED₅₀ антитромботической активности для соединения К-167 при этом составила 7,3 мг/кг (таблица 10). Препарат сравнения также способствовал дозозависимому пролонгированную времени окклюзии сонной артерии и показатель ED₅₀ для ацетилсалициловой кислоты составил 136,6 мг/кг (таблица 10).

Важным явилось изучение антитромботической активности в условиях экспериментальной патологии. В качестве последней была выбрана модель инфаркта миокарда, индуцированного изопротеренолом, как модель, сопровождающаяся увеличением тромбогенного потенциала крови. Так, в контрольной группе животных, которым моделировании инфаркт миокарда, наблюдалось достоверное снижение времени окклюзии сонной артерии при воздействии раствора хлорида железа, что подтверждает наличие повышенного тромбообразования при данной патологии. Соединение К-167 и ацетилсалициловая кислота были изучены дозозависимо с последующим расчётом показателя ED₅₀. Для соединения К-167 этот показатель

составил 6,5 мг/кг, в то время как для ацетилсалициловой кислоты 118,1 мг/кг (таблица 10).

Таблица 10.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии	$\Delta\%$ пролонгирования времени окклюзии сонной артерии	ED ₅₀ , мг/кг
1.	Контроль		17,5±0,5		
2.	Контроль (инфаркт)		13,2±0,7*		
3.	К-167	11,2	32,6±3,1*	114,2±20,2*	7,3
4.		5,6	24,0±0,7*	57,9±4,7*	
5.		2,8	18,6±0,8	22,4±5,3	
6.	К-167 (инфаркт)	11,2	26,3±1,2*	99,5±9,1*	6,5
7.		5,6	18,5±0,4*	40,2±3,2*	
8.		2,8	14,7±0,3	11,1±2,5	
9.	Ацетилсалициловая кислота	184,6	29,3±1,0*	67,6±5,7*	136,6
10.		92,3	23,4±0,7*	33,8±4,1*	
11.		46,2	20,4±0,5*	16,7±2,9*	
12.	Ацетилсалициловая кислота (инфаркт)	184,6	23,2±1,0*	75,5±7,4*	118,1
13.		92,3	19,3±0,7*	46,5±5,4*	
14.		46,2	15,2±0,5	14,9±3,6	

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

При моделировании артериального тромбоза воздействием на сонную артерию крыс постоянного электрического тока было установлено, что соединение К-167 в дозе ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* способствует увеличению времени окклюзии на 61,5%, по сравнению с группой контроля. В дозах 5,6 и 2,8 мг/кг исследуемый параметр пролонгировался на 30,7 и 21,6% соответственно. ED₅₀ антитромботической активности для соединения К-167 при этом составила 9,0 мг/кг (таблица 6.2). Дозозависимое исследование препарата сравнения позволило установить, что ED₅₀ антитромботической активности для ацетилсалициловой кислоты при этом составила 98,4 мг/кг (таблица 11).

Таблица 11.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии	$\Delta\%$ пролонгирования времени окклюзии сонной артерии	ED ₅₀ , мг/кг
15.	Контроль		14,6±0,7		
16.	К-167	11,2	23,6±1,3*	61,5±9,2*	9,0
17.		5,6	19,1±0,9	30,7±6,3	

18.		2,8	17,8±0,7	21,6±4,8	
19.	Ацетилсалициловая кислота	184,6	27,6±1,4*	88,9±9,8*	98,4
20.		92,3	21,8±0,9*	49,5±6,0*	
21.		46,2	18,2±0,8	24,4±5,7	

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

Оценка антитромбогенных свойств соединения К-167 была проведена также в венозной системе на модели тромбоза нижней полой вены крыс (таблица 12). Так, в контрольной группе животных средняя масса тромбов, извлеченных из нижней полой вены составила 105,6 мг. Соединение К-167 способствовало статистически значимому снижению массы тромбов до 13,7 мг. При однократном внутрижелудочном введении крысам ацетилсалициловой кислоты было установлено, что средняя масса тромбов составляла 82,3 мг.

Таблица 12.

