

На правах рукописи

Азизова Зульфия Рашидовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И
ТРОМБОГЕННЫХ СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕМБРАНОТРОПНЫХ ТИОТЕРПЕНОИДОВ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2022

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

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент

Киселев Сергей Васильевич.

Научный консультант: доктор химических наук, профессор

Никитина Лилия Евгеньевна.

Официальные оппоненты:

Яковлев Михаил Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии", лаборатория системной эндотоксинемии и шока, заведующий лабораторией;

Самородов Александр Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Башкирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита состоится 15 марта 2022 г. в 10.00 час. на заседании диссертационного совета 21.2.014.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России) (350063, Краснодар, ул. Митрофана Седина, д. 4, тел. (861) 2625018).

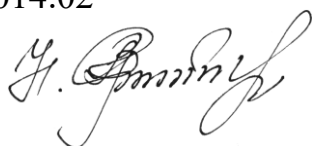
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета 21.2.014.02

доктор медицинских наук,
профессор



Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Нарушения в системе гемостаза являются одними из ключевых звеньев патогенеза многих сердечно-сосудистых, цереброваскулярных, иммунных, инфекционных заболеваний [Галютдинов Г.С., 2012, Custodio-Chablé S. J., 2020]. Большинство патологических процессов, такие как атеросклероз, преэклампсия беременных и др., оказывают влияние на систему гемостаза преимущественно через повреждение эндотелия [Tomimatsu T. et al., 2019]. Эндотелиальная дисфункция посредством различных индукторов активирует рецепторы тромбоцитов и, тем самым, приводит к их адгезии и агрегации при различных воспалительных состояниях и инфекционных заболеваниях [Sepúlveda C., 2017]. Например, эндотоксины, попадающие в кровоток из кишечника, обладают активирующим влиянием на гемостаз [Мешков М.В. и др. 2005, 2007]. Их избыток в общем кровотоке индуцирует воспаление [Яковлев М.Ю., 1988-2021], участвует в атерогенезе [Аниховская И.А. и др. 2015; Конев Ю.В. и др., 2004; Покусаева Д.П. и др., 2019; Чижиков Н.В. и др. 2002] и патогенезе аутоиммунных заболеваний [Гордиенко А.И. и др., 2019], женского бесплодия [Энукидзе Г.Г. и др., 2007], эндогенных психозов [Зозуля С.А. и др., 2020], хронических вирусных заболеваний [Аниховская И. А. и др., 2015; Вышегуров Я.Х. и др., 2007, Созинов А.С., 2004; Хасанова Г.Р. и др., 2020] и геморрагических послеоперационных осложнений [Мешков М.В. и др., 2005-2007]. Вся перечисленная патология сопровождается нарушениями системы гемостаза (различной степени выраженности), одним из важных аспектов патогенеза которых является тромбоцитарное звено. К сожалению, имеющийся арсенал современных гемоактивных препаратов не обеспечивает полную и эффективную профилактику и лечение тромботических осложнений [Душпанова А.Т. и др., 2016]. Многие современные исследования посвящены поиску новых препаратов с антиагрегационным эффектом с рецептор-ассоциированным механизмом действия [Самородов В.А. и др., 2016; Спасов А.А. и др., 2021; Клен Е.Э. и др., 2020]. Недостаточная эффективность применяемых в настоящее время антиагрегантов и антикоагулянтов объясняет необходимость исследования молекулярных механизмов активации системы гемостаза при протромботических состояниях и поиска новых потенциальных мишеней воздействия для коррекции этих нарушений.

Степень разработанности темы. Большая часть исследований в настоящее время направлена на изучение рецепторной активации тромбоцитов [Cattaneo M., 2015; Dowal L., 2011], однако при этом не учитываются роль и особенности молекулярных основ взаимодействия индукторов и факторов свертывания с клеточными мембранами тромбоцитов в активации сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза при заболеваниях, сопровождающихся гиперкоагуляцией. Ранее было показано, что асимметрия фосфолипидов является ключевым элементом для активации гемостаза [Beveris E.M., 2016]. В настоящее время отсутствуют систематизированные данные о роли гидрофобных взаимодействий в конформационных изменениях мембран

тромбоцитов при гиперкоагуляционных состояниях.

Цель исследования: определение способности мембранотропных соединений на основе терпенов влиять на тромбогенные свойства тромбоцитов и оценка возможности их использования для патогенетической коррекции гиперкоагуляционных состояний.

Задачи исследования:

1. Изучить антикоагуляционные и антиагрегационные свойства синтезированных тиотерпеноидов на плазме крови человека с ишемической болезнью (ИБС) сердца в условиях *in vitro*.

2. Исследовать изменения морфофункциональной структуры тромбоцитов под влиянием физиологических и патологических индукторов в присутствии тиотерпеноидов.

3. Определить возможный механизм воздействия тиотерпеноидов на гиперкоагуляционное состояние при ишемической болезни сердца.

4. Установить возможность лиганд-рецепторных взаимодействий тиотерпеноидов, обуславливающих их антиагрегационные свойства.

Научная новизна. Впервые изучен характер изменения тромбогенных свойств тромбоцитов в присутствии терпеноидов и проведена оценка возможности коррекции тромбогенных свойств клеточных мембран тромбоцитов при гиперкоагуляции с использованием мембранотропных соединений. Впервые определены молекулярные механизмы взаимодействия тиотерпеноидов с модельными мембранами и показано значение гидрофобного связывания для функционирования ферментных комплексов, определяющих генерацию основного фермента свертывания крови – тромбина. Впервые исследован механизм молекулярного взаимодействия терпеноидов с рецептором P2Y₁₂ тромбоцитов в сравнении с другими антагонистами методом молекулярного докинга.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные нами результаты расширяют представления о молекулярном механизме гемостаза при гиперкоагуляционных состояниях и показывают возможность использования мембранотропных соединений на основе терпенов для коррекции нарушений в этой системе. Результаты исследования иллюстрируют роль трансформации мембран в процессах инициации и активации свертывания крови при ИБС. Низкая токсичность тиотерпеноидов в сочетании с антиагрегационными и антикоагуляционными свойствами позволяет рассматривать их в качестве перспективных соединений для создания новых лекарственных веществ, применяемых для коррекции и профилактики тромбофилии различной этиологии.

Методология и методы диссертационного исследования. Тромбогенные свойства плазмы крови человека определяли *in vitro* по способности тромбоцитов к агрегации, изменению показателей стандартных поверхностно-зависимых коагуляционных тестов и тромбодинамики; состояние тромбоцитов оценивалось с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ); молекулярные механизмы взаимодействия устанавливали посредством ядерной

магнитной резонансной (ЯМР) спектроскопии в жидкой и твердой фазах, молекулярного моделирования и докинга. Результаты исследования обработаны с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 2007. Все операции были проведены с помощью Graph Pad. Prism software V.6 (GraphPad Software, Inc., США).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Ключевым элементом в активации тромбоцитов с последующей активацией системы свертывания крови является изменение фосфолипидной структуры клеточной мембраны. Тиотерпеноиды за счет гидрофобного взаимодействия с мембраной тромбоцитов стабилизируют ее, что снижает каталитическую активность и тромбогенный потенциал фосфолипидной мембраны.

2. Синтезированные терпеноиды обладают антиагрегационными и антикоагуляционными свойствами. Гемокоагуляционная активность обусловлена ингибированием рецепторов тромбоцитов, подавлением тромбогенных свойств фосфолипидов, участвующих в формировании коагуляционных ферментных комплексов, уменьшением выброса тромбоцитарных микровезикул.

Степень достоверности и апробация результатов. Исследование антиагрегационных и антикоагуляционных свойств тиотерпеноидов, а также оценка их цитотоксичности проводились на современном оборудовании с использованием актуальных методик. Достоверность результатов обеспечивалась использованием комплекса современных методов исследования, в том числе спектральных и расчетных (ЯМР-спектроскопии, АСМ, молекулярного моделирования, в том числе докинга). Комиссия по проверке первичной документации пришла к выводу, что материалы диссертации достоверны, получены лично автором. Диссертационная работа прошла экспертную оценку корректности статистической обработки и доказательности результатов медицинских исследований. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации диссертационного исследования подкреплены фактическими данными, наглядно иллюстрированными рисунками и представленными в таблицах. Результаты научно-квалификационной работы были доложены и обсуждены на X Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» в г. Казани (5-9 июня 2017), международных конференциях: 19th Tetrahedron Symposium в Италии (26-28 июня 2018); 12th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds в г. Ташкент в Узбекистане (7-8 сентября, 2017); American Society for Cell Biology and European Molecular Biology Organization Meeting 2017 в г. Пенсильвания, США (2-6 декабря 2017).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, в том числе 4 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов

диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и издания, приравненные к ним.

Личный вклад соискателя. Автором выбрана тема, составлена программа, определены этапы диссертационной работы, проведен анализ научной литературы по изучаемой проблеме. Автором выполнены экспериментальные исследования на всех этапах диссертационной работы, которые проводились на базе кафедр общей и органической химии (синтез тиотерпеноидов – 80%) и общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (исследование цитотоксичности – 70%), на базе Республиканского центра крови Республики Татарстан – 85% (ГАУЗ «Республиканский центр крови» МЗ РТ). Автором проведена статистическая обработка, анализ и обобщение результатов, интерпретированы полученные данные – 90%. Формулирование выводов, рекомендаций, положений, выносимых на защиту, принадлежат лично автору.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы. Список литературы содержит 260 источников, из которых 209 зарубежных авторов. Работа изложена на 177 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами и 40 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве мембранотропных агентов были выбраны терпеноиды борнановой структуры **1-3** и **6**, камфенового ряда **4**, пинановой структуры **5, 7-9** (рисунок 1).

Цитотоксичность. С целью определения возможности использования изучаемых соединений в биологических исследованиях и выбора рабочих концентраций веществ были проведены эксперименты по установлению цитотоксичности тиотерпеноидов на культуре фибробластов. Оценка жизнеспособности клеток (фибробластов) в присутствии изучаемых соединений проводилась с помощью MTS-теста. Клетки культивировали при 37°C 5% CO₂ (LamSystems, Россия) с концентрациями веществ от 18 до 2мМ/л в 1,5% растворе этилового спирта. Контроль – цитостатик этопозид (Calbiochem, США).

Получение венозной крови и плазмы. Возможность использования синтезированных на основе терпенов веществ для коррекции гемостаза определяли *in vitro* на плазме крови человека. Исследование было одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Эксперименты проводились на плазме крови здоровых доноров (n=20, возраст 20-35 лет) и больных с потенциально протромбогенным состоянием – ишемической болезнью сердца (ИБС) (n=20, возраст 50-65 лет). Оценка размера выборки производилась на основе методологии, предложенной Д. Коэном и реализованной в пакете pwr 1.3-0.

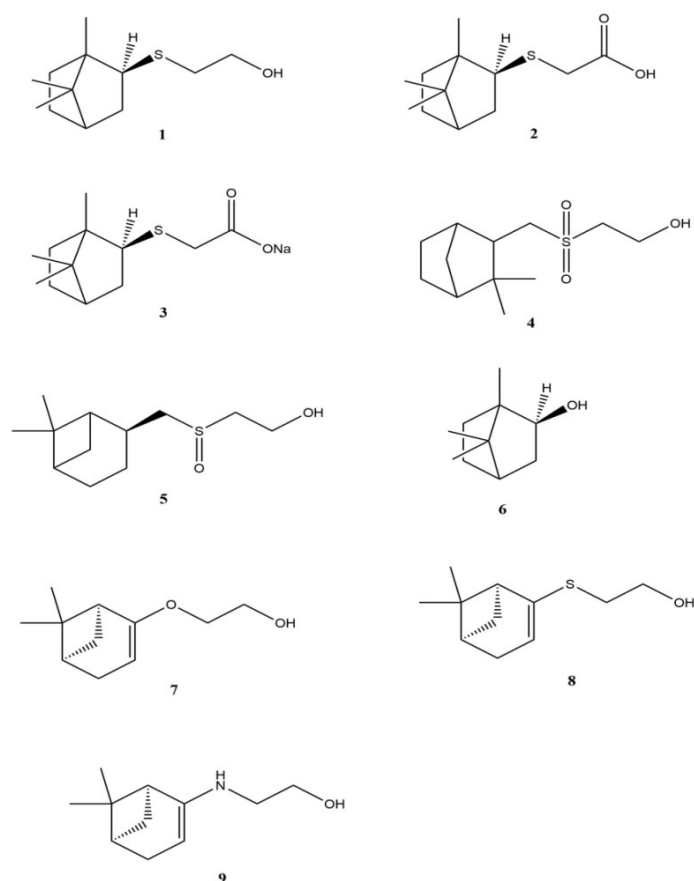


Рисунок 1 – Производные терпеноидов

Расчет производился для тестирования с использованием двустороннего t-теста при стандартизированном размере эффекта $d=2$, уровне статистической значимости 0.05 и мощности 0.8. В результате оценки обоснованным для заданных параметров является размер выборки $n=5$ в каждой экспериментальной группе. Кровь получали путем пункции кубитальной вены, используя вакуумные пробирки с 3,8% цитрата натрия при соотношении 9:1. Богатую тромбоцитами плазму получали в результате центрифугирования крови в течение 10 минут при скорости 1000 об/мин, после чего переливали верхний слой плазмы в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 минут при скорости 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами, которая использовалась для разведения богатой тромбоцитами плазмы до фиксированной объемной концентрации тромбоцитов, определения коагуляционного гемостаза и тромбогенных свойств плазмы. Для приготовления препаратов терпеноидов использовался физиологический раствор, содержащий 15% этиловый спирт, так как изучаемые соединения плохо растворимы в воде. Для определения агрегации тромбоцитов к 0,45 мл плазмы добавляли 0,05 мл раствора с концентрацией исследуемого соединения 20 мМ/л и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при температуре 37°C. В контрольных пробах к образцам плазмы добавлялся этот же растворитель, не содержащий исследуемые соединения.