Антитромботическая активность соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на модели тромбоза нижней полой вены крыс при однократном внутрижелудочном введении ($M \pm SEM$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Масса тромба, мг
1.	Контроль		105,6±5,5
2.	К-167	11,2	13,7±5,8 [#]
3.	Ацетилсалициловая кислота	92,3	82,3±2,4*

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

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

На модели изучения времени кровотока из хвостовой вены мышей было установлено, что в контрольной группе животных среднее время кровотока составило 133,3 сек. При однократном внутрижелудочном введении соединение К-167 способствовало достоверному увеличению данного параметра в 2,3 раза. Способность пролонгировать время кровотока безусловно указывает на наличие ингибирующего влияния на процесс тромбообразования. Однако, это может также указывать на риск возникновения кровотока. Исследование препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты позволило заключить, что она также способствует пролонгации времени кровотока в 2,3 раза. Сравнимое с референсным препаратом увеличение времени кровотока и превосходящая антитромботическая активность указывает на более высокую перспективность исследуемого соединения К-167 перед ацетилсалициловой кислотой, как потенциального корректора повышенного тромбогенного потенциала крови.

Глава 7 описывает результаты исследования влияния соединения К-167 на систему гемостаза в условиях экспериментального системного воспаления. Для оценки противовоспалительной активности соединения К-167 использовали *in vitro* модель активации макрофагов, индуцированную LPS. Перитонеальные макрофаги были выделены из самцов C57bl/6j мышей и обработаны LPS *E. coli* для индукции M1-поляризации. Дексаметазон использовался как положительный контроль.

Соединение К-167 обладает противовоспалительной активностью, ингибируя синтез оксида азота LPS-стимулированными макрофагами с IC_{50} 13,9 мкМ, а также

подавляет секрецию противовоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-альфа с IC50 22,4 мкМ и 16,4 мкМ соответственно. Соединение не вызывало клеточной гибели вплоть до концентрации 100 мкМ.