Определение агрегационной способности тромбоцитов. Индуцированная агрегация тромбоцитов определялась с помощью растворов стандартных

индукторов: аденозиндифосфата (АДФ) (5 мкМ), адреналина (10 мкМ), коллагена (2 мкг/мл), арахидоновой кислоты (0,5 мМ) и ристомидина (1 мг/мл) в присутствии соединений (n=5 для каждого из агентов) и без него (n=5) на плазме здоровых доноров. Спонтанная агрегационная активность измерялась на плазме крови больных с ИБС (n=10). В исследовании в группе сравнения использовалась кровь 10 добровольцев в возрасте 50-65 лет: 5 человек принимали ацетилсалициловую кислоту (АСК) в дозе 150 мг в сутки и 5 человек принимали клопидогрел в дозе 75 мг в сутки. Оценка агрегационной способности тромбоцитов проводилась по методу G. Born при помощи анализатора «Chrono-Log Corporation» (США).

Определение тромбогенных свойств плазмы крови человека. В спектр исследований коагуляционной активности плазмы были включены: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время (ТВ) в присутствии тиотерпеноидов (n=10 для каждого из соединений) и без них (n=10, контроль). Эксперименты проводились на плазме крови больных с ИБС. Коагуляционную активность определяли с помощью коагулометра «Минилаб-7001» (Россия).

Тромбодинамика плазмы оценивалась на плазме крови больных с ИБС в присутствии терпеноидов (n=5 для каждого из соединений) и без них (n=5) по скорости фибринообразования на приборе «Регистратор тромбодинамики Т-2» (Россия), путем видеорегистрации роста фибринового сгустка в пространстве при активации свертывания от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором (растворимый тромбопластин человека («Ренам», Россия)).

Определение коагуляционных свойств модельных мицелл. Растворы мицелл додецилфосфохолина (DPC) и додецилсульфата натрия (SDS) были приготовлены в соответствии с рекомендациями Caillon и соавт. путем растворения их в соответствующем буфере до конечной концентрации 40 мМ/л [Caillon L., 2013].

Определение микровезикул. Количественное определение микровезикул в препаратах тромбоцитов проводили методом проточной цитометрии, регистрируя число импульсов прямого и бокового рассеяния света. Для этого использовали тромбоконцентрат, получаемый от здоровых доноров.

Атомно-силовая микроскопия. С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучалась морфология поверхности тромбоцитов в интактном и активированном состояниях в присутствии терпеноидов и без них. Состояние тромбоцитов оценивали на сканирующем зондовом микроскопе DimensionFastScan (Bruker) в режиме PeakForce QNM. Кровь здоровых доноров использовалась для получения тромбоконцентрата. Выделенные клетки наносили на предметное стекло и наблюдали спонтанную адгезию тромбоцитов к стеклянной подложке. Фиксирующим агентом был метиловый спирт. После фиксации препарат отмывали с помощью фосфатного буфера и высушивали при 20°C.

Молекулярное моделирование с модельными мембранами. Для определения возможного взаимодействия терпеноидов с фосфолипидами

мембран клеток было проведен расчет молекулярного динамического моделирования при помощи метода классической молекулярной динамики [Humphrey W., 1996]. В качестве модельной мембраны были выбраны мицеллы SDS, как обладающие выраженной коагуляционной активностью. Молекулярно-динамические расчеты производились при помощи программного пакета GROMACS (версия 5.01) и силового поля GROMOS53A6.

ЯМР-спектроскопия в твердой и жидкой фазах. ЯМР исследования высокого разрешения проводились в жидкой и твердой фазах на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III HD-700 с зондом 5 мм, с использованием стандартной программы Bruker TOPSPIN при $T = 300$ К и ЯМР-спектрометре Bruker Avance II-500 (500 МГц (^1H)) с зондом 5 мм при $T = 293$ К. Спектры ЯМР ^1H регистрировали с использованием импульсов под углом 90° , задержки между импульсами 2 с, ширины спектра 12 ppm и минимум восьми сканирований. Для ЯМР-экспериментов соединения растворяли в $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ и D_2O . Объем раствора составлял 0,6 мл. Концентрация соединения составляла 9,4 мМ. Мицеллы SDS и DPC получали растворением порошка SDS/DPC в растворе $(\text{CD}_3)_2\text{CO} + \text{D}_2\text{O}$ до конечной концентрации 10 мМ (выше критической концентрации мицелл). Полное определение спектра ЯМР ^1H соединений было выполнено с помощью ЯМР-экспериментов 2D DOSY, 2D COSY и 2D NOYSY.

Для твердотельных ЯМР-измерений использовали раствор фосфолипидов 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC) и 1-пальмитоил(d31)-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (D-POPC) в трихлорметане. Растворитель выпаривали, а полученную липидную пленку снова растворяли в 500 мкл циклогексана, затем замораживали в жидком азоте и лиофилизировали под вакуумом (~ 150 мкбар). Спектральные данные ЯМР были расшифрованы с использованием метода Маккейба и алгоритма Вассалла.

Молекулярный докинг. С целью выяснения возможного взаимодействия тиотерпеноидов с рецепторами тромбоцитов, определяющими их агрегацию, был проведен молекулярный докинг рецептора P2Y_{12} с терпеноидами в программном обеспечении Autodock 4.2 [Morris G.M. et al., 2009]. Результаты были сопоставлены с проведенным нами докингом активных метаболитов (AM) популярных антиагрегантов – клопидогрела и тикагрелора с рецептором P2Y_{12} .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Концентрация тиотерпеноидов, используемая в экспериментах, была выбрана исходя из результатов определения цитотоксичности на примере терпеноидов – пинанового сульфоксида **5** и борнановой соли **3** как наиболее водорастворимых соединений. Наименьшая цитотоксичность была обнаружена для 2,25 мМ/л концентрации пинанового сульфоксида **5**. Исследование наиболее водорастворимого борнанового соединения **3** также показало низкую цитотоксичность при концентрации менее 2 мМ /л.

На основании полученных данных все последующие исследования по изучению воздействия терпеноидов на функциональную активность тромбоцитов проводились при их концентрации не более 2 мМ/л.

Влияние терпеноидов на агрегационную способность тромбоцитов

Все исследуемые вещества снижали рецепторную активацию тромбоцитов: приводили к практически полному блокированию агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином и арахидоновой кислотой, а также снижали влияние АДФ, коллагена и ристомиина (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние терпеноидов на индуцированную агрегацию тромбоцитов, n – количество измерений, *p<0,05 по отношению к показателям без препарата

Индуктор	Норма, %	Плазма без препарата n=5	Соед.2 n=5	Соед.3 n=5	Соед.4 n=5	Соед.5 n=5	Соед.6 n=5	АСК n=5	Клопидогр ел n=5
АДФ	50-75	54,4± 1,6	7 ± 4*	17.0 ± 5.6*	20± 5.6*	20,1± 5,6*	14 ± 4*	46,3 ± 9,1*	35,1 ± 3,2*
Адреналин	60-71	66,5± 3,5	0*	4 ± 3*	0*	0*	20 ± 5*	36,3 ± 3,1*	51,3 ± 0,7*
Арахидон. к-та	62-69	65,5± 3,5	4 ± 4*	6 ± 4*	0*	0*	18 ± 3*	24,6 ± 2,4*	64,6 ± 2,8
Коллаген	50-75	63,3± 10,2	8 ± 6*	0*	10± 4.2*	10,1± 4,2*	0*	38,4± 14,6*	33,1 ± 0,7*
Ристомин	50-75	66,7± 6,3	20 ± 9*	27 ± 6*	20± 6.4*	20,2± 6,4*	38 ± 6*	48,2 ± 19,1	56,4 ± 9, 8

Антиагрегационные эффекты терпеноидов были более выраженными, чем у клопидогрела и аспирина. Выявленное подавление индуцированной коллагеном агрегации может свидетельствовать и об инактивации GPVI, с одной стороны, а также о блокировании связывания фактора Виллебранда с GPIb-IX-V на поверхности тромбоцитов. Выявленное нами практически полное угнетение индуцированной адреналином агрегации под влиянием исследуемых соединений объясняется не только блокированием выработки тромбоксана A₂, но и снижением проницаемости мембраны, что доказывает важность структуры и клеточной мембраны для агрегационной готовности тромбоцитов при воздействии индукторов.

Кроме того, все тиотерпеноиды практически полностью подавляли агрегацию тромбоцитов, вызываемую и арахидоновой кислотой. Арахидоновая кислота, в отличие от других индукторов, активировать тромбоциты без вовлечения рецепторов тромбоцитов, а путем проникновения через плазматическую мембрану [Шитикова А.С., 2000]. Подавление этого свойства тиотерпеноидами обусловлено их способностью стабилизировать мембраны за счет *ван-дер-ваальсовых* взаимодействий с фосфолипидами клеточных

мембран, что доказывает важное значение стабильности и проницаемости мембран для реализации функциональной активности при воздействии патологических индукторов.

Изоборнеол **6**, не содержащий атома серы, обладает менее выраженным влиянием на индуцированную агрегацию тромбоцитов. Из полученных результатов следует, что биологическая активность исследуемых веществ обусловлена введением в молекулярную структуру терпенов атома серы и связанных через нее различных молекулярных групп, придающих молекулам бифильные свойства. Антиагрегационное влияние исследуемых соединений возможно благодаря их взаимодействию с тромбоцитами путем непосредственного связывания с рецепторами либо в результате опосредованного связывания с мембранными фосфолипидами. Таким образом, серосодержащие тиотерпеноиды обладают способностью ингибировать все значимые для агрегации тромбоцитов типы пуриновых рецепторов, проявляя избирательность в блокировании наиболее мощного индуктора агрегации – коллагена. Выраженное подавление индуцированной АДФ агрегации тромбоцитов свидетельствует об ингибировании рецептора P2Y₁₂ тромбоцитов.

Тесты индуцированной агрегации мы провели и для серии соединений пиненовой структуры **7-9**, полученных на основе миртенола (таблица 2). Соединения **7-9** также обладают статистически значимой способностью подавлять индуцированную агрегацию (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели индуцированной агрегации для соединений **7-9**, * $p < 0.001$ в сравнении с контролем, $n=5$ в каждой из групп

Индуктор	Контроль, %	7, %	8, %	9, %
АДФ	66,5 ± 2.4	34.2 ± ±1.2*	30.4 ± 3.2*	23.4 ± 2.8*
Адреналин	53.8 ± 2.2	8.4 ± 3.8*	10.2 ± 2.6*	2.6 ± 1.8*
Арахидоновая к-та	61.6 ± 1.4	0*	0 *	0*
Коллаген	70.4 ± 4.2	11.6 ± 3.4*	4.4 ± 2.8*	0*
Ристомин	72.7 ± 3.2	30.2 ± 2.4*	20.8 ± 5.2*	42.4 ± 3.8*

Влияние терпеноидов на коагуляционную активность плазмы

Нарушения в системе гемостаза являются одним из звеньев патогенеза ИБС. У таких больных повышаются показатели агрегации тромбоцитов и коагуляционные свойства плазмы в виде снижения АЧТВ и ПВ, причем уровни этих показателей прогрессивно снижаются при обострении ИБС – развитии острого коронарного синдрома.

Все исследованные терпеноиды обладают значительной способностью снижать агрегацию тромбоцитов: спонтанная скорость агрегации достоверно уменьшалась до нормальных значений (таблица 1). Все соединения существенно ингибировали коагуляционные свойства плазмы: АЧТВ повышалось до нормы и увеличивалось ПВ. Однако не было выявлено влияния на активность тромбина (ТВ не претерпевало изменений) (таблица 3). Из

данных экспериментов можно предположить, что синтезированные вещества блокируют как активацию тромбоцитов, так и плазменных факторов свертывания. Исходное соединение **6** - изоборнеол - обладает менее выраженным влиянием на скорость агрегации и не оказывает влияния на показатели коагуляционного гемостаза. Следовательно, именно серосодержащий фрагмент обеспечивает выраженные антикоагуляционные свойства терпеноидов.

Таблица 3 – Влияние тиотерпеноидов на агрегацию тромбоцитов и показатели коагуляционного гемостаза *in vitro* у пациентов с ИБС. n – количество измерений; *p – достоверность <0,05 по сравнению с показателями без препарата

Плазма	Скорость агрегации (отн.ед/мин)	АЧТВ (сек)	ПВ (сек)	ТВ (сек)
Без препарата n=10	0,265±0,191	22,4± 0,4	8,9±0,3	15,5±0,3
Соединение 2 n=10	0.07 ± 0.01*	29.3± 2.5*	10.9 ± 0.5*	15.1 ± 0.2
Соединение 3 n=10	0.05 ± 0.02*	30.9± 1.6*	11,2 ± 0.4*	14.9 ± 0.4
Соединение 4 n=10	0,053±0,022*	27,9± 2,2*	10,8±0,7*	14,9±0,2
Соединение 5 n=10	0,031±0,022*	29,2±1,7*	15,2±2,4*	15,3±0,3
Соединение 6 n=10	0.2 ± 0.1	28.0±1.4*	9.2 ± 0.1	15.0 ± 0.6

Результаты тромбодинамики при добавлении борнанных соединений **2** и **3**, пинанового сульфоксида **5** также свидетельствуют о снижении активации плазменных факторов свертывания. Уменьшались скорости роста фибринового сгустка (V, Vi, Vst), его размер (CS), плотность (D) и исчезали спонтанные сгустки фибрина, а время задержки роста не менялось (таблица 4). Эти показатели практически не зависели от структуры исследуемых соединений, что подтверждает их способность понижать каталитическую активность фосфолипидной поверхности тканевого фактора, не затрагивая собственно его активацию (время задержки не менялось в присутствии тиотерпеноидов, таблица 4).

Подавление каталитической активности присутствующих в растворе микровезикул обуславливает антикоагуляционный эффект. Подобные изменения наблюдаются и при удалении микровезикул из исследуемой плазмы (рисунок 2).

Таблица 4 – Изменения тромбодинамики при добавлении терпеноидов. Примечание. Количество измерений $n=5$, * p – достоверность $<0,05$ по сравнению с плазмой больных ИБС

Плазма, $n=5$	Показатели тромбодинамики					
	v , мкм/мин	T_{lag} , мин	v_i , мкм/мин	v_{st} , мкм/мин	CS, Мкм	D, усл. ед.
Плазма больных ИБС	$39,4 \pm 4,1$	$1,4 \pm 0,5$	$56,4 \pm 0,7$	$39,4 \pm 4,1$	$1390 \pm 35,4$	31871 ± 293
Соед. 2	$23,5 \pm 1,2$ *	$1,5 \pm 0,1$ 5	$42,4 \pm 2,8$ *	$23,5 \pm 1,2$ *	$979 \pm 45,4$ *	22505 ± 344 *
Соед. 3	$24,1 \pm 1,4$ *	$1,6 \pm 0,1$ 2	$43,2 \pm 0,8$ *	$28,0 \pm 0,9$	$898 \pm 34,4$ *	27878 ± 478 *
Соед.5	31.7 ± 2.1	1.2 ± 0.12	$50.9 \pm 0.8^*$	31.7 ± 2.1	$1132 \pm 32.1^*$	$2577 \pm 228^*$
Норм.плазма	20,5-30	0,8-1,5	39,1-54,6	20,5-30	833-1173	14000-32000

Добавление терпеноида **3** в плазму ведет к блокированию процессов образования фибрина, что объясняется снижением каталитической тромбогенной активности микровезикул у больных с ИБС (рисунок 2В).

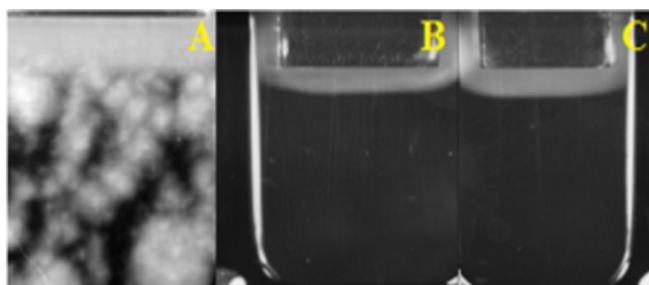


Рисунок 2 – А – плазма больных ИБС после 30 мин фоторегистрации активации коагуляционного гемостаза; В – плазма больных ИБС в присутствии соединения **3**; С – плазма больных ИБС после удаления микровезикул

Динамика количества микровезикул при хранении тромбоконцентрата

Было выявлено, что по мере хранения тромбоконцентратов количество микровезикул повышалось к концу первых суток хранения и к концу третьих суток снижалось, а количество тромбоцитов прогрессивно снижалось на протяжении всего срока хранения. Тиотерпеноиды способны уменьшать количество микровезикул при хранении тромбоконцентрата (таблица 5), что объясняется стабилизирующим действием соединений на мембрану. Это приводит к уменьшению ее текучести и препятствует образованию микровезикул, что позволяет рассматривать эти соединения в качестве агента для стабилизации препаратов крови при хранении тромбоконцентрата.

Таблица 5 – Результаты проточной цитометрии при хранении тромбоконцентрата в присутствии соединения **3**, n – количество образцов, *p- достоверность <0,05 по сравнению с показателями без препарата – контроль

Время инкубации	Количество микровезикул в 1 мкл ($n=5$)			
	Контроль		Соединение 3	
	ТМВ	тромбоциты	ТМВ	тромбоциты
1 ч	59±9	98900 ±120	25±4*	99289±225*
24 ч	2555±400	96700 ± 180	747±150*	97867±350*
48 ч	992±81	96358±90	141±44*	97668±240*
72 ч	56±6	95636±156	19±5*	96911±225*

Подавление функциональной активности тромбоцитов подтверждается данными АСМ. Добавление тиотерпеноидов в тромбоконцентрат приводило к стабилизации мембран тромбоцитов, снижало их адгезию и агрегацию.

Коагуляционная активность модельных мицелл

Нами было выявлено, что мицеллы DPC и SDS обладают каталитической коагуляционной активностью. Мы провели эксперименты с мицеллами SDS, чтобы обосновать использование мицелл в качестве модельных при изучении патологии системы гемостаза. Коагуляционную способность мембраны оценивали на основании теста АЧТВ и сравнивали с активностью плазмы. Коагулянтная способность мицелл SDS при добавлении к плазме (время образования сгустка – 28,7 с), была выше, чем самой плазмы (34,6 с). В присутствии пинанового сульфоксида **4** коагулянтная активность мицелл SDS значительно снижалась (60,9 с).

Результаты молекулярного моделирования с мембранами

Молекулярное динамическое моделирование пинанового сульфоксида **5** с мицеллами SDS показало, что тиотерпеноид погружается гидрофобной частью молекулы внутрь мицеллы SDS, а его гидрофильная часть (меркаптоэтанольный фрагмент) расположена на наружной поверхности мицеллы, выполняя роль своеобразного «якоря» (рисунок 3).

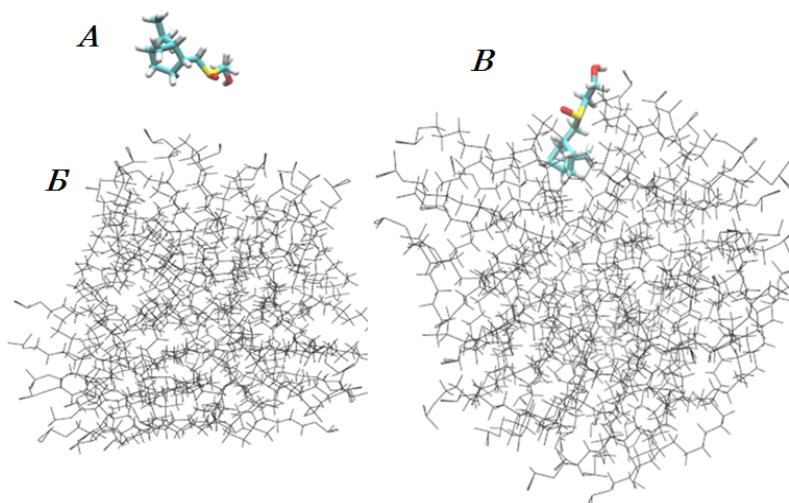


Рисунок 3 – Результаты взаимодействия соединения **5** и SDS-мицеллы. А – молекула соединения **5**; Б – мицелла из SDS-молекул; В – связывание молекулы соединения **5** на поверхности мицеллы после 20 нс моделирования

ЯМР-спектроскопия в жидкой фазе

С целью изучения роли взаимодействия исследуемых соединений с фосфолипидными мембранами в патофизиологии гемостаза нами были проведены ЯМР эксперименты. Необходимо отметить, что есть некоторые ограничения в изучении взаимодействия тиотерпеноидов с модельной фосфолипидной клеточной мембраной с помощью ЯМР. Время протонной поперечной релаксации фосфолипидных мембран слишком мало и приводит к значительному расширению сигналов в спектрах. По этой причине в качестве модельных клеточных мембран были использованы мицеллы SDS и DPC, которые ранее применялись в аналогичных ЯМР-исследованиях [Usachev K.S. et al., 2015; Galiullina L.F. et al., 2017]. Головки полярных групп SDS и DPC могут быть использованы для имитации поверхности клеточной мембраны. Эксперименты с SDS в жидкой фазе проведены для соединения на основе камфена **4** и пинена **5**, с DPC – для соединений борнановой структуры **2**, **3**, **6**, пиненов **7-9**.

^1H ЯМР-спектры соединений значительно изменялись после добавления мицелл, что свидетельствовало о наличии гидрофобного взаимодействия тиотерпеноидов с модельными мембранами.