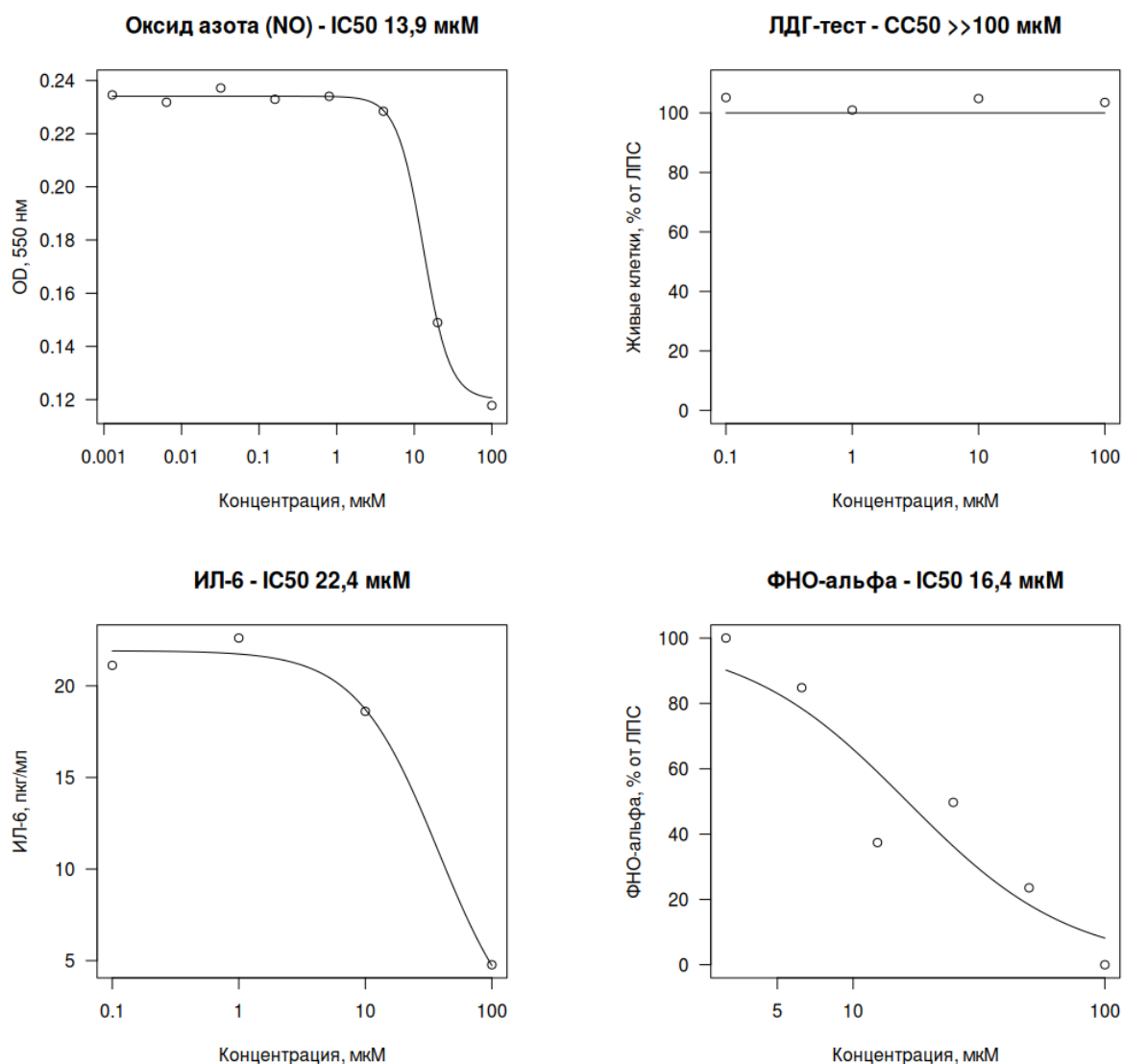


Рисунок 1. Влияние соединения К-167 на ЛПС-стимулированные перитонеальные макрофаги.

При внутривенном введении раствора ЛПС было зафиксировано, что липополисахарид способствует достоверному изменению всех параметров тромбоэластограммы, свидетельствующих о значительном увеличении тромбогенного потенциала крови в ответ на развивающуюся системную воспалительную реакцию. Изучение влияния соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты в интактных условиях и при экспериментальном сепсисе позволило зафиксировать отсутствие влияния указанных веществ на показатель R и, следовательно, на каскад коагуляции (таблица 13). При однократном внутрижелудочном введении соединения К-167 в условиях системной воспалительной реакции наблюдалось значимое увеличение коэффициента K в 3,4 раза, что свидетельствует о способности соединения К-167 замедлять процесс стабилизации сгустка в условиях ЛПС-интоксикации. По сравнению

с контрольной группой животных, внутривенно получавших раствор ЛПС, угол альфа при действии соединения К-167 был в 2,4 раза меньше (таблица 13). Анализ тромбоэластограмм позволил также зафиксировать выраженное влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на функциональную активность тромбоцитарного звена системы гемостаза. Так, значение максимальной амплитуды тромбоэластограмм достоверно снижалось при действии соединения К-167 в 2,3 раза по сравнению с контрольными значениями в условиях экспериментального сепсиса (таблица 13).

Таблица 13.

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

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

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

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

Внутривенное введение крысам липополисахарида в дозе 2 мг/кг также приводит к развитию дисфункции эндотелия [Piechota-Polańczyk A., 2012; Abdul Y., 2020]. Показательным биомаркером эндотелиальной дисфункции является эндотелин-1 [Петриков А.С., 2013; Калинин Р.Е., 2019]. Эндотелин-1 является ведущей молекулой, регулирующей функцию сосудов, а также отягощающим фактором сердечно-сосудистых заболеваний при эндотелиальной дисфункции [Hsieh H.L., 2021].

При моделировании экспериментального сепсиса было установлено, что уровень эндотелина-1 в плазме крови крыс статистически значимо увеличивался в 16,1 раза, что свидетельствует о развитии дисфункции эндотелия у крыс. На фоне экспериментального сепсиса было зафиксировано, что исследуемое соединение К-167 способствовало достоверному снижению уровня эндотелина-1 на 48% (таблица 14).

Таблица 14.

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

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Уровень эндотелина-1, пкг/мл
1.	Контроль (интакт)		0,9 \pm 0,3
2.	Контроль (ЛПС)		14,5 \pm 0,5*
3.	К-167 (интакт)	11,2	0,8 \pm 0,02
4.	К-167 (ЛПС)		7,5 \pm 0,4*#

5.	Ацетилсалициловая кислота (интакт)	92,3	0,8±0,03
6.	Ацетилсалициловая кислота (ЛПС)		14,3±0,3*

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

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

При использовании модели ЛПС-индуцированной интоксикации у крыс, было обнаружено, что количественное содержание фактора Виллебранда (vWF) в плазме животных с гиперцитокинемией достоверно увеличивалось на 56,2% по сравнению с интактной группой животных (таблица 15). Такое увеличение концентрации vWF подтверждает развитие эндотелиальной дисфункции в ответ на внутривенное введение токсина ЛПС. На фоне экспериментального сепсиса соединение К-167 способствовало снижению уровня vWF на 56,5% по сравнению со значениями, полученными в группе положительного контроля (таблица 15).