С целью выявления роли атома серы в проявлении антиагрегационных и антикоагуляционных свойств производных терпеноидов был проведен эксперимент 2D DOSY ЯМР для соединений **7-9**, имеющих аналогичную структуру терпенового остова, но различающихся гетероатомом (кислород, сера, азот). Результаты исследования показали, что мицеллы азотсодержащего соединения **9** и DPC, а также кислородсодержащего соединения **7** и DPC, имеют значительно различающиеся коэффициенты самодиффузии в растворе D_2O $D = (16,360 \pm 1,309) \cdot 10^{-11}$ для соединения **9**, $(13,488 \pm 1,079) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ для соединения **7** и $(9,560 \pm 0,765) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ для D_2O , что позволяет утверждать, что соединения **7** и **9** не связываются с мицеллами DPC, в отличие от серосодержащего соединения **8** с коэффициентом самодиффузии $(9,798 \pm 0,784) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ (рисунок 4).

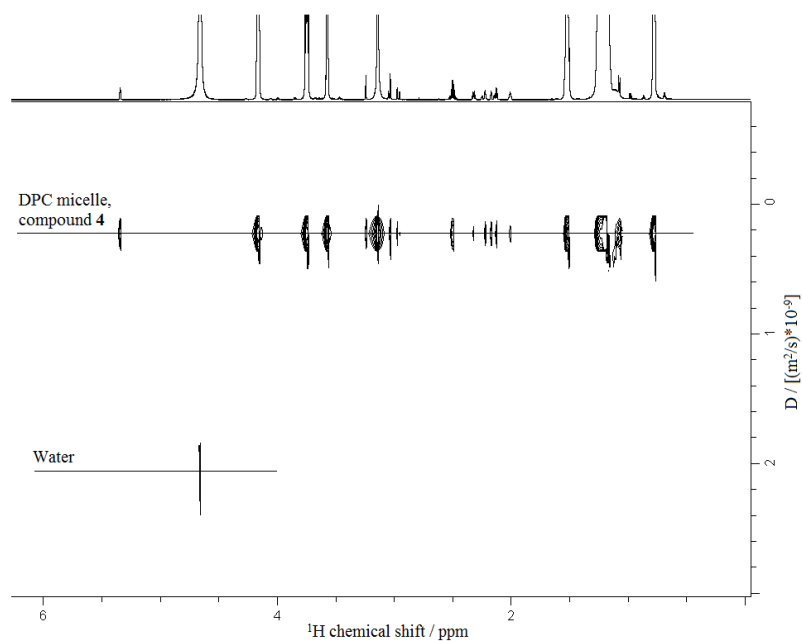


Рисунок 4 – Спектр 2D DOSY ЯМР соединения **8** в растворе DPC / D₂O при температуре 300 K

ЯМР в твердой фазе на примере соединения **3** и **6** выявили основные сайты взаимодействия веществ с мембранами (рисунок 5).

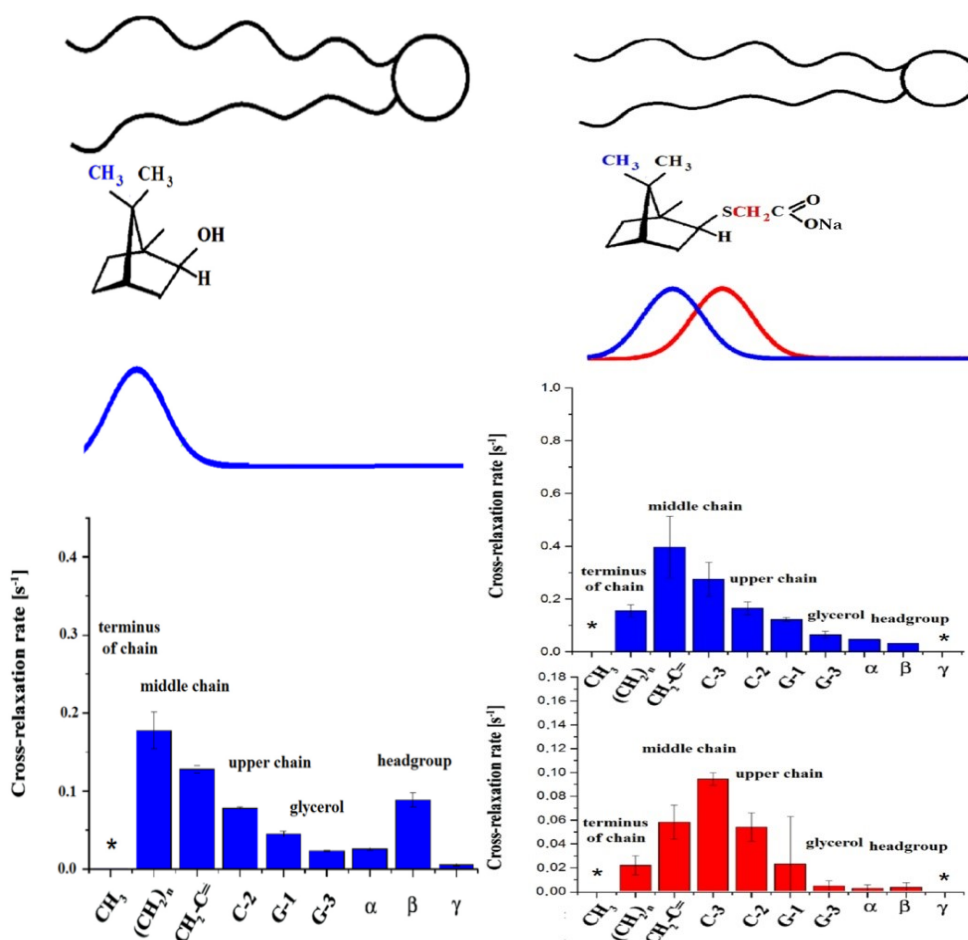


Рисунок 5 – Скорости кросс-релаксации соединения **6** и ROPC (слева) и соединения **3** ROPC (справа)

А именно, для изоборнеола **6** максимум функции распределения группы CH_3 гем-диметильного фрагмента отчетливо обнаруживается глубоко внутри углеводородного ядра мембраны фосфатидилхолина. Для соединения **3** наблюдается аналогичное взаимодействие CH_3 группы гем-диметильного фрагмента с гидрофобной частью мицеллы, при этом имеется дополнительное взаимодействие с тиометиленовой группой. Это свидетельствует о том, что изоборнеол **6** глубоко погружен в гидрофобную часть фосфолипидного фрагмента, тогда как тиотерпеноид **3** расположен ближе к его гидрофильной части и имеет с ним дополнительные взаимодействия, что способствует большей стабилизации мембраны.

Таким образом, наличие самого факта гидрофобного взаимодействия мембран с исследуемыми соединениями было также подтверждено методом ЯМР-спектроскопии, что дает патогенетическое обоснование использования тиотерпеноидов для стабилизации клеточных мембран в патологии системы гемостаза. Изучение спектров выявило не только наличие, но и локусы взаимодействия модельных мицелл SDS, DPC и фосфохолина с терпеноидами, для которых было проведено данное исследование. Данные ЯМР-спектроскопии в жидкой и твердой фазе позволили получить представление об ориентации гидрофильной группы и гидрофобного остова в мембране и значении атома серы в проявлении соединениями антикоагуляционных свойств.