Таблица 15.

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

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

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

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

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

В **обсуждении** приводится обобщение результатов, полученных в ходе исследования, их интерпретация с учетом литературных данных. В результате исследования был выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3B – 3-арилден-2-оксиндолы. Наиболее активное соединение К-167 обладает выраженными антитромбогенными свойствами, что было подтверждено с помощью моделирования различных тромбозов. Влияние на различные звенья системы гемостаза позволяет

сделать вывод о выраженном ингибировании внутриклеточного сигнального каскада тромбоцитов, опосредованного киназой GSK3B.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди испытанных соединений выявлено 16 ингибиторов GSK3B, из них 4 – с субмикромольной активностью. Наиболее активное соединение 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (K-167) показало IC_{50} 4,19 нМ. В результате изучения влияния соединения K-167 на процессы тромбообразования, установлена его высокая антитромботическая активность при однократном внутрижелудочном способе введения на всех изученных моделях тромбозов. Важной составляющей доклинического изучения потенциальных антиагрегантных средств является исследование их активности при экспериментальной патологии [Миронов А.Н., 2012; Majithia A., 2019]. При изучении антитромботической активности соединения K-167 была выявлена его высокая активность при однократном внутрижелудочном введении, превосходящая действие данного тестируемого образца в интактных условиях. Было показано, что соединение K-167 проявляет выраженное антитромботическое действие не только на интактных животных, но и в условиях экспериментальной патологии, сопровождающейся повышением тромбогенного потенциала крови. Исследование влияния на процессы тромбообразования в нижней полой вене продемонстрировало, что соединение K-167 способствует уменьшению средней массы венозных тромбов по сравнению со значениями, полученными в контроле и при этом превосходит по антитромботической активности препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту в 6 раз.

В результате проведенных экспериментальных исследований по изучению механизма антиагрегантного действия соединения K-167 было установлено, что антитромбоцитарный эффект исследуемое вещество реализует через ингибирование внутриклеточного сигнального каскада тромбоцитов, сопровождающегося секрецией тромбоксана A₂, а также проявляя антагонистическое действие в отношении рецепторов к тромбоксану A₂ на поверхности тромбоцитов.

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

ВЫВОДЫ

1. Химический класс производных 2-оксиндола является перспективным для поиска и создания на его основе новых антиагрегантных средств, ингибиторов киназы GSK-3 β . Наибольшая GSK3 β -ингибирующая активность наблюдается при наличии 3-арилиденового заместителя.
2. Выявлено соединение К-167, превосходящее по антиагрегантной активности ацетилсалициловую кислоту в опытах *in vitro* в 10,2 раза, а в тестах *in vivo* в 8,2 раза.
3. Показано, что соединение К-167 подавляет ЛПС-стимулированную воспалительную активацию макрофагов, ингибирует образование оксида азота, секрецию ИЛ-6 и ФНО-альфа с IC₅₀ мкМ, обладая низкой цитотоксичностью (CC₅₀ >100 мкМ).
4. В результате исследования острой токсичности соединения К-167 было установлено, что данное вещество относится к 3 классу низкотоксичных соединений. По значению УТИ соединение К-167 превосходит ацетилсалициловую кислоту в 21 раз.
5. Детальное изучение влияния соединения К-167 на различные звенья системы гемостаза позволило заключить, что соединение К-167 оказывает выраженное антитромбоцитарное действие путем подавления внутриклеточного сигнального пути PI3K-Akt-GSK3 β , что сопровождается снижением уровня, секретируемого тромбоксана A₂. Дополнительно было установлено, что соединение К-167 может оказывать антагонистическое действие в отношении тромбоксановых рецепторов на поверхности тромбоцитов.
6. На модели артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III) и электрическим током установлено, что соединение К-167 превосходит по активности ацетилсалициловую кислоту в 18,7 и 11 раз соответственно.
7. В условиях экспериментального инфаркта миокарда уровень антитромботической активности для соединения К-167 превосходил таковой для ацетилсалициловой кислоты в 18,2 раза.
8. По способности предотвращать тромбообразование в венозной системе соединение К-167 превосходило ацетилсалициловую кислоту в 6 раз.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразным является дальнейший синтез новых производных 2-оксиндола с разными заместителями с целью оптимизации их GSK3 β -ингибирующих и антиагрегантных свойств.
2. Созданная методология изучения антиагрегантных средств может быть использована для поиска и создания высокоэффективных корректоров нарушений в системе гемостаза, в том числе в условиях сепсиса.
3. Соединение К-167 является высокоэффективным антиагрегантным средством. По уровню антиагрегантной и антитромботической активности соединение К-167 превосходит референсный препарат ацетилсалициловую кислоту. Проведенное исследование позволяет заключить, что представляется целесообразным дальнейшее углубленное доклиническое изучение фармакологических свойств соединения К-167.