Результаты молекулярного докинга с рецептором P2Y₁₂ тромбоцитов

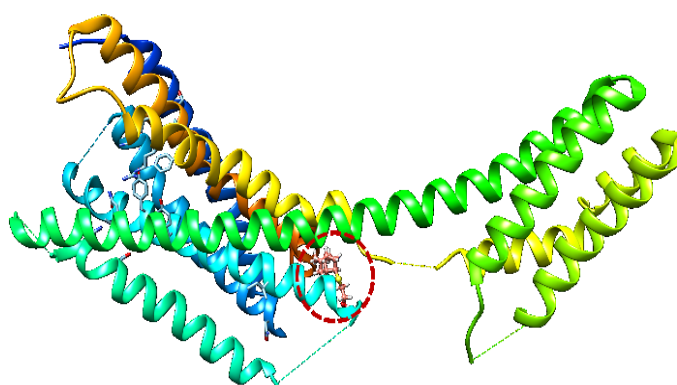
Подавление АДФ-индуцированной агрегации при добавлении тиотерпеноидов в плазму крови, выявленное в тестах индуцированной агрегации, позволило предположить лиганд-рецепторное взаимодействие с рецептором P2Y₁₂ тромбоцитов. Для подтверждения данной гипотезы был проведен эксперимент молекулярного докинга исследуемых веществ с рецептором P2Y₁₂. Результаты были сопоставлены с впервые проведенным молекулярным докингом с популярными антагонистами данного рецептора – клопидогрелом и тикагрелором. Анализ состава аминокислотных остатков гидрофобного кармана, в котором локализуются терпеноиды **1** (рисунок 6), **5** и **7-9**, показал, что все терпеноиды вне зависимости от терпеновой основы и структуры радикала, кроме азотсодержащего соединения **9**, локализуются в структурно-идентичном кармане (таблица 6), аналогичном таковому для клопидогрела. Данный факт позволяет предположить аналогичный клопидогрелу механизм действия на P2Y₁₂ изучаемых соединений.

Таблица 6 – Аминокислотный состав сайтов связывания исследуемых соединений с P2Y₁₂

Лиганд	Аминокислотный состав
Соединение 1	Arg-122, Lys-125, Thr-126, Arg-128, Pro-129, Phe-130, Lys-131, Thr-132, Lys-233, Val-234, Val-238, Leu-301
Соединение 5	ARG122, LYS125, THR126, ARG128, PRO129, PHE130, LYS131, THR132, LYS233, VAL234, LYS237, VAL238, LEU301
Соединение 7	ARG122, LYS125, THR126, ARG128, PRO129, PHE130, LYS131, THR132, LYS232, LYS233, VAL238
Соединение 8	ARG122, LYS125, THR126, ARG128, PRO129, PHE130, LYS131, THR132, LYS233, VAL234, VAL238, LEU301
Соединение 9	ASP1005, GLU1008, THR1009, ASP1012, ASN1013, VAL1016, LYS1032
АМ клопидогрела	ARG-122, LYS-125, THR-126, ARG-128, PRO-129, PHE-130, LYS-131, THR-132, LYS-232, LYS-233, VAL-234, LYS-237, VAL-238, LEU-301
АМ тикагрелора	PRO258, TYR259, THR260, LEU261, SER262, GLN263, THR264, ARG265, ASP266, VAL267, ASP269, ALA272, GLU273, THR275, LEU276

Сравнительный анализ энергий связывания терпеноидов и АМ клопидогрела с P2Y₁₂ показывает, что тиотерпеноиды имеют большее сродство к белку рецептора P2Y₁₂, что и объясняет более выраженный антиагрегантный эффект тиотерпеноидов в тестах индуцированной агрегации.

АМ тикагрелора локализуется вблизи внеклеточной N-концевой области рецептора P2Y₁₂ и имеет значительно более высокое сродство к рецептору P2Y₁₂ (энергия связывания -40,1 кДж • моль⁻¹) (таблица 7), при этом сайт связывания не соответствует сайтам связывания изучаемых нами соединений. Другой сайт взаимодействия объясняется иным механизмом действия данного препарата – он не препятствует связыванию P2Y₁₂ со своим лигандом, но модифицирует внутриклеточный ответ.



Arg-122, Lys-125, Thr-126,
Arg-128, Pro-129, Phe-130,
Lys-131, Thr-132, Lys-233,
Val-234, Val-238, Leu-301

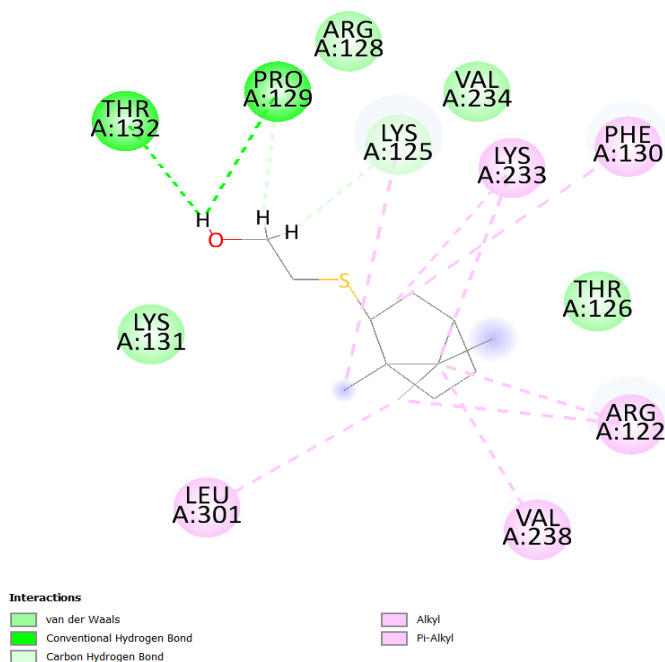


Рисунок 6 – Модель молекулярного докинга и сайтов связывания соединения **1** с P2Y₁₂

Таблица 7 – Результаты значения энергий связывания GoldScore и Chemscore, dG

	GoldScore	ChemScore dG (kJ·mol⁻¹)
Соединение 1	35	-22.1
Соединение 5	60	-29.4
АМ тикагрелола	76	-40,1
АМ клопидогреля	51	-28.6

Кроме того, анализ энергий связывания идентичных по структуре, но различающихся гетероатомами пиненовых соединений **7-9** (рисунок 7) позволил сделать вывод о том, что именно введение атома серы в состав терпеноидов придает большую аффинность к данному рецептору и, как следствие, большую биологическую активность.

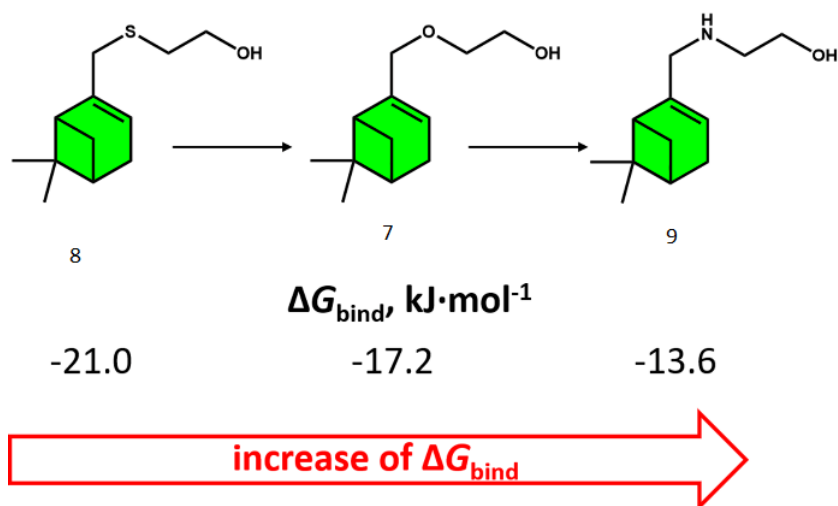


Рисунок 7 – Изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_{bind}) терпеноидов 7-9 при связывании с P2Y₁₂

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая диссертационная работа посвящена изучению механизмов функциональной активации тромбоцитов в процессе сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в присутствии мембранотропных соединений при гиперкоагуляционном состоянии плазмы крови у больных ишемической болезнью сердца. В качестве мембранотропных соединений была использована серия синтезированных нами терпеноидов. В результате исследования были получены данные о подавлении коагуляционной способности плазмы и агрегационной способности тромбоцитов вследствие структурных изменений мембран, вызываемых терпеноидами, и ингибировании рецепторной активации тромбоцитов. Был определен и изучен молекулярный механизм взаимодействия исследуемых соединений с клеточными мембранами на примере модельных мицелл DPC, SDS и фосфохолина методами молекулярного моделирования и ЯМР-спектроскопии. Доказано, что гидрофобные взаимодействия обуславливают снижение каталитической активности мембран тромбоцитов при воздействии различных индукторов. Таким образом, проведенные нами исследования выявили, что структурные изменения клеточных мембран вследствие гидрофобных взаимодействий являются ключевым звеном в функциональной активации тромбоцитов и последующем тромбообразовании при состояниях, сопровождающихся гиперкоагуляцией.

ВЫВОДЫ

1. Мембранотропные соединения терпеновой природы обладают антиагрегационной и антикоагуляционной способностями *in vitro*, что приводит к коррекции гиперкоагуляционного состояния при ишемической болезни сердца.
2. Изменение тромбогенных свойств фосфолипидной поверхности тромбоцитов и стабилизация их морфофункциональной структуры обусловлена

гидрофобными взаимодействиями углеводородного радикала терпеноидов с углеводородными цепями фосфолипидов.

3. Антиагрегационные свойства терпеноидов обусловлены как подавлением рецепторной активации тромбоцитов за счет непосредственного их взаимодействия с рецепторными белками, так и связыванием их с фосфолипидами клеточных мембран.

4. Тиотерпеноиды связываются с рецептором $P2Y_{12}$ тромбоцитов, локализуясь в структурно-идентичном кармане С-концевой области белка вне зависимости от разновидности тиорадикала и терпенового остова молекулы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Гидрофобные взаимодействия с мембраной играют ключевую роль как в активации тромбоцитов, так и в активации плазменного звена гемостаза при гиперкоагуляционном синдроме, что патогенетически обосновывает возможность использования мембранотропных терпеноидов для коррекции нарушений в системе гемостаза.

2. Низкая цитотоксичность исследуемых соединений в сочетании с выраженными антиагрегационными и антикоагуляционными свойствами открывает перспективы создания эффективных лекарственных препаратов на основе терпенов для лечения и профилактики тромботических осложнений.

3. Мембраностабилизирующие свойства тиотерпеноидов, обуславливающие снижение каталитической активности мембран тромбоцитов и тромбогенных микровезикул, обосновывают возможность применения их для стабилизации препаратов крови.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выявленная антиагрегантная и антикоагуляционная активность тиотерпеноидов открывает перспективы их дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных препаратов с антитромботической активностью, для чего требуется планирование и проведение экспериментов *in vivo*. Сложность интегральной оценки системы гемостаза и выявления гиперкоагуляции лабораторными методами *in vitro* обосновывает необходимость продолжения исследований в данном направлении, используя также и другие методы оценки гемостаза, такие как, например, тромбоэластография. Изучение гидрофобных взаимодействий тиотерпеноидов с липидными клеточными мембранами выявляет важное значение стабильности мембраны для чувствительности тромбоцитов к индукторам активации и агрегации. Данный факт обосновывает возможность влияния на функцию клеток не только путем лиганд-рецепторного связывания, но и с помощью трансформационных изменений цитоплазматической мембраны. Многообещающим представляется изучение гидрофобных взаимодействий в патогенезе других систем. Результаты работы открывают возможности поиска новых мишеней для патогенетической коррекции нарушений системы гемостаза и функциональной активности клеток. Перспективным

представляется исследование гидрофобного взаимодействия терпеноидов и с другими типами клеток, принимающими участие в гемостазе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

***1. Гемокоагуляционная активность серосодержащих бициклических монотерпеноидов / С.В. Киселев, Л.Е. Никитина, З.Р. Азизова [и др.] // Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. – 2016. – № 1 (89). – С. 59–64.**

***2. Development of approaches to the study of the interaction of biologically active thioterpenoids with model membranes / L.E. Nikitina, S.V. Kiselev, Z.R. Azizova [et al.] // BioNanoScience. – 2017. – Vol. 7, No. 4. – P. 600–607.**

3. Research in the molecular mechanism of hemocoagulant activity of camphene sulfone / L.E. Nikitina, S.V. Kiselev, Z.R. Azizova [et al.] // Book of abstracts of 12th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. – Tashkent (Uzbekistan), 2017. – P. 234.

4. Исследование мембранотропных свойств серосодержащего соединения пинанового ряда / А.А. Рахматуллина, С.В. Киселев, З.Р. Азизова [и др.] // Химия и технология растительных веществ : сборник трудов X Всероссийской научной конференции. – Казань, 2017. – С. 252.

5. Research in the molecular mechanism of coagulation activity of sulfur-containing monoterpenoids of pinane series / Z.R. Azizova, S.V. Kiselev, L.E. Nikitina [et al.] // ASCB-EMBO 2017 meeting. Abstracts: poster presentations. – Philadelphia (USA), 2017. – P. 3495.

***6. Sulfur-containing monoterpenoids as potential antithrombotic drugs: Research in the molecular mechanism of coagulation activity using pinanyl sulfoxide as an example / L.E. Nikitina, S.V. Kiselev, Z.R. Azizova [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – Vol. 9. – P. 116.**

7. Sulfur-containing monoterpenoids as potential antithrombotic drugs: research in the molecular mechanism of coagulation activity / L.E. Nikitina, S.V. Kiselev, Z.R. Azizova [et al.] // 19th Tetrahedron Symposium. – Italy (Riva del Garda), 2018. – P. 07.

***8. Structural details on the interaction of biologically active sulfur-containing monoterpenoids with lipid membranes / L.E. Nikitina, V.A. Startseva, Z.R. Azizova [et al.] // Journal of Molecular Liquids. – 2020. – Vol. 301. – P. 112366.**

* – работа опубликована в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

DPC – додецилфосфохолин
D-POPC – 1-пальмитоил(d31)-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
POPC – 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
SDS – додецилсульфат натрия
АДФ – аденозиндифосфат
АМ – активный метаболит
АСМ – атомно-силовая микроскопия
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ПВ – протромбиновое время
ТВ – тромбиновое время
ЯМР – ядерно-магнитный резонанс