СПИСОК РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Babkov D., Bezsonova E., Sirotenko V., **Othman E.**, Klochkov V., Sosonyuk S., Lozinskaya N., & Spasov A. (2023). 3-Arylidene-2-oxindoles as GSK3 β inhibitors and anti-thrombotic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 87, 129283. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129283>.
2. **Othman E.**, Sirotenko V.S., Babkov D.A., Bezsonova E.N., Lozinskaya N.A., Spasov A.A. GSK3B Inhibitor K-167 Ameliorates Coagulation in Experimental Sepsis Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4996776> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4996776>. (PREPRINT)
3. Сиротенко В.С., Бабков Д.А., **Осман Э.**, Спасов А.А. Влияние нового ингибитора GSK-3B на процессы адгезии, активации, секреции и агрегации тромбоцитов. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2023. Т. 20, № 3. С. 47–53.
4. **Э. Осман**, В. С. Сиротенко, А. А. Спасов. Антитромботическая активность нового ингибитора GSK-3b – производного 2-оксиндола на модели артериального и венозного тромбоза в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2024 ТОМ 87 № 4. С 19 – 21. DOI: 10.30906/0869-2092-2024-87-4-19-21.
5. **Э. Осман**, В. С. Сиротенко, Н. А. Лозинская. Влияние производного 2-оксиндола соединения K-167 на продукцию тромбоксана В2. *Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» Том 86, № 11s (2023)*. DOI: 10.30906/ekf-2023-86s-117a.
6. **Э. Осман**, В.С. Сиротенко, В.Г. Клочков, Д.А. Бабков. Изучение влияния антидиабетического соединения ОИ-1 на агрегацию и тромбообразование. IX Международной научно-практической конференции, Пятигорск 2021.
7. **Осман Э.** Антиагрегантная активность новых производных 2-оксиндола in vivo. В сборнике: XXVI региональная конференция молодых ученых и исследователей Волгоградской области. Сборник статей. Волгоградский государственный медицинский университет. Волгоград, 2023. С. 411-415.
8. **Осман Э.**, Елтонцева Ю.А., Авдеев Г.Д. Влияние нового ингибитора GSK-3b на показатели тромбоэластограммы в условиях экспериментального сепсиса. В сборнике: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Сборник статей 81-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. Волгоград, 2023. С. 432-433.
9. **Осман Э.**, Елтонцева Ю.А. Влияние нового производного 2-оксиндола на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов. В сборнике: XXVII региональная конференция молодых учёных и исследователей Волгоградской области. сборник статей. Волгоградский государственный медицинский университет. Волгоград, 2022. С. 327-329.
10. Кучерявенко А.С., **Осман Э.** Антитромботическая активность нового производного 2-оксиндола на различных моделях тромбоза. В книге: Санкт-Петербургские научные чтения-2022. Сборник тезисов IX Международного Молодежного Медицинского Конгресса. Санкт-Петербург, 2022. С. 345.
11. **Осман Э.** Поиск новых антиагрегантных соединений, проявляющих GSK-3B-ингибирующую активность, в ряду производных 2-оксиндола. Сборник 79-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. Волгоград, 2021. С. 352.
12. **E. Othman**, V.S. Sirotenko, D.A. Babkov, V.G. Klochkov. GSK3B inhibitor K-167 inhibits IL-6 secretion and platelet aggregation during inflammation. *Journal of Clinical and Health Sciences*, Vol 7 Issue 2(Supplementary) 2022 (International Conference on Post-Covid Healthcare, Medical Research and Education, 29-31 March 2022 II) 35th Annual Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP 2022), 26-28 July 2022

ОСМАН ЭЛИАС

**АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА –
ИНГИБИТОРОВ КИНАЗЫ GSK3 β**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук