

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

На правах рукописи

Азизова Зульфия Рашидовна

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

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент

Киселев Сергей Васильевич

Научный консультант:

Доктор химических наук, профессор

Никитина Лилия Евгеньевна

Казань – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Общее представление о системе гемостаза.....	12
1.2. Структура и функция тромбоцитов.....	14
1.2.1. Периферическая зона.....	15
1.2.2. Зона гель-золь.....	17
1.2.3. Зона органелл.....	17
1.2.4. Мембранные системы.....	19
1.2.5. Гранулы тромбоцитов.....	20
1.2.6. Поверхностные гликопротеины тромбоцитов.....	25
1.3. Пути активации тромбоцитов	30
1.3.1. Тромбин	31
1.3.2 Аденозиндифосфат	32
1.3.3. Аденозинтрифосфат	34
1.3.4. Тромбоксан A ₂	34
1.4. Рецепторный аппарат тромбоцитов.....	35
1.4.1. Рецепторы, связанные с протеином G	35
1.4.2. Рецепторы, активированные протеиназой	36
1.4.3. Пуриновые рецепторы.....	36
1.5. Формирование каталитической фосфолипидной поверхности тромбоцитов как механизм реализации тромбогенной активности клеточных мембран.....	40
1.5.1. Асимметричное распределение фосфолипидов.....	41
1.5.2. Роль асимметрии мембран в реализации тромбогенных свойств.....	42
1.5.3. Липидные рафты в мембране тромбоцитов.....	43
1.6. Роль мембранных фосфолипопротеидных микровезикул в	

регуляции свертывания крови	45
1.6.1. ТМВ при гемостазе и тромбообразовании.....	48
1.6.2. ТМВ и побочные реакции при переливании крови.....	50
1.7. Роль тромбоцитов в патогенезе различных заболеваний.....	52
1.7.1. Тромбоциты и сахарный диабет 2 типа	53
1.7.2. Тромбоциты и атеросклероз.....	54
1.7.3. Тромбоциты и преэклампсия.....	58
1.7.4. Тромбоциты и COVID-19.....	58
1.8. Современные подходы к коррекции функциональных нарушений тромбоцитов	60
1.9. Современные подходы к коррекции плазменно- коагуляционного звена гемостаза.....	63
1.10. Терпены и возможность их влияния на процесс инициирования системы гемостаза.....	66
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	68
2.1. Объект и предмет исследования	68
2.2. Производные терпеноидов	69
2.3. Определение цитотоксичности терпеноидов	71
2.3.1. Приготовление рабочих растворов для MTS-теста.....	72
2.3.2. Культивирование клеток для MTS-теста.....	72
2.4. Получение венозной крови и плазмы крови человека.....	73
2.5. Определение агрегационной способности тромбоцитов	74
2.6. Определение тромбогенных свойств плазмы крови человека....	75
2.6.1. Определение поверхностно-зависимых стандартных коагуляционных тестов.....	75
2.6.2. Определение тромбодинамики.....	76
2.6.3. Определение коагуляционных свойств модельных мицелл	77
2.7. Определение микровезикул.....	78
2.8. Атомно-силовая микроскопия	79

2.9. Молекулярное моделирование с модельными мембранами.....	80
2.10. ЯМР-спектроскопия в твердой и жидкой фазах.....	81
2.11. Молекулярный докинг.....	81
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	83
3.1. Результаты исследования цитотоксичности.....	83
3.2. Влияние терпеноидов на агрегационную способность тромбоцитов.....	84
3.3. Влияние терпеноидов на коагуляционную активность плазмы	88
3.4. Влияние тиотерпеноидов на процесс тромбодинамики.....	90
3.5. Динамика количества микровезикул при хранении тромбоконцентрата.....	94
3.6. Атомно-силовая микроскопия поверхности тромбоцитов.....	96
3.7. Коагуляционная активность модельных мицелл.....	97
3.8 Результаты молекулярного моделирования с мембранами.....	98
3.9. Результаты ЯМР-спектроскопии	99
3.9.1. ЯМР-спектроскопия в жидкой фазе.....	99
3.9.2. ЯМР-спектроскопия в твердой фазе.....	109
3.10. Результаты молекулярного докинга с рецептором P2Y ₁₂ тромбоцитов.....	113
3.10.1. Молекулярный докинг с целью изучения влияния гетероатома в составе терпеноидов.....	119
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	135
ВЫВОДЫ	137
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	173

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Изменения в системе свертывания крови являются одними из основных элементов в развитии многих заболеваний. Нарушения в системе гемостаза - ключевое звено патогенеза многих сердечно-сосудистых, цереброваскулярных, иммунных, инфекционных заболеваний [8, 11, 39, 96, 122].

Проблемы профилактики и лечения протромбогенных состояний обуславливают необходимость продолжения исследований молекулярных основ активации системы гемостаза и новых возможностей их коррекции. К сожалению, имеющийся арсенал современных гемоактивных препаратов не обеспечивает полную и эффективную профилактику и лечение тромбозов. Резистентность к аспирину – необратимому блокатору фермента циклооксигеназы и ингибитору синтеза тромбоксана A₂ – по данным различных авторов оценивается от 5 до 45% [6]. Степень резистентности или гипореактивности к клопидогрелу – ингибитору одного из наиболее изученных рецепторов тромбоцитов P2Y₁₂ – колеблется от 20 до 45% [38]. Многие современные исследования посвящены поиску новых препаратов с антиагрегационным эффектом с рецептор-ассоциированным механизмом действия [3, 4, 34]. Недостаточная эффективность применяемых в настоящее время антиагрегантов объясняет необходимость исследования механизмов активации системы гемостаза при протромботических состояниях и поиска новых потенциальных мишеней воздействия для коррекции этих нарушений.

Многие патологические процессы оказывают влияние на систему гемостаза преимущественно через повреждение эндотелия (например, атеросклероз, преэклампсия беременных и др.) [196]. Эндотелиальная дисфункция посредством различных индукторов активирует рецепторы тромбоцитов и, тем самым, приводит к их адгезии и агрегации при различных воспалительных состояниях и инфекционных заболеваниях [146, 209]. Например, эндотоксины, попадающие в кровоток из кишечника, обладают активирующим влиянием на гемостаз [10, 24,

49, 51]. Их избыток в общем кровотоке индуцирует воспаление [1, 5, 23, 30, 37, 47-50], участвует в атерогенезе [2, 7, 10, 32, 35, 41] и патогенезе аутоиммунных заболеваний [13, 31], женского бесплодия [5], эндогенных психозов [30], хронических вирусных заболеваний [22, 23, 36, 45, 46] и геморрагических послеоперационных осложнений [24, 42-44]. Вся перечисленная патология сопровождается нарушениями системы гемостаза (различной степени выраженности), одним из важных аспектов патогенеза которых является тромбоцитарное звено. Большая часть исследований в настоящее время направлена на изучение ингибирования рецепторной активации тромбоцитов, однако при этом не учитывается роль и особенности трансформации клеточных мембран в активации сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза.

Очевидно, вещества, способные воздействовать как на активность клеточных рецепторов, так и на тромбогенные свойства фосфолипидной поверхности клеточных мембран, являются перспективными агентами, которые могут стать основой для создания лекарственных средств, обладающих большей эффективностью. Мы предположили, что такими свойствами могут обладать соединения, полученные на основе терпенов. Известно, что терпены способны изменять механические свойства клеточных мембран [86]. Их амбифильные и жесткие молекулы вступают в *ван-дер-ваальсовы* взаимодействия с фосфолипидами клеточных мембран, что приводит к их стабилизации и, тем самым, может оказать влияние на протромбогенную активность мембран.

Степень разработанности темы

Большая часть исследований в настоящее время направлена на изучение рецепторной активации тромбоцитов [80, 106, 110, 120], 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 [68]. 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 при патогенетической коррекции гиперкоагуляционных состояний.

Задачи исследования:

1. Изучить антикоагуляционные и антиагрегационные свойства синтезированных тиотерпеноидов в плазме крови человека с ишемической болезнью 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 $P2Y_{12}$ тромбоцитов в сравнении с другими антагонистами методом молекулярного докинга.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные нами результаты расширяют представления о молекулярном механизме гемостаза в условиях гиперкоагуляции и показывают возможность использования мембранотропных соединений для коррекции нарушений в этой системе. Результаты исследования иллюстрируют роль трансформации мембран в процессах инициации и активации свертывания крови. 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.

Методы и методология исследования

В работе применялись следующие методы 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 ядерного магнитного резонанса (ЯМР) 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 и работе 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).

Реализация результатов работы

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедр общей и органической химии, общей патологии и в научно-исследовательской работе лабораторий кафедр общей патологии, общей и органической химии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России для дальнейшего изучения механизмов активации тромбоцитов и влияния тиотерпеноидов на патогенетические аспекты гемостаза.

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.

Связь работы с базовыми научными программами

Эксперименты, выполненные в рамках настоящей диссертационной работы, проводились при финансовой поддержке грантов:

1. Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 18-29-06008 и 18-03-00255 под эгидой поддержки ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (КФУ) в повышении его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.
2. ЯМР-исследование на базе КФУ проводилось при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проекты 01201260481, 007720190033 и 01200950825) и в рамках гранта Совета по грантам Президента РФ (проект МК-1409.2019.3).
3. ЯМР-исследование в Германии проводилось под руководством Н.А. Scheidt в рамках гранта Deutsche Forschungsgemeinschaft (проект SCHE 1755/4-1DFG, German research foundation).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие представления о системе гемостаза

Свертывание крови представляет собой сложный биологический процесс, предупреждающий потерю жидкости и белков из сосудистой системы в случае ее повреждения различными факторами. Этот процесс, объединенный термином гемостаз, включает в себя несколько стадий: сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, коагуляционный гемостаз, антикоагулянтная система и фибринолиз (рисунок 1) [85].

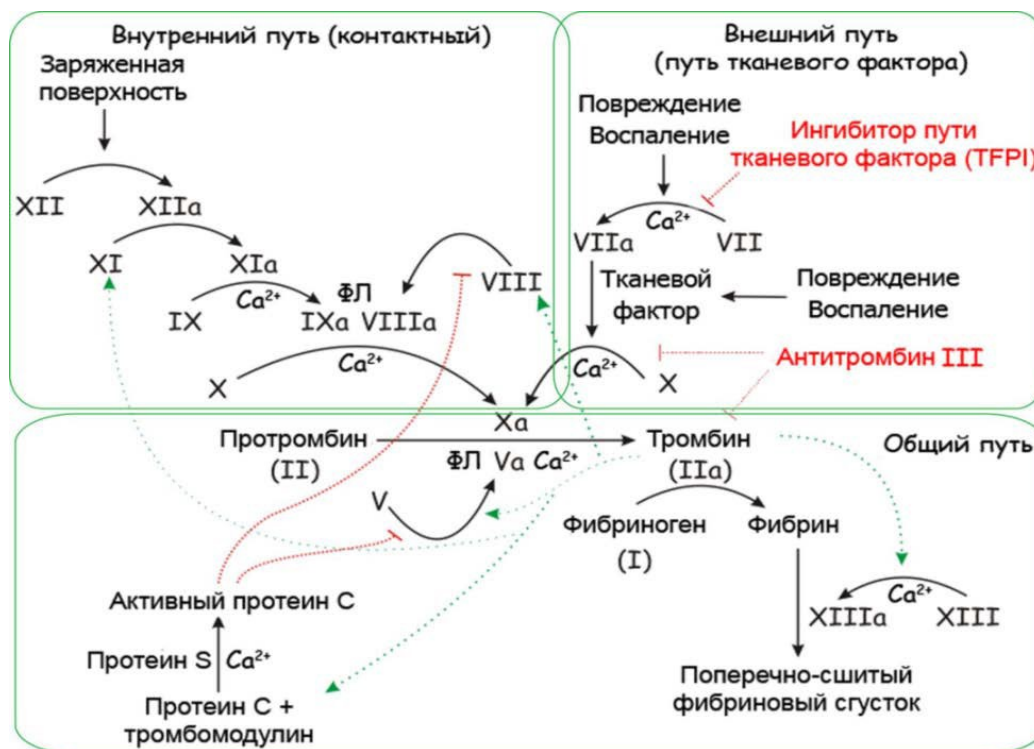


Рисунок 1 – Схема свертывания крови

Первый этап – сосудисто-тромбоцитарный – заключается в формировании тромбоцитарной пробки, возникающей в результате нарушения целостности и функции эндотелия сосудов в результате травмы, атеросклероза, диабетических изменений, инфекции и других патологических состояний [70]. После повреждения сосудистой стенки эндотелиальными клетками и мегакариоцитами

высвобождается фактор Виллебранда (ФВ), который опосредует последующую адгезию тромбоцитов к поврежденной сосудистой поверхности и агрегацию.

Вторая стадия – плазменный гемостаз – включает в себя активацию различных плазменных проэнзимов в их активную форму. Этот каскад свертывания является регуляторным процессом системы свертывания, инициируемым внешним и внутренним путями [157]. Внешний путь инициируется фактором III (тканевым фактором) – мембраносвязанным гликопротеином, который присутствует в субэндотелиальных тканях, фибробластах и активированных моноцитах. Тканевой фактор (ТФ) активируется в результате нарушения целостности эндотелиального слоя или повреждения сосудов. ТФ связывается с фактором VII и посредством ионов кальция преобразует фактор X в активированный фактор Xa [77].

Внутренний путь является результатом активации фактора XI фактором XII, высокомолекулярным кининогеном и прекалликреином. Активированный XIa затем активирует фактор IX. Активированный фактор IXa в сочетании с его кофактором (фактор VIII) приводит к активации фактора X [77, 121].

Каскад коагуляции имеет общий путь, который соединяет внутренние и внешние пути. Активированный фактор Xa с его кофактором (фактор V) при воздействии ионов кальция, мембранных фосфолипидов тромбоцитов преобразует протромбин в тромбин. Тромбин расщепляет циркулирующий фибриноген до фибрина и активирует фактор XIII, который связывает фибрин, приводя к образованию стабильного сгустка.

Следующей стадией процесса свертывания является прекращение образования сгустка под воздействием антикоагулянтной системы, которая предназначена для предотвращения и контроля тромбообразования. Эта фаза в процессе свертывания обеспечивает текучесть крови и предотвращает неконтролируемое образование тромбов [157].

Растворение сгустка путем фибринолиза является последней стадией свертывания крови. Этот этап обеспечивает удаление сгустка плазмином и является важным звеном в заживлении ран и ремоделировании тканей.

Необходимо отметить, что разделение этапов свертывания крови является условным и все процессы могут протекать *in vivo* одномоментно. Теория непрерывной внутрисосудистой коагуляции была сформулирована выдающимся российским ученым в 1961 г. Д. М. Зубаириным и не теряет свою актуальность и в настоящее время, составляя основу современных данных о системе гемостаза [16-16]. Огромный вклад в представления о процессах свертывания крови внесены К. Раби [33], которым были подробно описаны все аспекты патофизиологии рассеянной внутрисосудистой коагуляции (в настоящее время чаще называемой диссеминированным внутрисосудистым свертыванием - ДВС), постулированной при парентеральном введении эндотоксина кроликам.

1.2. Структура и функция тромбоцитов

Тромбоциты – это самые маленькие клетки крови, их количество у здоровых людей составляет от 150 до $350 \cdot 10^9/\text{л}$ (рисунок 2) [40, 208]. Способность тромбоцитов адгезировать к поврежденной стенке сосуда и образовывать агрегаты была впервые описана в XIX веке Bizzozzero [74, 98]. Ежедневно в норме из мегакариоцитов костного мозга в процессе гемопоэза вырабатывается около 200 миллиардов тромбоцитов. Тромбоциты не имеют клеточного ядра. Срок жизни тромбоцитов в организме составляет 8–11 суток, затем они разрушаются в печени, легких и селезенке. Основной путь поддержания жизнедеятельности тромбоцитов – анаэробный гликолиз.

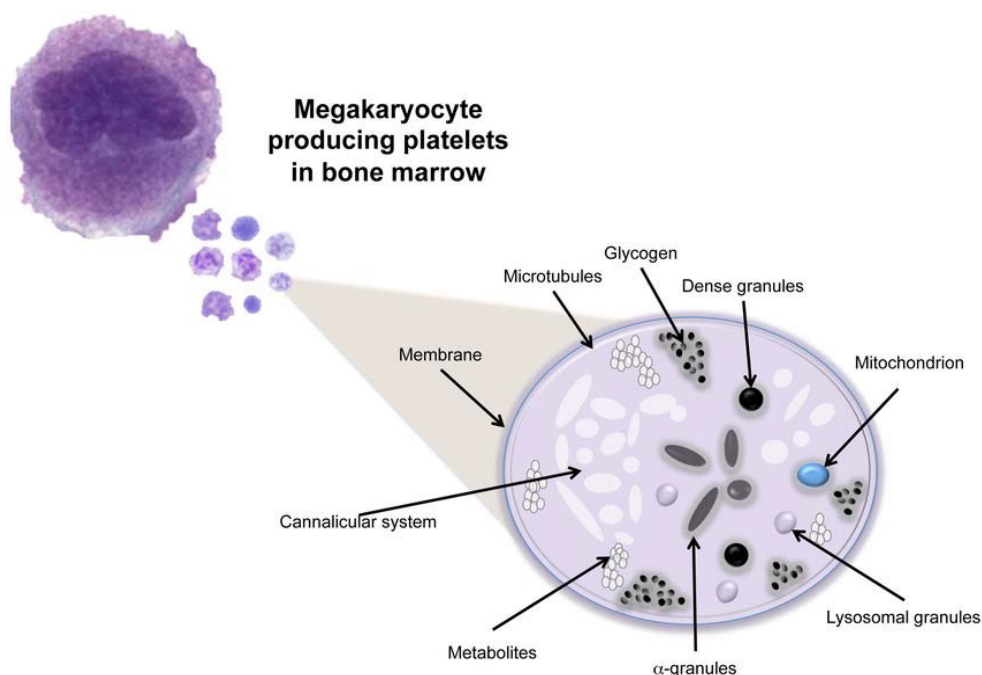


Рисунок 2 – Строение тромбоцита [192]

Помимо давно установленной роли в тромбообразовании и гемостазе, тромбоциты опосредуют и многие другие патологические состояния, включая воспаление и атерогенез [194], противомикробную защиту [113], опухолевый рост и метастазирование [29, 123].

Тромбоциты имеют средний диаметр от 2 до 5 мкм, толщину 0,5 мкм и объем клетки от 6 до 10 мкм³ [67]. Для удобства структура тромбоцитов может быть концептуально разделена на периферическую зону, золь-гель зону, зону органелл и мембранные системы [255].

1.2.1 Периферическая зона

Плазматическая мембрана тромбоцитов в покое относительно гладкая и имеет более толстый гликокаликс (покрытие гликопротеидами, полисахаридами, гликолипидами), чем другие клетки крови. При электронной микроскопии с высоким разрешением мембрана имеет множественные крошечные складки и случайным образом распределенные отверстия открытой канальцевой системы [248]. Гликокаликс в качестве наружного покрытия тромбоцитов представляет собой динамическую структуру и играет роль в первичном контакте с

окружающей микросредой. Гликокаликс состоит из поверхностных гликопротеидов, необходимые для взаимодействия тромбоцитов с субэндотелиальными структурами поврежденной сосудистой стенки. В частности, мобильные комплексы рецептора гликопротеина Ib (GPIb)-IX-V и интегрина $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в избытке экспрессируются на поверхности покоящихся тромбоцитов и имеют большое значение в гемостазе [59].

Под гликокаликсом находится липидная мембрана, состоящая из двух слоев липидов, не имеющая способности к растяжению. Следовательно, клеточная мембрана для обеспечения ее подвижности в процессе активации тромбоцитов должна быть обеспечена крошечными складками поверхности и внутренними мембранными частями открытой канальцевой системы. Липидный бислой морфологически похож на мембраны других типов клеток, принимающих участие в свертывании крови. Такие клетки могут переносить на своей поверхности ТФ, который при воздействии на поверхность неактивного тромбоцита вступает в контакт с отрицательно заряженным фосфатидилсерином (ФС), появляющимся после активации тромбоцитов [236]. Впоследствии активированные тромбоциты высвобождают микровезикулы, содержащие ТФ и способные связывать факторы свертывания Va, VIIa и Xa с ФС, расположенным на поверхности тромбоцитов. Благодаря взаимодействию этих факторов свертывания с ТФ усиливается выработка тромбина на поверхности активированных тромбоцитов, а также на тромбоцитарных микровезикулах [255].

Субмембранная область тромбоцитов находится непосредственно под липидной мембраной и имеет большое значение для функции тромбоцитов. Она содержит систему тонких актиновых нитей – сократительный цитоскелет, который необходим для изменения формы тромбоцитов и транслокации рецепторов и частиц на поверхность тромбоцитов [257]. В субмембранной области цитоплазматические домены всех трансмембранных рецепторов взаимодействуют с белками, многие из которых связаны с кальмодулиновыми, миозиновыми и актиновыми нитями, которые составляют цитоскелет [132]. Таким

образом, они регулируют сигнальные процессы, необходимые для активации тромбоцитов.

1.2.2. Зона гель-золь

Прозрачная, но вязкая матрица внутри тромбоцитов называется зоной золь-гель. Она напоминает жидкий гель и содержит организованные микротрубочки и микрофиламенты, случайным образом распределенный гликоген, покрытые клатрином гладкие пузырьки, а также секреторные органеллы. Микротрубочки расположены по окружности витками близко к клеточной стенке, образуя тем самым систему, поддерживающую мембранный сократительный цитоскелет. Различные экспериментальные подходы убедительно свидетельствуют о том, что микротрубочки необходимы для поддержания дисковидной форма тромбоцитов. Актиновые микрофиламенты в золь-гель зоне формируют цитоплазматический цитоскелет из актиновых нитей – матрицу, в которой подвешены все органеллы и которая отделяет органеллы друг от друга и от клеточной стенки в покоящемся тромбоците [114].

После активации тромбоцитов цитоплазматическая актиновая система сжимает спирали микротрубочек, перемещая α -гранулы и плотные гранулы, что в конечном итоге может привести к секреции их содержимого через открытую канальцевую систему [251].

1.2.3. Зона органелл

В тромбоцитах присутствуют три основных типа секреторных органелл: α -гранулы, плотные гранулы и лизосомы. Кроме того, тромбоциты содержат митохондрии, которые важны для их энергетического метаболизма, и гликосомы [254], электронно-плотные цепи и кластеры [249, 250], микротрубочки [253]. α -Гранулы имеют шаровидную или овоидную форму диаметром от 200 до 500 нм. В среднем тромбоцит человека содержит 50-80 α -гранул. Они являются наиболее многочисленными органеллами [150]. В интактных тромбоцитах α -гранулы отделены друг от друга цитоплазматическим актиновыми микрофиламентами.

Слияние α -гранул при длительном хранении тромбоцитов является первым признаком повреждения клеток. *In vivo* слияние α -гранул, приводящее к формированию гигантских α -гранул, наблюдаются у пациентов с синдромом Париса–Труссо–Якобсена [179] и синдромом серых тромбоцитов [175, 210, 253]. Субмембранная зона α -гранул содержит фактор Виллебранда. В периферической зоне α -гранул обнаружены различные белки, включая синтезируемые мегакариоцитами протеины, такие как фактор V, тромбоспондин, Р-селектин и ФВ, а также белки, синтезируемые вне тромбоцитов (например, фибриноген). Центральная зона α -гранулы выглядит более плотной, чем ее периферическая зона, что потенциально указывает на присутствие белков в комплексе с тяжелыми металлами [255].

В каждом тромбоците содержится от трех до восьми плотных гранул, проявляющих большую морфологическую изменчивость, по размеру меньших, чем α -гранулы. Для них характерна электронно-плотная структура. Помимо адениновых нуклеотидов, таких как аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ), плотные гранулы содержат серотонин, пирофосфат, кальций и магний. Другими электронно-непрозрачными структурами в цитоплазме являются цепочки и скопления шестиугольных кластеров, которые присутствуют в 2-22 % тромбоцитов человека и, по-видимому, увеличиваются в количестве с возрастом. Происхождение и функция этих образований остаются неизвестными. Ранее предполагалось, что электронно-плотные цепи и кластеры представляют собой предшественников плотных гранул, но эта гипотеза была отвергнута после изучения пациентов с заболеваниями пула хранения, у которых в тромбоцитах отсутствовали плотные гранулы, в то время как они содержали обычное количество цепей и кластеров [250].

Тромбоциты также содержат 1-2 сферической формы лизосомы, которые немного меньше α -гранул. Они содержат кислые гидролазы, катепсин D и E и лизосомально-ассоциированный мембранный белок. Лизосомы способны к секреции в ответ на сильную стимуляцию тромбоцитов *in vitro*. Однако роль

лизосом тромбоцитов в свертывании крови остается неясной и требует дальнейшего изучения [220].

Еще одним компонентом зоны органелл тромбоцитов являются гликосомы. Гликосомы содержат гликоген, имеют округлую или овоидную форму и размер, аналогичный α -гранулам. Поэтому гликосомы легко спутать с α -гранулами, содержащими гликоген [254, 255].

И, наконец, числу органелл относятся митохондрии. Несмотря на их малое количество, они обеспечивают энергетические потребности клетки и функцию тромбоцитов при блокаде анаэробного гликолиза. Хотя некоторые авторы также рассматривают митохондрии в качестве важных поставщиков кальция, другие исследователи приписывают главную роль плотной канальцевой системе и внеклеточному кальцию в качестве основных источников кальция при активации тромбоцитов [214].

1.2.4. Мембранные системы

Помимо наружной плазматической мембраны, мембранные системы в тромбоцитах человека включают комплексы Гольджи, соединенную с поверхностью открытую канальцевую систему, плотную трубчатую систему и эндоплазматический ретикулум.

Остатки мегакариоцитарных комплексов Гольджи наблюдаются менее чем в 1% нормальных тромбоцитов человека, но чаще встречаются у пациентов с определенными гипогранулярными нарушениями тромбоцитов [252].

Открытая канальцевая система является частью поверхностной мембраны тромбоцитов, которая простирается внутрь тромбоцитов и при этом образует трубчатую структуру, выполняющую три основные функции. Через эти каналы возможна транспортировка компонентов плазмы, таких как фибриноген, α -гранулы, а также канальцевая система может служить путем высвобождения содержимого гранул во время активации тромбоцитов [255]. Кроме того, каналы открытой канальцевой системы могут быть эвакуированы на поверхность тромбоцита, обеспечивая таким образом увеличение площади мембран,

необходимое для адгезии тромбоцитов к поврежденной стенке сосуда. Благодаря этому механизму активированные тромбоциты способны увеличивать площадь своей поверхности более чем в четыре раза по сравнению с дискоидными тромбоцитами в состоянии покоя [256].

Плотная канальцевая система представляет собой остаток гладкой эндоплазматической сети мегакариоцита и состоит из каналов, случайным образом расположенных в цитоплазме тромбоцитов. Каналы отделены от канальцев открытой канальцевой системы, которые при электронной микроскопии кажутся пустыми и, в отличие от них, содержат аморфное вещество, по непрозрачности напоминающее окружающую цитоплазму.

Каналы грубого эндоплазматического ретикулума видны только у пациентов с быстрым метаболизмом тромбоцитов из-за иммунной тромбоцитопении и обычно усеяны рибосомами [255].

1.2.5. Гранулы тромбоцитов

Гранулы тромбоцитов были впервые описаны в конце XIX века. В 1966 году было выявлено, что гранулы гетерогенны – тогда впервые были описаны α -гранулы. В 1967 с помощью метода электронной микроскопии отличили α -гранулы от лизосом [238].

Образование гранул тромбоцитов начинается в мегакариоците и продолжается в циркулирующем тромбоците [255]. Белки в составе α -гранул образуются в результате синтеза и эндоцитоза. Синтезированные белки транспортируются из эндоплазматической сети в комплекс Гольджи, где они упаковываются в незрелые гранулы, а плазменные белки попадают в мегакариоциты и зрелые тромбоциты путем эндоцитоза [134]. Гранулы, синтезированные в мегакариоцитах, транспортируются в формирующиеся тромбоциты по дорожкам из микротрубочек.

Плотные гранулы – органеллы тромбоцитов, связанные с лизосомами. Они образуются в эндосомальной системе [200]. Во время мегакариопоеза плотные

гранулы появляются одновременно с α -гранулами, но их плотность увеличивается по мере созревания из-за более активной работы мембранного насоса [255].

Плотные гранулы тромбоцитов содержат высокие концентрации адениновых нуклеотидов, а именно АДФ и АТФ, нуклеотидов урацила и гуанина, ионы кальция и калия. Кроме того, в плотных гранулах тромбоцитов присутствуют полифосфаты и биологически активные амины, такие как серотонин и гистамин [135]. pH, равное приблизительно 5.4, в плотных гранулах тромбоцитов обеспечивается работой H^+ -АТФазной протонной помпы. GPIb, интегрин $\alpha IIb\beta 3$, CD63 (гранулофизин) и лизосомально-ассоциированный мембранный протеин (LAMP) -2 относятся к числу мембраносвязанных белков, обнаруженных в плотных гранулах [195, 255].

α -Гранулы содержат связанные с мембраной и растворимые белки, которые участвуют в различных процессах, включая клеточную адгезию, гемокоагуляцию, воспаление, рост клеток и противомикробную защиту. После активации тромбоцитов белки гранул, связанные с мембраной, экспрессируются на поверхности тромбоцитов, в то время как растворимые белки из гранул высвобождаются в плазму. Большинство связанных с мембраной белков присутствует уже на поверхности покоящихся тромбоцитов – например, интегрин $\alpha IIb\beta 3$, белки рецепторов иммуноглобулина – гликопротеин VI (GPVI), Fc-рецепторы (FcR), комплекс GPIb-IX-V, тетраспанины, CD36 и глюкозный транспортёр типа 3 [199, 175]. Однако некоторые связанные с мембраной белки, включая фибронектин L, CD109 и P-селектин экспрессируются исключительно на поверхности активированных тромбоцитов [199]. Поэтому P-селектин широко используется как чувствительный маркер активации тромбоцитов (рисунок 3) [163].

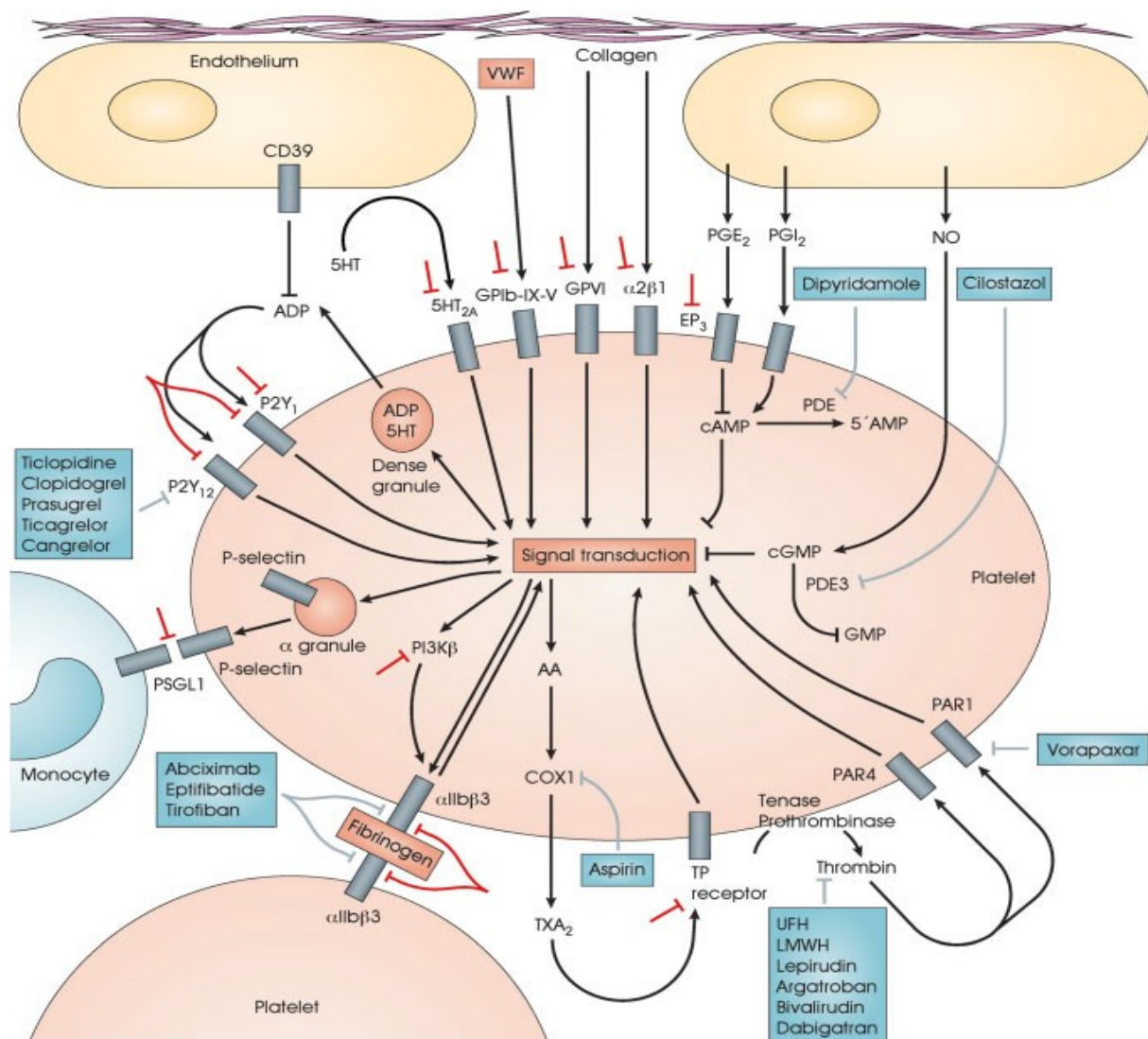


Рисунок 3 – Функция тромбоцитов и молекулярные мишени
антитромбоцитарных агентов [163]

Белки, высвобождаемые из тромбоцитов, могут быть секретированы из различных гранул тромбоцитов, экзосом или появляться в результате расщепления первоначальных поверхностно-связанных белков. Протеомный анализ выявил более 300 растворимых белков, высвобождаемых α -гранулами [84]. Многие из высвобождаемых гранулами белков также обнаружены в плазме крови человека, что вызывает вопросы о том, как компоненты α -гранул отличаются от их аналогов в плазме по структуре и функциям.

На рисунке 3 представлена схема активации и мишени воздействия тромбоцитов. Начальная адгезия тромбоцитов к поврежденным стенкам сосудов

начинается со связывания коллагена с GPVI и $\alpha 2\beta 1$, связыванием ФВ с комплексом GPIb-IX-V. Он может активироваться и другими лигандами (тромбоспондином, коллагеном и Р-селектином), интегрином лейкоцитов $\alpha M\beta 2$ и прокоагулянтными факторами (тромбином, кининогеном, фактором XI и XII). Тромбин активирует рецепторы PAR-1 и PAR-4 [105]. АДФ из плотных гранул активирует $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$, серотонин стимулирует $5HT_{2A}$ -рецепторы, а тромбоксан A_2 (TXA₂) – рецептор тромбоксана. Агрегация тромбоцитов опосредуется фибриногеном, а также связыванием ФВ с активированным интегрином $\alpha IIb\beta 3$ [163].

Лизосомы тромбоцитов содержат протеазы: катепсины, эластазу и коллагеназу; ферменты, разрушающие углеводы: глюкозидазу и галактозидазы; кислую фосфатазу в качестве фермента расщепления фосфатных эфиров. LAMP-1, LAMP-2 и CD63 находятся в лизосомальной мембране в гликозилированном состоянии и поддерживают ее защитную функцию.

Ключевую роль в секреции тромбоцитарных гранул играет слияние мембран. После активации тромбоцитов гранулы тромбоцитов накапливаются в центре клетки и могут сливаться друг с другом. Далее гранулы сливаются с открытой канальцевой системой, высвобождая свое содержимое в ее каналы и, следующим этапом, окончательно в межклеточное пространство [115]. Прямое слияние гранул тромбоцитов с плазматической мембраной является еще одним механизмом секреции. Способность к секреции зависит от липидного состава мембраны [124]. Цитоскелет тромбоцитов также участвует в высвобождении гранул. Полимеризация актина, по-видимому, ингибирует высвобождение α -гранул и плотных гранул в интактном тромбоците, но способствует их секреции во время активации тромбоцитов [221]. Кроме того, увеличение содержания внутриклеточного Ca^{2+} также приводит к секреции. В секреции принимают участие протеинкиназа C [138].

Многие процессы в организме – тромбоз, воспаление, атерогенез, противоинфекционная защита, митогенез – реализуются при участии секреторных гранул [150]. Активация тромбоцитов приводит к секреции из α -гранул

фибриногена и ФВ, способствующих взаимодействию тромбоцитов друг с другом и с эндотелием. Адгезия тромбоцитов поддерживается рецептором фибриногена $\alpha\text{IIb}\beta_3$, рецептором коллагена GPVI и компонентами комплекса рецепторов ФВ с GPIb-IX-V [144]. α -Гранулы также секретируют факторы свертывания V и IX, участвующие во вторичном гемостазе. Наконец, α -гранулы могут быть вовлечены в поддержание гемостатического баланса путем секреции белков, ограничивающих свертывание, включая антитромбин, белок S и ингибитор ТФ. О вкладе α -гранул в нормальный гемостаз свидетельствует тенденция к кровотечению у пациентов с синдромом серых тромбоцитов [175].

Плотные гранулы участвуют в гемостазе и тромбозе в качестве основного источника АДФ, который действует как агонист тромбоцитов в местах повреждения сосудов. Более того, секреция серотонина плотными гранулами поддерживает агрегацию тромбоцитов и повышает тонус сосудов, в то время как высвобожденные ионы Ca^{2+} и полифосфаты способствуют образованию сгустка [127]. Напротив, некоторые из секретированных диаденозиновых полифосфатов являются частичными антагонистами рецепторов АДФ и могут быть вовлечены в ограничение активации тромбоцитов [56]. Кроме того, α -гранулы секретируют многочисленные провоспалительные и иммуномодулирующие факторы, способствующие хемотаксису и активации лейкоцитов [125, 182, 212]. Роль α -гранул при атеросклерозе связана в основном с их провоспалительным действием.

Плотные гранулы могут выделять полифосфаты и, таким образом, инициировать образование брадикинина [127], который поддерживает проницаемость сосудов и отек *in vivo* [189]. α -Гранулы участвуют в противоинфекционной защите, секретируя различные антимикробные белки, а также белки системы комплемента [199].

В α -гранулах были обнаружены проангиогенные белки, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов, эпидермальный и инсулиноподобный фактор роста, а также ингибиторы ангиогенеза, включая тромбоспондин-1, хемокиновый лиганд-4, ангиостатин и эндостатин [60]. Помимо ангиогенеза, секреция α -гранул может

играть роль в росте и стабильности опухоли [184], метастазировании [191] и заживлении ран [255].

1.2.6. Поверхностные гликопротеины тромбоцитов

Хотя на поверхности тромбоцитов существует много типов гликопротеинов, комплекс GPIb-IX-V, GPVI и интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (также известный как GPIIb/IIIa) считаются наиболее важными [63, 88, 140, 144]. Поэтому ниже будут описаны более подробно гликопротеины, опосредующие адгезию, активацию и агрегацию тромбоцитов, а также оказывающие влияние на их структуру и функцию.

Комплекс GPIb-IX-V

Комплекс GPIb-IX-V функционирует как поверхностный рецептор тромбоцитов и принимает активное участие, как в нормальном гемостазе, так и в артериальном тромбозе [59].

GPIba – это трансмембранный гликопротеин типа I, с N-концевым, лиганд-связывающим доменом, ядром сиаломуцина, трансмембранной областью и цитоплазматическим концом. Его основной лиганд-связывающий домен содержит семь тандемных повторов, богатых лейцином. GPIba и GPIX присутствует примерно в количестве 25 000 на тромбоцит, в то время как GPVI присутствует примерно в количестве 12 500 [59].

Комплекс GPIb-IX-V способствует адгезии активированных тромбоцитов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным структурам поврежденного сосуда, главным образом, путем связывания его с лигандом ФВ, который, в свою очередь, сам способен связывать коллаген (рисунок 3). Другим лигандом для GPIb-IX-V является тромбоспондин, который опосредует адгезию тромбоцитов при высокой скорости кровотока при отсутствии ФВ [233]. Ранее было показано, что GPIba также может связывать Р-селектин, тем самым реализуя другой механизм взаимодействия тромбоцитарных и эндотелиальных клеток, а также тромбоцитов друг с другом. Кроме того, интегрин $\alpha\text{M}\beta 2$ служит встречным рецептором для GPIb-IX-V, обеспечивающим адгезию тромбоцитов к лейкоцитам. Помимо своей роли в адгезии тромбоцитов, GPIb-IX-V усиливает

прокоагулянтную способность активированных тромбоцитов, обеспечивая сайты связывания для α -тромбина, фактора XI и высокомолекулярного кининогена [118]. Напротив, связывание фактора XII с GPIba конкурирует со связыванием с кининогеном и ингибирует тромбин-зависимую агрегацию тромбоцитов, связанную с образованием комплекса тромбина с GPIba. Наконец, сложные сигнальные процессы инициируются комплексом GPIb-IX-V при воздействии ФВ или других поливалентных лигандов, что в конечном итоге приводит к активации α IIb β 3 и высвобождению эктодомена GPIba [128, 160, 195].

Гликопротеин VI

GPVI является основным сигнальным рецептором коллагена в тромбоцитах человека (рисунок 4) [73, 126, 160].

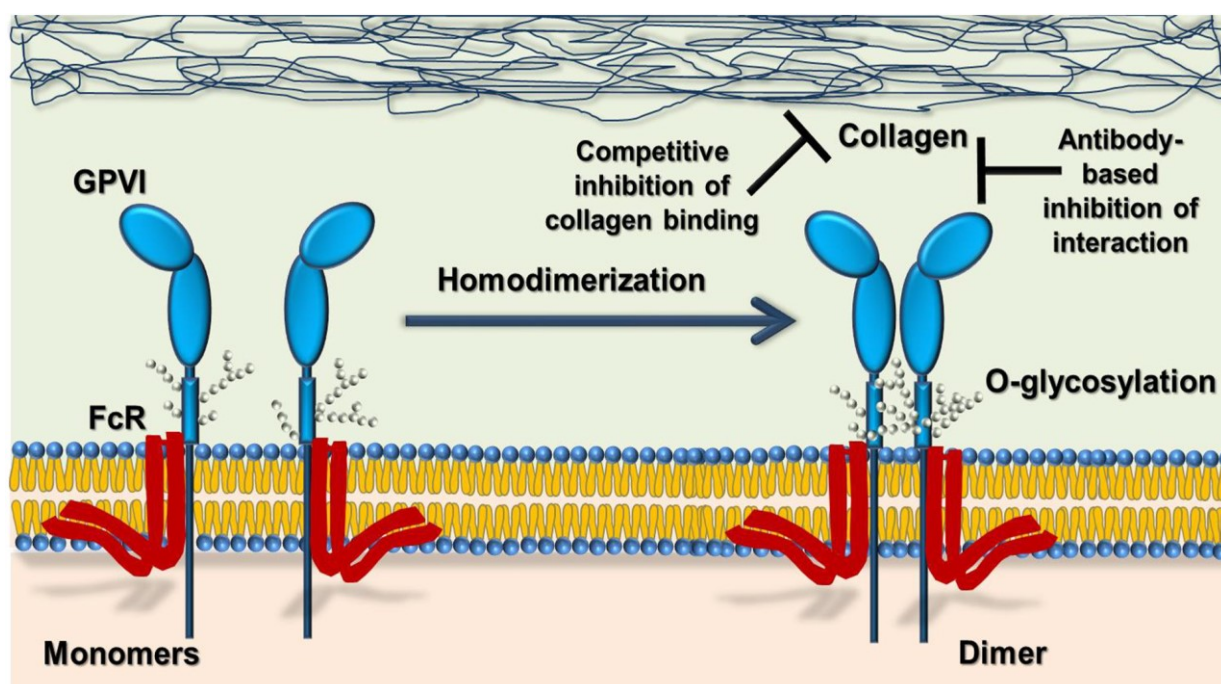


Рисунок 4 – Структура GPVI [73]

GPVI относится к суперсемейству рецепторов иммуноглобулинов. Он состоит из 319 аминокислот и присутствует примерно в количестве 3 700 копий на тромбоцит [195]. GPVI состоит из двух внеклеточных доменов – иммуноглобулинов D1 и D2. GPVI существует в виде комплекса с γ -цепью Fc-рецептора, и экспрессируется на тромбоцитах в мономерной и димерных формах

[126]. В мономерной форме на неактивированных тромбоцитах его сродство к коллагену слишком низко, чтобы запустить активацию в ответ на физиологические концентрации коллагена. Напротив, димерные формы имеют повышенное сродство к коллагену, и связывание коллагена с димерным комплексом приводит к активации внутриклеточного сигнального пути, ведущего к дальнейшему образованию димеров. Без γ -цепи Fc-рецептора GPVI не экспрессируется на поверхности тромбоцитов и активация тромбоцитов, индуцированная коллагеном, не инициируется [99].

Тромбоциты адгезируют к обнаженным коллагеновым волокнам путем связывания иммобилизованного ФВ с GPIb-IX-V. Это позволяет связываться коллагену с низкоаффинным GPVI и приводит к запуску внутриклеточных сигналов с последующей активацией интегринов изнутри, включая $\alpha IIb\beta 1$ и $\alpha IIb\beta 3$, а также дальнейшей кластеризацией GPVI (рисунок 3, 4).

Таким образом, активация GPVI усиливается, и стабильная адгезия и распространение тромбоцитов стимулируются за счет связывания $\alpha IIb\beta 1$ и $\alpha IIb\beta 3$ с коллагеном и ФВ, соответственно. После активации коллагеном и другими агонистами GPVI быстро удаляется с поверхности тромбоцитов, что, скорее всего, предотвращает чрезмерную активацию тромбоцитов после незначительных повреждений сосудистой сети [195].

GPVI также может участвовать в патологических процессах за рамками гемостаза, например, в патогенезе ревматоидного артрита и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [193].

Интегрин $\alpha IIb\beta 3$

Интегрины представляют собой основное семейство рецепторов адгезии тромбоцитов, обеспечивающее прочную адгезию к обнаженной матрице молекул субэндотелиальных структур [98, 130, 216]. Поскольку интегрины тромбоцитов постоянно подвергаются воздействию лигандов, их активность должна быть жестко контролируема для предупреждения чрезмерного тромбообразования. Интегрины на поверхности циркулирующих тромбоцитов в состоянии покоя обладают низким сродством к лигандам и способны быстро переходить в

активное состояние с высоким сродством при активации (рисунок 5). Этот переход регулируется внутриклеточным преобразованием цитоплазматических белков – талина и киндлина в присутствии агонистов тромбоцитов [228]. Оба белка непосредственно связываются с цитоплазматическим концом *b*-субъединиц интегрина и тем самым запускают его активацию.

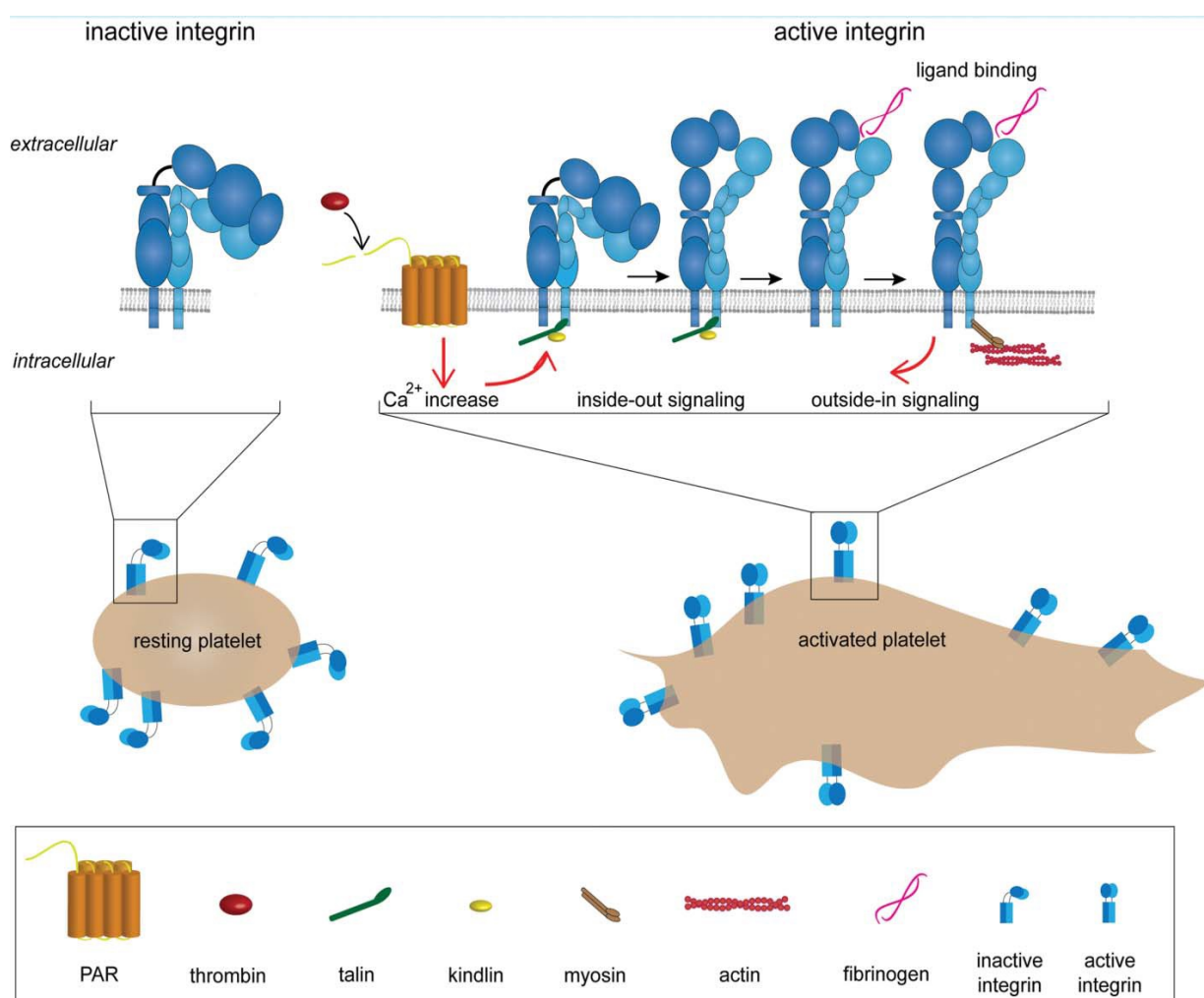


Рисунок 5 – Система адгезии тромбоцитов и активации интегрина [236]

Интегрин $\alpha IIb\beta 3$ (ранее называемый GPIIb/IIIa) на поверхности тромбоцитов относится к семейству интегриновых молекул клеточной адгезии и экспрессируется на тромбоцитах, мегакариоцитах, базофилах и некоторых опухолевых клетках [116, 211]. Количество их составляет от 80 000 до 100 000 копий/тромбоцит. Интегрин $\alpha IIb\beta 3$ является основным интегральным белком

плазматической мембраны тромбоцитов и составляет 17% белковой массы тромбоцитарной мембраны. Кроме того, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ присутствует на мембранах α -гранул тромбоцитов. $\alpha\text{IIb}\beta 3$ представляет собой гетеродимер, состоящий из αIIb и $\beta 3$ субъединиц. αII -субъединица состоит из 1008 аминокислот, тогда как $\beta 3$ -субъединица – из 762 аминокислот. Обе субъединицы образуют большой внеклеточный домен, трансмембранный сегмент и короткий цитоплазматический конец (рисунок 5) [216]. В intactных тромбоцитах интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ находится в изогнутом состоянии. Активация интегрина может быть запущена двумя способами – внутриклеточным и внеклеточным. В первую очередь, активация интегрина инициируется тромбином. Тромбин воздействует на активируемые протеазой G-протеиновые рецепторы (GPCR), что приводит к увеличению концентрации внутриплазматического Ca^{2+} . Это запускает внутриклеточный сигнальный каскад, который способствует связыванию талина с внутриклеточным концом $\beta 2$ -цепи, что приводит к активации интегрина. Внеклеточный путь активации интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ может быть вызван связыванием лиганда (например, фибриногена) [236].

Активация тромбоцитов, индуцированная агонистами, запускает внутриклеточную передачу сигнальных событий, которые при воздействии на цитоплазматический конец $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ведут к преобразованию внеклеточного домена в высокоаффинный рецептор для фибриногена и ФВ. При связывании с димерным или полимерным фибриногеном и ФВ активированный $\alpha\text{IIb}\beta 3$ позволяет взаимодействовать тромбоцитам друг с другом и, следовательно, формировать тромбоцитарные агрегаты. Кроме того, связывая витронектин, фибронектин или тромбоспондин-1, активированный $\alpha\text{IIb}\beta 3$ также может опосредовать тромбоцитарную адгезию к субэндотелиальным структурам и регулировать агрегацию тромбоцитов [140].

Участие активированного $\alpha\text{IIb}\beta 3$ в агрегации тромбоцитов делает его основной мишенью для антитромботической терапии (рисунок 3).

1.3. Пути активации тромбоцитов

В физиологических условиях интактные тромбоциты не агрегируют, однако при повреждении эндотелия, обнажении подлежащего субэндотелия и коллагена, тромбоциты подвергаются воздействию агонистов, что приводит к активации тромбоцитов и запуску каскада коагуляционного гемостаза. В патологических условиях чрезмерная активация тромбоцитов может вызвать тромбирование сосуда. Тромбоциты могут активироваться многочисленными агонистами различными путями [157]. Помимо вышеописанных процессов активации тромбоцитов, индуцированных ФВ и коллагеном, важную роль в активации тромбоцитов также играют тромбин, АДФ, адреналин и ТХА2 (рисунок 3, 6). Большинство из агонистов активации тромбоцитов образуются в результате повреждения сосуда (рисунок 6).

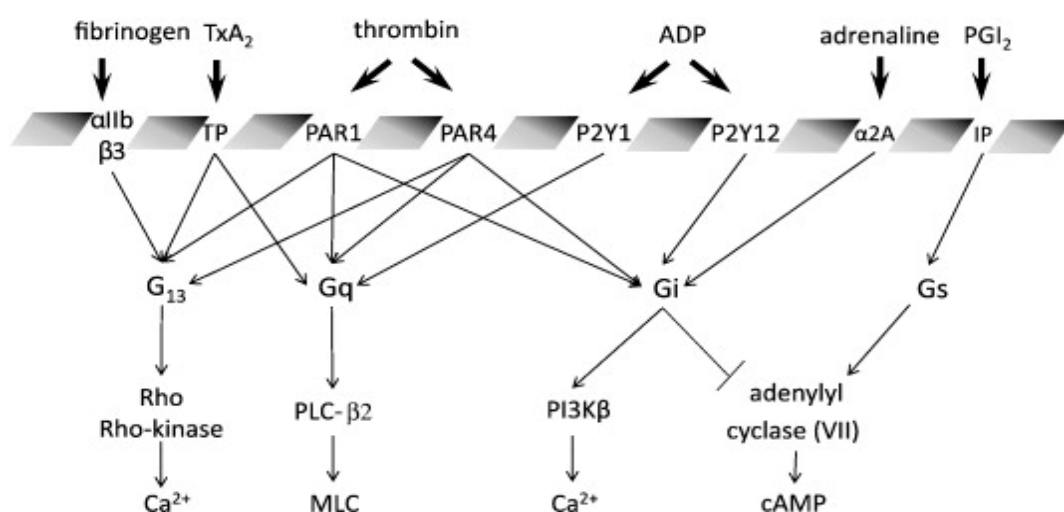


Рисунок 6 – Агонисты активации и соответствующие рецепторы тромбоцитов, участвующие в передаче внешнего химического сигнала через G-белки [157]

Агонисты тромбоцитов подразделяются на сильные и слабые. Коллаген и тромбин – сильные агонисты, приводящие к агрегации и дегрануляции тромбоцитов, что приводит к секреции АДФ. АДФ, адреналин, ТХА2 – слабые агонисты — вызывают агрегацию тромбоцитов, но не вызывают секрецию содержимого гранул при воздействии без других индукторов.

1.3.1. Тромбин

Тромбин является сериновой протеазой и наиболее мощным агонистом тромбоцитов, реализуя эффект через рецепторы, активируемые протеазой (PAR) и GPIIb-IX-V [97, 157, 224, 251]. PAR принадлежат к семейству рецепторов, связанных с G-белком, состоит из семи трансмембранных α -спиралей, четырех внеклеточных и внутриклеточных петель и доменов [260]. К настоящему времени известны четыре главных члена семейства PAR: PAR-1, PAR-3 и PAR-4 – рецепторы тромбина и PAR-2 – рецептор трипсина и триптазы тучных клеток [178]. PAR-1 и PAR-4 присутствуют на тромбоцитах человека и активируются при помощи тромбина и гексапептидов – рецептор тромбина активирующий пептид (SFLLRN) и GYPGQV соответственно. Активация PAR-1 через пептидный агонист SFLLRN, приводит к агрегации тромбоцитов и дегрануляции. Тромбин активирует тромбоциты, действуя на них в очень малых концентрациях, инициируя очень сильный ответ через рецепторы PAR-1, что приводит к воздействию на анионные фосфолипиды, которые, в свою очередь, поддерживают гемокоагуляцию [105]. Однако стимуляция PAR-4, вызывает только ограниченную агрегацию тромбоцитов, аналогичную той, которую вызывают в тромбоцитах более слабые агонисты, такие как АДФ или адреналин. PAR-1 и PAR-4 ответственны за большую часть тромбоцитарного ответа на контакт с тромбином. Характерная особенность семейства PAR заключается в том, что протеиназы расщепляют одну пептидную связь во внеклеточном домене и новый N-концевой участок, так называемый «привязанный лиганд», взаимодействует с внеклеточным доменом расщепленного рецептора и активирует его. Механизмы активации PAR-1 тромбином изучены генно-инженерными методами с использованием химер и точечных мутаций генов. Тромбин расщепляет связь Арг-Сер между аргинином в положении 41 и серином в положении 42 и может быть активирован двумя механизмами: необратимым – протеолитическим и обратимым – связыванием лиганда. Первый из механизмов является физиологическим. Для осуществления второго необходимы высокие

концентрации аналогов TRAP, существенно (на 3 порядка) превышающие эффективные концентрации тромбина [97].

PAR-2 не экспрессируется на тромбоцитах, PAR-3 является кофактором для активации PAR-4 тромбином, в то время как PAR-1 является чувствительным при низкой концентрации тромбина. Активация PAR-1 наблюдается при низких концентрациях тромбина, тогда как активация посредством PAR-4 требует более высоких концентраций тромбина, и селективная стимуляция PAR-4 приводит к менее мощным ответным реакциям из-за более низкого потока кальция внутрь клетки, ограниченного воздействия анионных фосфолипидов, что в результате незначительно ускоряет свертывание крови [178]. Эти различия отчасти могут быть объяснены и количеством рецепторов: число PAR-1 на тромбоцитах в 3 раза выше, чем PAR-4 [97].

Кроме того, анти-PAR-1-антитела и антагонисты PAR-1 блокировали активацию тромбоцитов низкими концентрациями тромбина, в то время как анти-PAR-4 блокирующие антитела не влияли на тромбин-опосредованную активацию тромбоцитов [97]. Таким образом, PAR-1 является наиболее важным рецептором для активации тромбоцитов человека тромбином. В 2014 году появился первый антагонист рецептора PAR-1 (рисунок 3), который по результатам двух крупных клинических испытаний был одобрен для клинического применения у пациентов с инфарктом миокарда в анамнезе или заболеваниями периферических артерий для предотвращения тромботических ССЗ [244].

1.3.2. Аденозиндифосфат

АДФ является одним из основных компонентов, секретируемым из активированных тромбоцитов. Его ключевая роль в процессе активации и агрегации тромбоцитов была признана почти 60 лет назад [72].

Пуриновые рецепторы тромбоцитов играют ведущую роль в гемостазе и тромбогенезе. Тромбоциты экспрессируют рецепторы P2 (нуклеотидные рецепторы) 3 подтипов — P2X₁, P2Y₁ и P2Y₁₂ (рисунок 7).

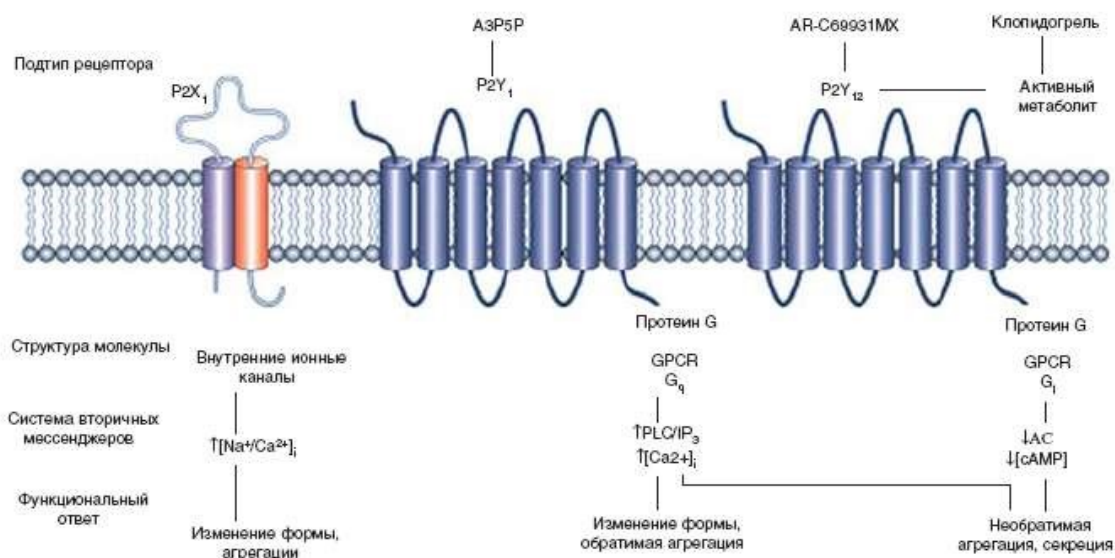


Рисунок 7 – Подтипы АДФ-рецепторов

АДФ является агонистом для двух рецепторов, связанных с пуринергическим белком тромбоцитов – Gq-связанного P2Y₁ и Gi-связанного рецептора P2Y₁₂. Как и другие рецепторы P2Y, P2Y₁ и P2Y₁₂ представляют собой белки, состоящие из 7 трансмембранных компонентов, с карбоксильным концевым доменом с цитоплазматической стороны и внеклеточным N-концевым доменом [81]. Активация P2Y₁ инициирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и отвечает за изменение формы тромбоцитов, однако без активации P2Y₁₂ приводит к незначительной и обратимой агрегации тромбоцитов. Стимуляция P2Y₁₂ приводит к усилению и стабилизации агрегации. Существует сложное взаимодействие между P2Y₁ и P2Y₁₂, и коактивация обоих рецепторов необходима для полной агрегации тромбоцитов [203]. Благодаря своей значимой роли в агрегации тромбоцитов рецептор P2Y₁₂ стал основной мишенью антитромбоцитарной терапии (рисунок 3, 7) [110]. Назначение антагониста рецептора P2Y₁₂, в дополнение к аспирину, является стандартом лечения пациентов с острым коронарным синдромом [89].

1.3.3. Аденозинтрифосфат

Дегрануляция плотных гранул тромбоцита приводит также к секреции АТФ, который является лигандом для рецептора P2X₁. При активации данного рецептора не происходит агрегации, однако он играет вспомогательную роль при активации, вызванной коллагеном [53, 223, 227].

1.3.4. Тромбоксан A₂

ТХА₂ относится к семейству эйкозаноидов, которые являются метаболитами арахидоновой кислоты, образующимися в результате последовательного действия трех ферментов – фосфолипазы A₂, циклооксигеназы (ЦОГ)-1/ЦОГ-2 и синтазы ТХА₂. Первоначально источником ТХА₂ считались тромбоциты, однако теперь известно, что он высвобождается множеством других клеток, включая макрофаги, нейтрофилы и эндотелиальные клетки. Получивший название в честь своей роли в тромбообразовании, ТХА₂ обладает протромботическими свойствами, поскольку стимулирует активацию и агрегацию тромбоцитов. ТХА₂ также обладает сосудосуживающим эффектом и активируется во время повреждения и воспаления тканей. В то время как простагландины уравнивают свои тромботические и сосудосуживающие свойства простациклином (PGI₂), существуют различные физиологические и патологические ситуации, когда этот баланс нарушается. Повышенная активность ТХА₂ может играть определенную роль в патогенезе инфаркта миокарда, инсульта, атеросклероза и бронхиальной астмы. Активация ТХА₂ имеет значение в патогенезе легочной гипертензии, нефропатии, аллергии, ангиогенезе и метастазировании раковых клеток. Связывание ТХА₂ со своим рецептором ведет к конформации Gq (GTP-binding protein q) белков, что приводит к запуску аналогичного активированного тромбином сигнального пути [207].

1.4 Рецепторный аппарат тромбоцитов

1.4.1. Рецепторы, связанные с протеином G

Тромбоциты экспрессируют множество рецепторов, связанных с протеином G (GPCR), которые реагируют на растворимые медиаторы, вырабатываемые в месте повреждения сосуда или при патологических состояниях, что приводит к инициированию агрегации тромбоцитов. Таким образом, сигнальные пути GPCR тромбоцитов являются привлекательной терапевтической мишенью [106].

Ряд антиагрегационных препаратов, используемых в настоящее время в клинической практике, нацелен на GPCR тромбоцитов [106].

Простагландиновые рецепторы

Простагландины, подсемейство эйкозаноидов, образуются из арахидоновой кислоты под действием простагландиновой G/H-синтазы (ЦОГ 1 и 2 типа) с образованием общих предшественников простагландинов – простагландина G₂ (PGG₂) и простагландина H₂ (PGH₂), которые затем при воздействии дополнительных синтаз образуют другие простагландины (PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}), TXA₂ и простациклин (PGI₂). Эти простагландиноподобные соединения опосредуют клеточные сигнальные пути, которые через соответствующие рецепторы ведут к выработке циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Активация рецепторов простагландина H₂ (PGH₂) и рецептора TXA₂ ведет к инициированию фосфолипазы C, что приводит к превращению фосфатидилинозитола бисфосфата в инозитол трисфосфат (IP₃) и диацилглицерин. Следствием этого является мобилизации Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума и активация протеинкиназы C. Следует также подчеркнуть, что простагландиноподобные рецепторы часто соединяются с более чем одним G-белком для активации вторичных сигнальных каскадов мессенджеров.

Простациклин является основным продуктом метаболизма арахидоновой кислоты, катализируемого ЦОГ и синтазой простагландина I в эндотелии сосудов, и является ключевым эндотелиальным ингибитором активации тромбоцитов. Простациклин стимулирует G-связанный рецептор простациклина (IP) с последующей активацией аденилатциклазы и повышением уровня цАМФ [231].

Оксид азота (NO), другой подавляющий регулятор тромбоцитов, вырабатываемый эндотелиальными клетками, действует непосредственно на гуанилатциклазу, повышая уровень циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который, в свою очередь, активирует протеинкиназу А, влияющую на несколько аспектов функции тромбоцитов, в том числе мобилизацию Ca^{2+} , активацию интегрин, фосфорилирование легких цепей миозина [78, 82].

Как и простаглицлин, ТХА2 вырабатывается циклооксигеназным путем в результате действия тромбоксансинтазы на PGH₂. ТХА2 связывается с соответствующим рецептором и является мощным активатором тромбоцитов.

Сигнальные пути, опосредованные простаглицлиновыми рецепторами, приводящие к увеличению продукции цАМФ, связаны с ингибированием тромбоцитов. Снижение уровня цАМФ способствует агрегации тромбоцитов, индуцированной мобилизацией кальция из депо. Этот баланс отражается в кардиопротекторных эффектах, наблюдаемых при приеме аспирина, что в значительной степени объясняется его необратимой инактивацией фермента ЦОГ тромбоцитов, приводящей к снижению проагрегантных эффектов ТХА2 [231].

1.4.2. Рецепторы, активированные протеиназой

PAR-рецепторы рассмотрены в главе 1.3.1.

1.4.3. Пуриновые рецепторы

Три вида пуриновых рецепторов обнаружены на поверхности тромбоцитов: P2X₁, лигандом для которого является АТФ, а также P2Y₁ и P2Y₁₂, активируемые АДФ. Последние два рецептора связаны с G-белками.

P2X₁ рецепторы

P2X₁ – лиганд-зависимый катионный канал, индуцируемый АТФ, ответственный за быстрое поступление Ca^{2+} . Исследования с использованием специфических лигандов P2X₁ показали, что активация данного рецептора вызывает временное изменение формы тромбоцита, не вызывая агрегации, и играет роль в коллаген-индуцированной агрегации [133].

Связывание рецептора с лигандом приводит к повышению активности протеинкиназы C, секреции плотных гранул тромбоцитов. Основная функция $P2X_1$ -рецепторов заключается в усилении сигналов в результате контакта с коллагеном в низких концентрациях. Поступление ионов Ca^{2+} приводит к деполяризации мембран, активации фосфолипазы C и $IP3$ -рецепторов.

Рецептор $P2X_1$ тромбоцитов вместе с рецептором нейтрофилом $P2X_1$ может способствовать образованию тромба при воспалении. Рецептор $P2X_1$ нейтрофилов также играет важную роль в облегчении хемотаксиса нейтрофилов, индуцируемого различными хемоаттрактантами. Поэтому $P2X_1$ может представлять собой привлекательную мишень для новых методов лечения не только тромбозов, но и воспалительных процессов [120].

$P2Y$ рецепторы

Существуют два основных типа рецепторов, которые опосредуют АДФ-индуцированную активацию тромбоцитов: рецепторы $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$. Тромбоциты также экспрессируют рецепторы $P2Y_{13}$ и $P2Y_{14}$, но роль этих рецепторов в регуляции функционального состояния тромбоцитов не установлена.

$P2Y_1$ рецептор

Рецептор $P2Y_1$ участвует в инициации активации тромбоцитов, в то время как рецептор $P2Y_{12}$ повышает чувствительность тромбоцитов к активации другими агонистами [133].

Структура рецептора $P2Y_1$ человека была открыта в 1996 году. Активация $P2Y_1$ приводит к слабой и временной агрегации тромбоцитов *in vitro*. Тем не менее, рецептор $P2Y_1$ незаменим в формировании тромбов *in vivo*. На биологических моделях (в частности, мыши) как фармакологическое ингибирование, так и генетический дефицит (приводящий к недостаточности рецептора $P2Y_1$) был связан с устойчивостью к тромбозу, тогда как избыточная экспрессия рецептора увеличивала риск тромбоза [133].

Связывание АДФ с Gq-сопряженным $P2Y_1$ рецептором активирует фосфолипазу C β (ФС- β). В свою очередь, ФС- β подвергает фосфатидилинозитол бисфосфат мембран гидролизу в инозитол трифосфат ($IP3$) и диацилглицерин.

Этот сигнальный каскад приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и активации протеинкиназы C, что в совокупности приводит к изменению формы тромбоцитов, высвобождению содержимого гранул и их агрегации [260].

P2Y₁₂ рецепторы

Связывание АДФ с Gi-сопряженным P2Y₁₂ рецептором активирует два основных биохимических пути: ингибирование продукции цАМФ и активацию фосфоинозитид-3-киназы (PI3-K), которая фосфорилирует различные белки-мишени. В частности, весьма важным является снижение концентрации цитозольного цАМФ, поскольку высокие концентрации цитозольного цАМФ (например, индуцированные простаглинном) предотвращают активацию тромбоцитов. Уменьшение концентрации цАМФ делает тромбоциты более чувствительными к активации любым агонистом тромбоцитов [155].

В отличие от P2Y₁, рецептор P2Y₁₂ имеет совершенно иной принцип работы. Активация рецептора P2Y₁₂ повышает восприимчивость и чувствительность тромбоцитов к активации и другими агонистами, кроме АДФ, за счет уменьшения цитозольной концентрации цАМФ [260]. Благодаря центральной роли этого рецептора в росте и стабилизации тромба, а также его распределению на ограниченном числе тканей, рецептор P2Y₁₂ является мишенью антитромботических препаратов [52]. Однако для достижения агрегации тромбоцитов, рецепторы P2Y₁ и P2Y₁₂ должны действовать согласованно. Ингибирование внутриклеточной передачи сигналов через любой из рецепторов P2Y блокирует АДФ-опосредованную активацию тромбоцитов [149].

Рецептор P2Y₁₂ состоит из 3 петель и 7 трансмембранных компонентов (рисунок 5). Большинство из семи трансмембранных спиралей P2Y₁₂ не перпендикулярны плоскости мембраны, а несколько наклонены и/или изогнуты – например, С-концевая спираль VIII параллельна липидному бислою мембраны. Существуют две дисульфидные связи, одна между цистеином (Cys) 17 и Cys270, и один между Cys97 и Cys175. С рецептором связаны две молекулы холестерина, играющие потенциальную роль в передаче сигнала [60].

АДФ и некоторые из его аналогов стимулируют $P2Y_{12}$ -опосредованное ингибирование аденилатциклазы посредством активации G-белков подтипа G_{ai2} (рисунок 3), хотя эффективное связывание может также происходить с G_{ai1} и G_{ai3} что имеет критическое значение для формирования и функционирования липидных рафтов. Ингибирование аденилатциклазы через G_{ai2} является ключевой особенностью активации тромбоцитов, вызванной АДФ, и ведет к агрегации тромбоцитов. Однако ингибирование аденилатциклазы АДФ/ $P2Y_{12}$ может играть косвенную роль в агрегации тромбоцитов *in vivo*, поскольку оно противодействует антитромбоцитарному эффекту простагличина и других веществ, которые ингибируют функцию тромбоцитов, повышая уровни цАМФ за счет активации аденилатциклазы (рисунок 7). В физиологических условиях $P2Y_{12}$ отвечает только за усиление и стабилизацию агрегации тромбоцитов, в условиях отсутствия или инактивации $P2Y_1$ взаимодействие АДФ с $P2Y_{12}$ способно индуцировать фосфоинозитид-3-киназа-зависимую, медленную и необратимую агрегацию тромбоцитов, которой не предшествует изменение формы тромбоцитов [80, 81].

$P2Y_{13}$ и $P2Y_{14}$ рецепторы

Согласно последним исследованиям, $P2Y_{13}$ и $P2Y_{14}$ могут играть роль во многих патофизиологических процессах, связанных с воспалением и тромбозом [100].

Реакция $P2Y_{13}$ на АДФ идентична реакции рецептора $P2Y_{12}$. Внутриклеточный каскад сигналов, вызываемый активацией $P2Y_{13}$ и $P2Y_{14}$, связан с G_i -рецептором. Однако $P2Y_{13}$ может также связываться с различными G-белками (G_s/G_q) и запускать несколько внутриклеточных путей, связанных с активацией митоген-активируемой протеинкиназы и фосфатидилинозитол-3-киназы [58, 152]. $P2Y_{13}$ участвует в регуляции холестерина обмена и метаболизма глюкозы, гомеостаза костной системы.

и функции центральной нервной системы, включая передачу нейромедиаторов сигналов боли и нейропротекцию [58].

Было выявлено присутствие рецепторов P2Y₁₄ на тромбоцитах, однако их функциональное значение пока неизвестно. Рецепторы P2Y₁₄ большей частью связаны с иммунным ответом, воспалением и эндотелиальной функцией. Они имеют высокий уровень экспрессии на различных подгруппах лейкоцитов и эпителиальных клетках. Например, рецепторы P2Y₁₄ способствуют хемотаксису нейтрофилов человека. Урацилдифосфат и его гликированная форма являются мощными агонистами данного рецептора. На данный момент нет доказательств того, что рецепторы P2Y₁₄ активируются АДФ [58].

1.5. Формирование каталитической фосфолипидной поверхности тромбоцитов как механизм реализации тромбогенной активности клеточных мембран

Плазматическая мембрана тромбоцитов – место взаимодействия между внеклеточным стимулами и внутриклеточными биохимическими процессами, сопровождающими активацию тромбоцитов. *In vitro* активация тромбоцитов возможна под влиянием агонистов, действующих через сопряженные с G-белком рецепторы.

Липидный бислой толщиной 4 нм служит барьером между клеткой и ее внешней средой. Липиды в составе мембраны имеют большое разнообразие в структуре (глицерофосфолипиды, сфингомиелины и холестерин), размере ацильной цепи и количестве двойных связей. Глицерофосфолипиды делятся на фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), ФС, фосфатидилинозитол (ФИ) и фосфатидные кислоты. Мембраны состоят из 43% ФХ, 21% ФЭА, 23% сфингомиелина, тогда как содержание ФИ и ФС составляет примерно 7% и 4% соответственно. Кроме того, именно цитоплазматические мембраны, но не другие внутриклеточные мембраны, содержат высокий уровень холестерина (50-80% от общего количества фосфолипидов).

Глицерофосфолипиды, состоящие из гидрофильной головки и гидрофобных хвостовых групп (ацильных цепей), спонтанно образуют липидный бислой,

причем гидрофильные головки обращены наружу благодаря амбифильным характеристикам молекул [151].

1.5.1. Асимметричное распределение фосфолипидов

Размер головки фосфолипидов, а также длина ацильных цепей влияют на форму мембран. Липиды с длинными и насыщенными жирными кислотами делают мембраны толще и плотнее, в то время как ненасыщенные жирные кислоты предотвращают плотную упаковку. Размер жирных кислот ФХ меньше, чем у ФЭА и ФС. Большинство жирных кислот в ацильной цепи ФХ являются насыщенными, тогда как в ФЭА и ФС содержится 4-6 ненасыщенных связей. Поэтому мембраны, богатые ФС, упакованы менее плотно и обладают высокой текучестью. 70-80% сфингомиелина и ФХ локализованы в наружном слое, в то время как большая часть ФС и ФЭА находятся во внутреннем слое. Асимметричное распределение фосфолипидов между внешними и внутренними слоями мембраны было выявлено более 25 лет назад. Недавно были идентифицированы ферменты флиппазы (от англ. *flip* – перемещать), которые способны перемещать ФС между двумя слоями мембраны, и скрамблазы (от англ. *scramble* – взбалтывать), которые перемещают фосфолипиды между липидными бислоями [170].

Флиппаза – АТФ-зависимый фермент массой 115-120 кДа, представляет собой АТФазу Р4-типа с 10 трансмембранными компонентами и двумя большими цитоплазматическими петлями АТФазы, большинству из которых требуется связь с CDC50A (TMEM30A) в качестве функциональной субъединицы. Процесс экспозиции ФС на наружную поверхность мембраны является энергоемким и медленным. Когда нужен быстрый перенос ФС на наружный слой мембраны, в работу включаются скрамблазы – АТФ-независимые, но Ca^{2+} -зависимые ферменты [170].

1.5.2. Роль асимметрии мембран в реализации тромбогенных свойств

ФС, перемещаясь от внутреннего к внешнему слою мембраны тромбоцитов, становится плацдармом для активации внутреннего теназного комплекса (факторов VIIIa, IXa и X) и протромбиназы (Va, Ха, протромбин), способствующим запуску генерации тромбина в фазе распространения коагуляции. Отрицательно заряженные остатки γ -карбоксиглутамата (Gla) на NH_2 -концах витамина К-зависимых факторов – IX(a), X(a), и протромбина, взаимодействуют с отрицательно заряженным ФС при наличии Ca^{2+} . Фактор VIII связывается с ФС через его домен C2, а фактор Va – через его C1 и C2 домены. Теназная и протромбиназная активность усиливается в три раза на мембранах, содержащих ФС. Есть несколько механизмов, приводящих к образованию прокоагулянтных тромбоцитов. В одном случае экспозиция ФС происходит быстро за счет активации тромбоцитов сильными агонистами. Второй путь – это внутренний путь апоптоза, при этом появление ФС на наружном слое мембраны происходит медленнее [68].

Перемещение ФС на наружный слой мембраны тромбоцитов, стимулируемое агонистами, представляет собой быстрый процесс, протекающий от секунд до нескольких минут, и сопровождается другими апоптотическими событиями, включая увеличение проницаемости и деполяризацию митохондриальной мембраны. Доля образующихся при активации тромбоцитов с экспозицией ФС зависит от агониста, приводящего к стимуляции тромбоцитов. Наиболее мощным физиологически значимым стимулом *in vitro* является комбинация коллагена/конвульксина/пептида, связанного с коллагеном, и тромбина (C+T). Первый компонент данного комплекса связывается с GPVI. Тромбин при воздействии на PAR-1 и PAR-4 приводит к устойчивому и супрамаксимальному увеличению уровня Ca^{2+} , который необходим для появления ФС на значительной доли тромбоцитов [204]. По отдельности эти агонисты не столь эффективны, при этом образуется меньшая доля тромбоцитов, содержащих ФС на поверхности мембраны. АДФ или ТХА2 не играет значимой роли в экспозиции ФС. Неудивительно, что препараты, нацеленные на АДФ и ТХА2-

активируемые пути активации и агрегации тромбоцитов, не оказывают существенного влияния на ингибирование прокоагулянтной активности тромбоцитов [68].

Понимание механизмов, участвующих в формировании фенотипа тромбоцитов с ФС на поверхности, открывает новые перспективы коррекции коагуляционных нарушений.

1.5.3. Липидные рафты в мембране тромбоцитов

Липидные рафты представляют собой сфинголипидные и холестериновые структуры в составе мембраны, состоящие из очень маленьких доменов (20-50 нм) плотно упакованных липидов, проявляющих боковую подвижность. Эти мембранные микродомены играют ключевую роль в эффективной адгезии и сборке сформированных мультипротеиновых комплексов на внутренней стороне плазматической мембраны (рисунок 8). Низкая температура плавления сфингомиелина с насыщенной ацильной цепью способствует образованию жидких упорядоченных доменов в присутствии холестерина, поэтому липидные рафты легче формируются на мембранах, богатых холестерином и сфинголипидами. Следует отметить, что плазматическая мембрана тромбоцитов человека содержит относительно большое количество сфингомиелина, что позволяет предположить характер липидного состава рафтов в этих клетках [71].

Фибрин прикрепляется к богатым сфингомиелином рафтам тромбоцитов. Эти рафты действуют как платформы, на которых соединяются внеклеточный фибрин и внутриклеточный актомиозин, способствуя ретракции сгустка. С другой стороны, известно, что гликопротеин VI рецептора коллагена транслоцируется в богатых холестерином рафтах во время адгезии тромбоцитов к коллагену.

Помимо тучных клеток, тромбоциты человека – еще один пример клеток, обогащенных молекулами, содержащими насыщенные жирные ацильные цепи в рафтах. Это состояние согласуется с моделью, в которой липидный бислой рафтов асимметричен – внешний слой состоит преимущественно из сфингомиелина и гликосфинголипидов, и внутренний слой – из

глицерофосфолипидов. В присутствии холестерина насыщенные глицерофосфолипиды облегчают формирование упорядоченной жидкой фазы на внутренней стороне плазматической мембраны [76].

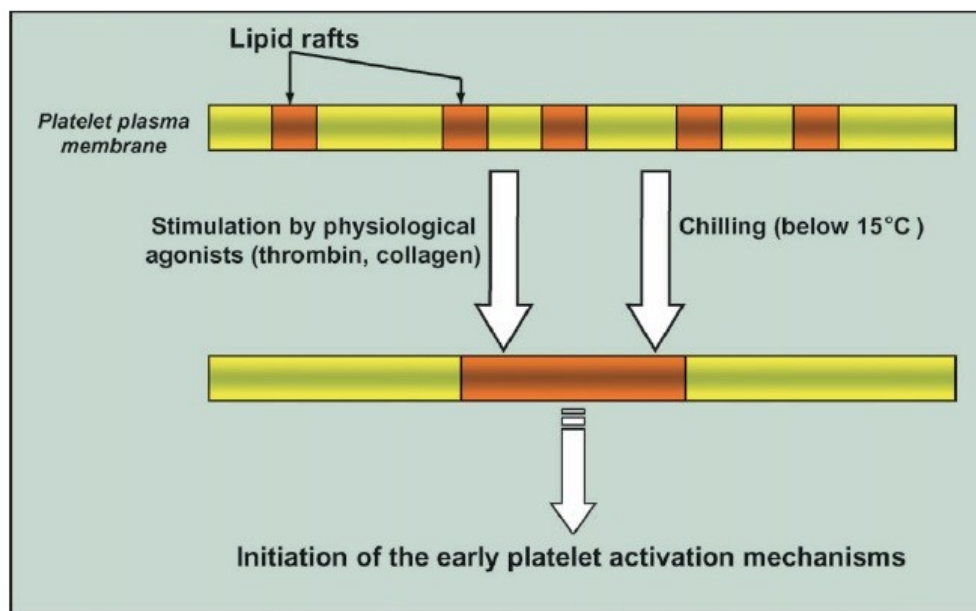


Рисунок 8 – Агрегация липидных рафтов тромбоцитов, вызванная охлаждением, тромбином или коллагеном. В неактивированных тромбоцитах липидные микродомены находятся в жидкой фазе и имеют однородное распределение в плазматической мембране тромбоцитов. Рафты сливаются друг с другом на ранних стадиях активации тромбоцитов, вызванной агонистами [71]

Влияние холестерина на активации тромбоцитов изучалось с 1970-х годов, когда еще не было известно о липидных рафтах. Было выявлено, что содержание холестерина и функция тромбоцитов имели корреляционную зависимость. Следует отметить, что синтез холестерина в тромбоцитах *de novo* не происходит. Увеличение содержания холестерина или соотношения холестерина к фосфолипидам приводит к увеличению чувствительности тромбоцитов к агрегантам *in vitro*. Выявлено, что тромбоциты пациентов с гиперхолестеринемией IIa типа содержали больше холестерина в мембране, при этом увеличилась реактивность к коллагену и АДФ. Поэтому

гиперхолестеринемия может быть дополнительным фактором риска развития тромбоза у пациентов [151].

1.6. Роль мембранных фосфолипидных микровезикул в регуляции свертывания крови

В 1967 году Питер Вольф описал элементы плазмы и сыворотки здоровых людей, «образующиеся в тромбоцитах, но выделяемые из интактных тромбоцитов» и способные к поддержанию свертывания [258]. Было выявлено, что эти небольшие элементы, по размеру меньшие, чем тромбоциты, являются внеклеточными везикулами, образующимися в тромбоцитах в ответ на активацию. Дальнейшие исследования показали, что фактически активированные тромбоциты выделяют два типа везикул: экзосомы (примерно 40–100 нм в диаметре), высвобождаемые путем экзоцитоза из мультивезикулярных телец и α -гранул, и микрочастицы (диаметром примерно 100–1000 нм), также называемые тромбоцитарными микровезикулами (ТМВ) или эктосомами, высвобождаемые путем почкования (выпячивания) цитоплазматической мембраны [129].

Мембранная асимметрия расположения фосфолипидов активно регулируется «flip-flop» (от англ. *flip* – входящий и *flop* – исходящий) механизмом, опосредованным фосфолипидными транспортерами – флиппазой и скрамблазой (см. главу 1.5.2). В ответ на активацию агонистами (тромбин, коллаген, АДФ), увеличение содержания внутриклеточного кальция вызывает активацию фосфолипидной скрамблазы, отвечающей за бинаправленный транспорт фосфолипидов, тем самым приводя к быстрому появлению отрицательно заряженного фосфолипида (ФС) на поверхности тромбоцитов. Кроме того, ремоделирование плазматической мембраны тромбоцитов вызывает высвобождение ТМВ. Есть убедительные данные о важной роли трансмембранных белков (TMEM16) в Ca^{2+} -зависимой транслокации фосфолипидов мембраны при участии скрамблазы и в экспозиции фосфатидилсерина. В частности, трансмембранный белок TMEM16F необходим для скрамблаза-ассоциированной транспортировки фосфолипидов, и удаление у

мышь этого гена прекращает высвобождение ТМВ из тромбоцитов [235]. Кроме того, недавние наблюдения за активацией тромбоцитов под влиянием скорости тока крови выявили новый механизм продукции ТМВ. Оказалось, что в условиях физиологического потока от адгезированных тромбоцитов отходят длинные (до 250 мкм) «выпячивания» мембраны. Интересно, что всего через несколько секунд после адгезии индуцированные потоком выпячивания мембраны могут быть фрагментированы в ТМВ с экспозицией ФС [119].

Поверхностные маркеры ТМВ гетерогенны и зависят от их размеров и состава. Доказано, что изменение мембраны под влиянием скрамблазы и экспозиции ФС необходимо для высвобождения ТМВ, однако большая часть ТМВ, присутствующих в крови, в лимфе и синовиальной жидкости, не экспонирует на поверхности ФС (обозначается как ФС⁻ТМВ). Молекулярные механизмы, лежащие в основе образования ФС⁻ТМВ, неизвестны, но, возможно, могут быть связаны с определенными фосфолипазами или присутствием в ТМВ ферментов, участвующих в поддержании мембранной асимметрии. Имеется и другое объяснение: ФС действительно присутствует на всех ТМВ, но определенные факторы (например, недостаточная экспрессия ФС, складчатость мембраны) препятствуют их обнаружению ФС-связывающими зондами, такими как аннексин V и лактадгерин [137].

На ТМВ также представлены гликопротеины тромбоцитов – GPIIb / IIIa (CD41 / CD61) и маркеры активации – Р-селектин (CD62P). Flaumenhaft и соавт. предположили, что большинство CD41⁺ ТМВ в плазме фактически образованы из мегакариоцитов, а не из тромбоцитов. Исследователи пришли к выводу, что ТМВ можно отличить от мегакариоцитарных микровезикул посредством обнаружения CD62P и LAMP-1, представленных на ТМВ [162].

Протеомное исследование выявило корреляцию между составом и размером ТМВ: небольшие ТМВ (100–500 нм) богаты белками (особенно происходящие из α -гранул), тогда как более крупные ТМВ богаты липидными медиаторами и митохондриальными белками. (рисунок 7). Несмотря на то, что ТМВ происходят из безъядерных тромбоцитов, они содержат ферменты, факторы транскрипции,

рецепторы, цитокины, нуклеиновые кислоты, липидные медиаторы и митохондрии. Различные пути активации тромбоцитов могут влиять на состав ТМВ (рисунок 9).

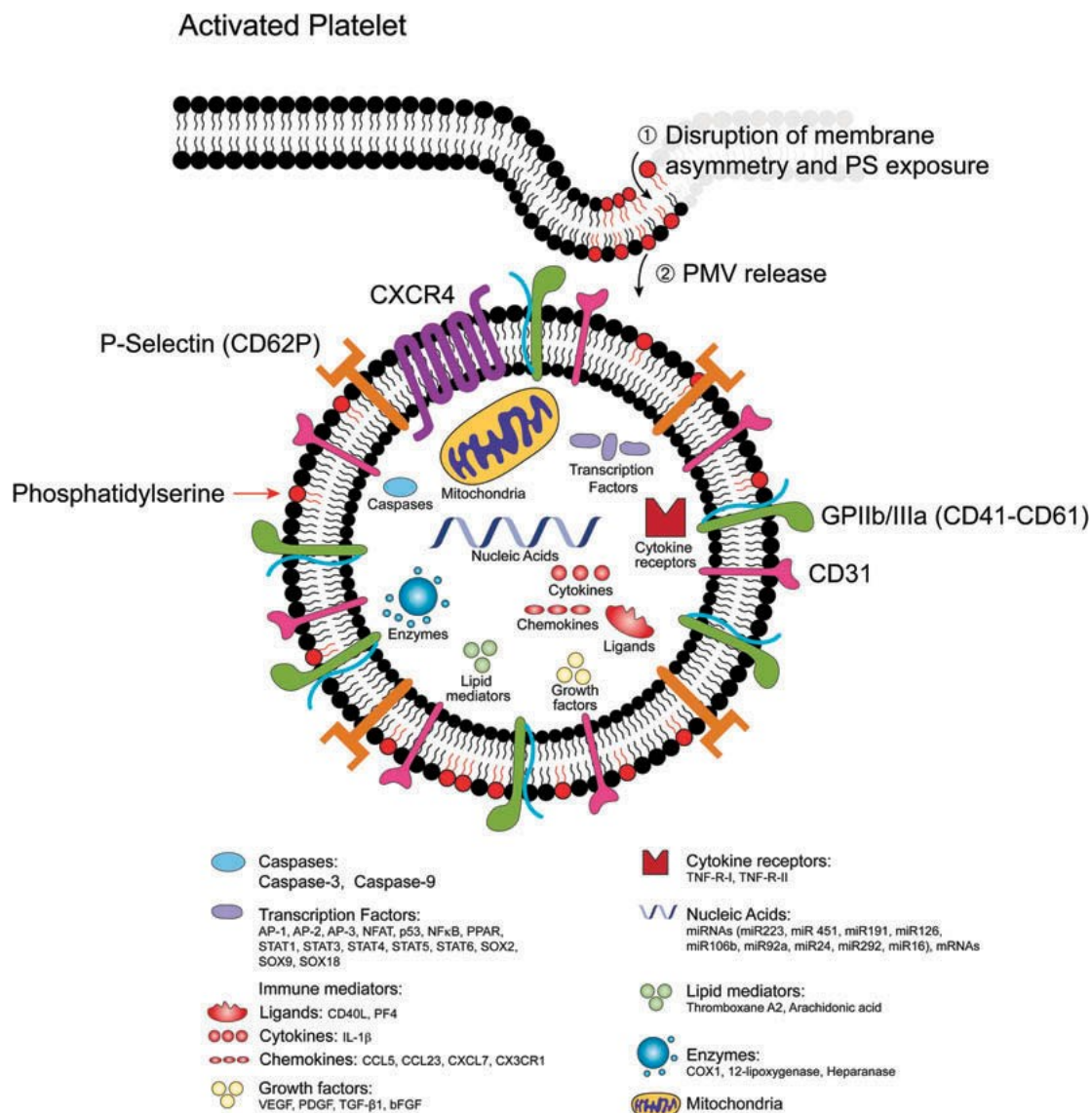


Рисунок 9 – Структура ТМВ [187]

Появляется все больше свидетельств того, что ТМВ клеточного происхождения появляются не только при патологических процессах, но и циркулируют в крови в норме. Действительно, несмотря на то, что количество эритроцитов превышает количество тромбоцитов приблизительно в 30 раз, ТМВ являются одними из самых распространенных микровезикул в крови здоровых людей и превышают по количеству эритроцитарные микровезикулы примерно в

2-4 раза, в зависимости от метода, используемого для количественной оценки [117]. В настоящее время мало данных о времени циркуляции ТМВ в системе кровообращения. В работах разные авторы указывают на продолжительность от 10 минут до нескольких часов. Все исследования были описаны для ТМВ с ФС^+ , в то время как скорость выведения ФС^- -ТМВ в настоящее время неизвестна. Один из механизмов, предложенных для объяснения высокой скорости выведения – стимулируемый лактадгерином фагоцитоз, опосредованный макрофагами. Эндотелиальные клетки также участвуют в элиминации ФС^+ -ТМВ из кровотока путем эндоцитоза через онтогенетический эндотелиальный локус-1 (Del-1) – белок, в основном экспрессируемый эндотелием, который служит якорем между эндотелиальными клетками и ТМВ, экспонирующими ФС . Более того, учитывая преобладание ФС^- -ТМВ в лимфатической циркуляции, можно предположить, что лимфоциты могут отвечать за клиренс этих ТМВ. Несмотря на их многочисленность в кровотоке, функции ТМВ у здоровых людей и при патологии еще изучены недостаточно и представляют интересную область для исследований в будущем [17, 26, 187].

1.6.1. ТМВ при гемостазе и тромбообразовании

Хотя тромбоциты и играют центральную роль в свертывании и образовании сгустков, предполагается, что коагуляционная способность ТМВ в 50-100 раз выше, чем у активированных тромбоцитов, что указывает на ключевую роль ТМВ при свертывании крови [17, 95]. Процесс коагуляции начинается за счет воздействия ТФ и его связывания с фактором VII, приводящего к образованию внешнего теназного комплекса (ТФ и фактор VIIa), формированию внутреннего теназного комплекса (активированный фактор VIII и фактор IX) и комплекса протромбиназы (активированные факторы V и X). Образование протромбиназных и теназных комплексов требует отрицательно заряженной поверхности. Поэтому ФС^+ -ТМВ, как и тромбоциты, обеспечивают каталитическую поверхность для коагуляции и связывают такие факторы свертывания крови, как IXa и VIII [17, 117]. Помимо обеспечения коагуляционной поверхности, Зубаирова и соавт.

продемонстрировали, что CD61+ (GPIIb), представленный на ТМВ здоровых доноров, поддерживает образование фибринового сгустка за счет прямого присоединения к фибриновым волокнам и увеличения быстрого образования тромбина [87].

Trans и соавт. предположили, что активация тромбоцитов приводит к образованию как прокоагулянтных, так и антикоагулянтных ТМВ, которые могут участвовать в поддержании гемостаза через образование небольшого уровня тромбина и последующей активации антикоагулянтных белков [93].

ТМВ играют роль в различных нарушениях гемостаза. У пациентов с дефектом Кастамана (заболевание, связанное с удлинённым временем свертывания, характеризующееся склонностью к кровотечениям) выявлена неспособность генерировать ТМВ. На удивление, никаких изменений в активности протромбиназы обнаружено не было, что указывает на потенциальный вклад базальных уровней ТМВ в коагуляцию [79]. И наоборот, пациенты с синдромом Скотта, врожденным аутосомно-рецессивным заболеванием с нарушением свертывания крови, имеют нормальное количество ТМВ, но при этом у них определяется нарушение прокоагулянтной активности протромбиназы. ТМВ у этих пациентов демонстрируют нарушенную способность к коагуляции из-за дефектной экспозиции ФС в мембране и, следовательно, недостаточной прокоагулянтной поверхности для факторов свертывания (рисунок 10). Молекулярные механизмы, лежащие в основе низкой экспозиции ФС, до конца не изучены, но могут быть связаны с неэффективным механизмом транспортировки из-за дефектов скрамблазы и флоппазы. У пациентов с синдромом Скотта в скрамблазе обнаружена мутация TMEM16F, которая была связана с дефектом экспозиции ФС [94].

Потенциальная роль ТМВ также описана при других нарушениях свертывания крови, в том числе при иммунной тромбоцитопении (ИТП). Пациенты с ИТП имеют циркулирующие антитромбоцитарные поверхностные гликопротеиновые антитела, приводящие к деструкции тромбоцитов. Более высокие уровни ТМВ наблюдались у бессимптомных пациентов по сравнению

теми, у кого были симптомы ИТП, что предполагает защитную роль ТМВ при этом заболевании. Более того, недавнее исследование показало, что у пациентов с ИТП, несмотря на низкое количество тромбоцитов, повышался прокоагулянтный потенциал крови, отчасти из-за повышенного уровня ТМВ в их крови. Фактически, ТМВ помогают преодолевать дефекты коагуляции, связанные с ИТП. Кроме того, имеется корреляция содержания ТМВ у пациентов с ИТП и повышенным риском тромботических событий [198].

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) – редкое заболевание вследствие соматической мутации, приводящей к отсутствию якорных-гликозилфосфатидилинозит-белков на поверхности клетки. Белки системы комплемента CD55 и CD59 входят в число этих белков, что приводит к повышенной чувствительности комплемента, более высокой активации тромбоцитов и повышенному риску протромботических событий. У пациентов с ПНГ определяется повышенное число циркулирующих прокоагулянтных ТМВ, большинство из которых образованы тромбоцитами. Исследования *in vitro* показали, что тромбоциты пациентов с ПНГ, у которых отсутствует CD59, более чувствительны к связыванию с C5b-9 субъединицей комплемента, и высвобождают ТМВ с активностью протромбиназы, большей в 10 раз, чем тромбоцитов группы контроля. Несмотря на прогресс в понимании роли ТМВ в процессах свертывания, точные механизмы их участия в процессах нарушения коагуляции или протромботических событиях требует дальнейшего изучения [75].

1.6.2. ТМВ и побочные реакции при переливании крови

Переливание компонентов крови может вызвать иммунную реакцию у реципиента (рисунок 10). Интересно, что переливание тромбоконцентратов гораздо чаще связано с побочными реакциями, чем переливание эритроцитарной массы. В концентратах тромбоцитов обнаруживаются ТМВ, которые содержат маркер активации CD62P, что обеспечивает их адгезию к лиганду-1 гликопротеина Р-селектина, экспрессирующегося на поверхности лейкоцитов [197].

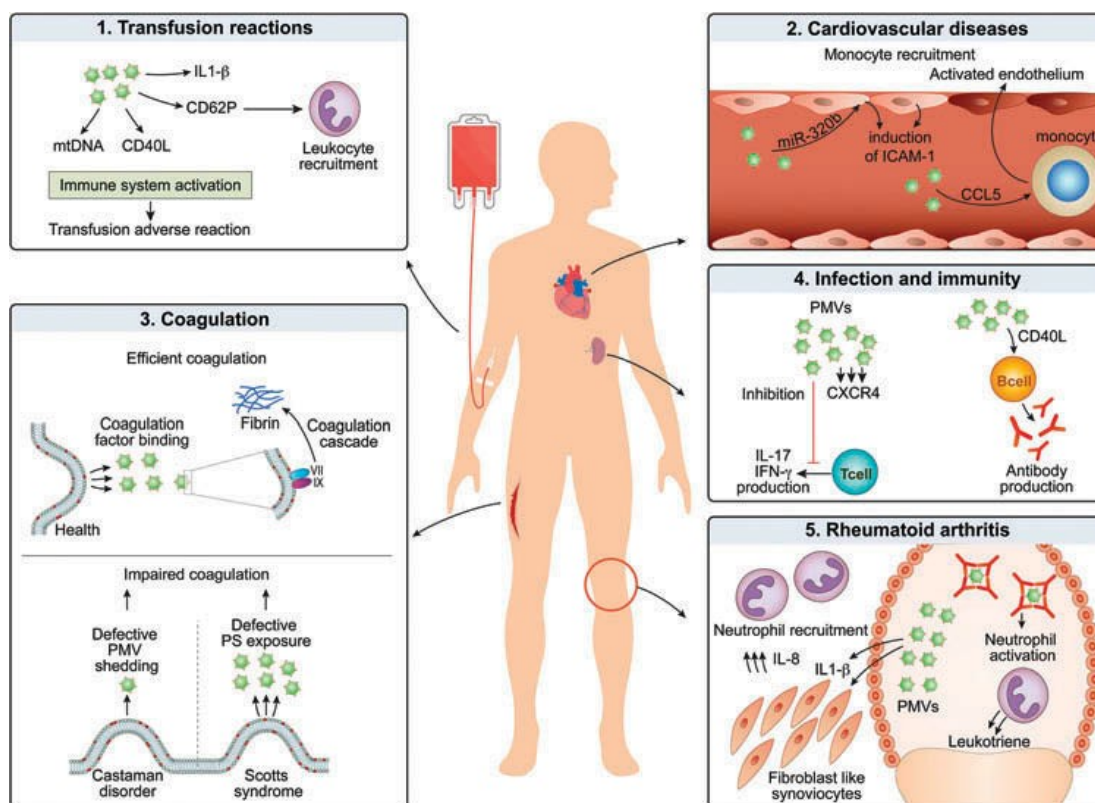


Рисунок 10 – Значение ТМВ физиологических и патологических состояниях. 1. Побочные реакции при переливании крови через высвобождение мДНК. 2. Адгезия моноцитов на активированном эндотелии, и формирование атеросклеротических поражений с помощью CCL-5-зависимого механизма. 3. Поверхность ТМВ как мощный плацдарм для инициирования каскада коагуляции. 4. Роль ТМВ в инфицировании клеток ВИЧ. ТМВ передают CXCR4 в CXCR4 клетки, модулируют продукцию IL-17 и IFN γ посредством CXCR3-зависимого механизма [222], доставляют функциональный CD40L к В-клеткам, тем самым вызывая эффективную продукцию IgG. 5. Роль ТМВ в усилении воспаления при ревматоидном артрите за счет образования иммунных комплексов при распознавании аутоантител, которые стимулируют выработку лейкотриенов нейтрофилами [187]

Помимо медиаторов воспаления, ТМВ также участвуют в транспорте митохондрий тромбоцитарного происхождения. Циркулирующая

митохондриальная ДНК (мДНК) – сильный провоспалительный триггер. Известна ее роль в качестве маркера повреждения. Важно отметить, что мДНК может быть связана с побочными реакциями на гемотрансфузию. Yasui и др. обнаружили, что концентраты тромбоцитов, связанные с негемолитическими трансфузионными реакциями, содержали более высокие уровни мДНК, чем плазма и эритроцитарная масса, что позволяет предположить, что уровни ТМВ в переливаемых концентратах тромбоцитов могут быть критерием исключения донора [165].

1.7. Роль тромбоцитов в патогенезе различных заболеваний

Одним из базисных элементов патогенеза ряда заболеваний, таких как диабет, атеросклероз, гипертоническая болезнь, инфекционные и иммунные заболевания, является повышенная функциональная активность тромбоцитов. Гиперактивность этих клеток крови может возникать из-за действия прокоагулянтных стимулов, а также утраты профилактического эффекта антиагрегантов.

Многие патологические процессы приводят к повышению тромбогенного потенциала крови в результате эндотелиальной дисфункции [196]. Дисфункция эндотелия, возникающая в результате диабета, преэклампсии, ССЗ и других заболеваний, приводит к уменьшению ингибирующего влияния эндотелиальных сигналов (простациклина и NO) и является важным фактором активации тромбоцитов. Эндотоксины, попадающие в кровоток из кишечника, также обладают активирующим влиянием на гемостаз [10, 49, 51]. Факторы активации тромбоцитов появляются в результате неадекватной эндотелиальной сигнализации. Например, лизофосфатидная кислота в атеросклеротических бляшках может вызывать активацию тромбоцитов, что, в свою очередь, вызывает высвобождение таких факторов, как АДФ и ТХА₂ из тромбоцитов, которые вызывают агрегацию тромбоцитов и тромбоз [231].

1.7.1. Тромбоциты и сахарный диабет 2 типа

Тромбоциты при сахарном диабете (СД) 2 типа характеризуются гиперактивностью с повышенной склонностью к активации, адгезии и агрегации из-за нарушения регуляции нескольких сигнальных путей. Данные изменения связаны с различными метаболическими нарушениями, такими как гипергликемия, резистентность к инсулину, ожирение, дислипидемия, повышенная системная воспалительная активность и окислительный стресс, развитие которых в эксперименте могут индуцированы парентеральным введением эндотоксина [49].

Гипергликемия приводит к гликированию поверхностных белков тромбоцитов, что повышает адгезию тромбоцитов за счет снижения «текучести» мембраны. Кроме того, воздействие гиперосмолярности активирует экспрессию GP IIb/IIIa тромбоцитов и Р-селектина, что позволяет предположить, что гипергликемия может оказывать прямое осмотическое действие. Гипергликемия индуцирует механизм свертывания крови за счет увеличения высвобождения протромботических молекул, таких как ФВ и ТФ, в то время как ингибирует фибринолиз за счет повышения концентрации ингибитора активатора плазминогена 1 типа (РАI-1) [146].

Окислительный стресс, характерный для СД 2 типа, также увеличивает концентрацию кальция внутри тромбоцитов. У пациентов с СД 2 типа часто имеются и другие сопутствующие метаболические состояния, такие как ожирение, дислипидемия, которые также могут способствовать повышению гиперактивности тромбоцитов. Ожирение является частой особенностью пациентов с СД 2 типа и может вызывать или усугублять резистентность к инсулину, что имеет значительные последствия для реактивности тромбоцитов. В связи с этим, интересным представляется отметить тот факт, что ожирение сопровождается существенным повышением концентрации эндотоксина в общем кровотоке [1]. Кроме того, высокая концентрация лептина в сыворотке крови также приводит к повышению агрегации тромбоцитов при их активации. У

пациентов с более высоким индексом массы тела была выявлена нарушенная реакция на антитромбоцитарные препараты, такие как клопидогрел [146].

Средний объем тромбоцитов (MPV) является важным маркером активации тромбоцитов. Сообщалось, что у пациентов с СД 2 типа MPV значительно выше, чем у контрольной группы, что способствует увеличению содержания альфа-гранул в цитоплазме и указывает на нарушение системы мегакариоциты-тромбоциты [160]. Следовательно, тромбоциты могут быть важным фактором для оценки сосудистого риска при СД 2 типа.

1.7.2. Тромбоциты и атеросклероз

ССЗ являются причиной смерти 17,3 миллионов человек в год, и уровень смертности продолжает расти. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ишемическая болезнь сердца (ИБС) унесла жизни более чем 9 млн человек за 2020 год [225]. Тромбоциты играют важную роль в патогенезе коронарного тромбоза и атерогенезе. Исследования показали, что активность тромбоцитов различна у людей в разных популяциях, что может объяснить вариабельность ССЗ. Тромбоциты играют важную роль в метаболизме липидов при ССЗ, и липиды могут активировать тромбоциты при влиянии воспалительных факторов. Тромбоциты активируются рецепторами пептидных гормонов, сигнальными и секретируемыми белками, микроРНК и в результате окислительного стресса [147].

Окислительный стресс и выработка активных форм кислорода (АФК) также могут активировать тромбоциты и играть определенную роль в патогенезе ССЗ, особенно в пожилом возрасте [61].

ФС на поверхности тромбоцитов инициирует активность тромбина. Недавние исследования свидетельствуют об увеличении прокоагулянтной популяции тромбоцитов, несущих ФС на поверхности, при ИБС и эссенциальной тромбоцитемии. Наличие ФС-прокоагулянтных тромбоцитов увеличивает риски повторных тромботических событий [173].

Роль ТМВ

Уровни ТМВ изменяются при большей части ССЗ. Например, у пациентов с атеросклерозом сонных артерий уровень крупных ТМВ выше, чем у здоровых пациентов даже после статистической корректировки с факторами риска ССЗ [112]. Также повышенные уровни ТМВ были обнаружены во время острой фазы ишемического инсульта. Повышенные концентрации ТМВ были связаны с обширным повреждением при инфаркте миокарда (ИМ) [185]. Хемотаксис моноцитов из просвета артерии в субэндотелиальное пространство происходит на начальных стадиях развития атеросклероза. Следует отметить, что ТМВ модулируют адгезию моноцитов к эндотелию сосудов (рисунок 10) [186]. Кроме того, считается, что ТМВ способны переносить микроРНК. ТМВ, высвобождаемые активированными тромбоцитами при инфаркте миокарда, вызывают экспрессию молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) эндотелиальными клетками путем доставки микроРНК, содержание которой повышено в плазме пациентов с ИМ, что может в дальнейшем способствовать привлечению воспалительных лейкоцитов к артериальной стенке с инициацией воспалительного ответа [190].

Роль липидов

Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) могут активировать тромбоциты и тромбоз путем индукции ТФ и факторов воспаления. ЛПНП тромбоцитов коррелирует с экспрессией CXCR7 на их поверхности. ЛПНП индуцирует выработку АФК, что увеличивает внутриклеточное перекисное окисление липидов. Окисленные метаболиты, связанные с повышением уровня мембранных фосфолипидов у пациентов с ССЗ, приводят к изменению липидного состава мембран [139].

Липиды играют важную роль в регуляции функций тромбоцитов. Ацетил-коэнзим А (Ацетил-КоА) карбоксилаза является субстратом аденозинмонофосфат-активированной протеинкиназы (АМРК) и играет центральную роль в метаболизме жирных кислот в тромбоцитах. Стимуляция тромбина может активировать АМРК в тромбоцитах и фосфорилирование легких

цепей миозина, кофлина и стимулированного сосудорасширяющим фактором фосфопротеина. Эти белки вызывают изменение формы тромбоцита и приводят к дегрануляции при активации тромбоцитов [223]. Исследования показали, что фосфорилирование Ацетил-КоА карбоксилазы с помощью АМРК может регулировать содержание липидов. Недостаточность сигнализации АМРК-Ацетил-КоА карбоксилазы вызывает изменения в структуре тромбоцитов за счет увеличения секреции ТХА2 и АДФ и приводит к активации коллагеном.

Роль гена WDR1 в функциональной активности тромбоцитов и риск ИБС

Домен повтора-1 (WDR1) регулирует мегакариопоз и продукцию тромбоцитов и является важным кофактором для фактора деполимеризации актина (ADF) – кофлин-F-актина, который может повышать активность ADF-кофлина, приводя к расщеплению актина. Повышенная экспрессия WDR1 уменьшает адгезию и содержание F-актина, снижает концентрацию кальция и активацию тромбина. Недостаток WDR1 вызывает воспаление и макротромбоцитопению и снижает содержание ADF-кофлина, что приводит к снижению образования тромбоцитов и деполимеризации актина. Уменьшение деполимеризации актина WDR1 увеличивает стабильность F-актина, приводит к активации и связыванию WDR1 с коллагеновым матриксом и увеличению адгезии тромбоцитов. Данные изменения приводят к увеличению размера тромбоцитов без увеличения их количества. Эти тромбоциты активируются сильнее и проявляют большую протромботическую активность, что увеличивает риск ССЗ [168]. В этой связи нельзя не вспомнить давно известную способность эндотоксина активировать миелопоэз в эксперименте на животных [49].

Гормоны как связующее звено между активацией тромбоцитов и ССЗ

На тромбоцитах представлены рецепторы пептидных гормонов. Лептин может активировать тромбоциты и усиливать тромбообразование. Исследования показали, что лептин активирует сигнальный каскад тромбоцитов, включающий длинную форму рецептора лептина, фосфатидилинозитол-3-киназу, протеинкиназу В, субстрат рецептора инсулина-1 и фосфодиэстеразу 3А. Активация этого каскада приводит к увеличению активности фосфодиэстеразы

3А тромбоцитов и снижает ингибирующую роль цАМФ в тромбоцитах. Адипонектин секретируется из жировой ткани и оказывает противоатеросклеротическое и противовоспалительное действие на кровообращение [111]. Ингибирование активации тромбоцитов может подавлять развитие атеросклероза. Активация тромбоцитов связана с резистентностью к инсулину. Следуя взаимосвязи между адипонектином и резистентностью к инсулину, можно рассмотреть связь между активацией тромбоцитов и гипoadипонектинемией. Исследования показали, что агрегация лейкоцитов и тромбоцитов характерна для гипoadипонектинемии и атеросклероза [180], что согласуется с определяющей ролью эндотоксина в атерогенезе [2].

Окислительный стресс и нарушения гемостаза у пожилых людей

В пожилом возрасте дисбаланс в системе гемостаза и функциональной активности тромбоцитов может привести к ССЗ. В результате активации тромбоцитов появляются АФК, включая супероксидный анион ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильные радикалы ($OH^{\cdot}$) и перекись водорода (H_2O_2) в результате мобилизации кальция, инактивации оксида азота и взаимодействия с арахидоновой кислотой для образования изопростагландинов. АФК вырабатываются в тромбоцитах НАДФН-оксидазой, циклооксигеназой, свободной эндотелиальной синтазой оксида азота, ксантиноксидазой митохондрий. Однако именно НАДФН-оксидаза имеет основное значение для продукции АФК [174].

Средний объем тромбоцитов

Некоторые исследования свидетельствуют о том, что MPV может предсказывать развитие ССЗ, а также исходы у пациентов с ИБС. Также имеются данные, указывающие на связь с сопутствующими заболеваниями (например, сахарный диабет и нарушение гликемического контроля), которые ожидаются у пациентов с ИБС. Не было выявлено влияния на MPV лекарств, обычно используемых для лечения ИБС. Кроме того, MPV может предсказывать эффект антитромбоцитарных препаратов (например, клопидогрела). Имеются также данные о корреляции MPV с инсультом и фибрилляцией предсердий [160].

Таким образом, тромбоциты играют важную роль в патогенезе ССЗ.

1.7.3. Тромбоциты и преэклампсия

Преэклампсия – это заболевание, при котором впервые возникает гипертензия и протеинурия во второй половине беременности. Эндотелиальная дисфункция играет ключевую роль в развитии преэклампсии и запускает процессы тромбообразования. Однако в последнее время появляется все больше доказательств того, что плацентарная сверхэкспрессия тканевого фактора и PAR-1 имеет одно из основных значений в патофизиологии преэклампсии. Чрезмерная активация тромбоцитов, нейтрофилов и системы комплемента также может способствовать патологии плаценты и материнского эндотелия, ответственных за проявления преэклампсии [122].

Тромбоциты играют потенциально важную роль в патогенезе данного заболевания, и анализ функции тромбоцитов может оказаться чувствительным биомаркером развития преэклампсии. Согласно данным систематического обзора 2019 года, при преэклампсии увеличивается содержание маркеров активации тромбоцитов, особенно Р-селектина и MPV тромбоцитов [183].

1.7.4. Тромбоциты и COVID-19

С декабря 2019 года вспышка новой коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19), которая началась с города Ухань, расположенного в китайской провинции Хубэй, распространилась по всему миру, и 11 марта 2020 года ВОЗ объявила COVID-19 пандемией [90, 91].

Во всех случаях данного заболевания наблюдаются нарушения в системе гемостаза. Лабораторные изменения крови, а именно D-димера, тромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), а также тромбоцитопения и гипофибриногенемия появляются на 7-11 день заболевания. Данные лабораторные проявления предполагают развитие ДВС-синдрома, однако его проявление отличается от такового, наблюдаемого при сепсисе, где тромбоцитопения гораздо более глубокая, а повышение уровня D-димера не достигает значений, наблюдаемых в случаях COVID-19. Имеющиеся

данные свидетельствуют о том, что коагулопатия, связанная с COVID-19, представляет собой комбинацию ДВС-синдрома низкой степени тяжести и тромботической микроангиопатии в русле легочной артерии, что может оказать значительное влияние на дисфункцию органов у большинства пациентов с тяжелым течением заболевания [90].

Наличие коагулопатии как части синдрома системного воспалительного ответа является общей особенностью тяжелого COVID-19. Примерно у 20-50% госпитализированных пациентов с COVID-19 наблюдаются гематологические изменения в коагуляционных тестах (повышение D-димера, увеличение тромбинового времени, тромбоцитопения и/или низкий уровень фибриногена). Это состояние характеризуется скорее тромботическими, чем геморрагическими явлениями, связанными с коагулопатией (в частности, венозной тромбоэмболией). С другой стороны, дисфункция эндотелия приводит к высоким уровням D-димера, продуктов деградации тромбина и фибрина, тромбоцитопении и увеличению времени свертывания крови. Гипоксия и микрососудистая окклюзия в дополнение к тромбозу крупных сосудов ведет к ишемическим событиям (инсульты, ишемия конечностей и т. д.), которые обычно наблюдаются у пациентов в отделениях интенсивной терапии [91].

Отложение фибрина и тромбина происходит главным образом в микроциркуляторном русле легких, являясь фактором, способствующим развитию острого респираторного дистресс-синдрома и коагулопатии у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Кроме того, гипоксия, возникающая при тяжелом течении COVID-19, может усугубить тромбоз не только за счет увеличения вязкости крови, но и за счет индуцируемого гипоксией сигнального пути, зависящего от фактора транскрипции.

Рецептором вирусной адгезии является рецептор ангиотензин-превращающего фермента-2 на эндотелиальных клетках, и репликация вируса вызывает лейкоцитарную инфильтрацию, апоптоз эндотелия и микрососудистые протромботические явления. Другой важной характеристикой инфекции COVID-19 является реакция прокоагулянтов острой фазы, когда реагенты острой фазы

(такие как фактор VIII, ФВ и фибриноген) связаны с повышенным риском тромбоза, непосредственно связанным с повышенным уровнем фибриногена. В тяжелых случаях заболевания наблюдается повышение уровня воспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли и интерлейкинов, в том числе интерлейкина-1 (ИЛ-1) и интерлейкина-6 (ИЛ-6). ИЛ-6 индуцирует экспрессию ТФ в макрофагах, который инициирует активацию свертывания крови и выработку тромбина. Фактор некроза опухоли и ИЛ-1 являются основными медиаторами подавления эндогенного каскада свертывания крови. У пациентов с тяжелым течением COVID-10 может быть обнаружен цитокиновый шторм, характеризующийся высокими концентрациями провоспалительных цитокинов и хемокинов [232], в механизмах развития которых, по мнению М. Ю. Яковлева [49], инициирующая роль принадлежит эндотоксиновой агрессии кишечного происхождения.

1.8. Современные подходы к коррекции функциональных нарушений тромбоцитов

В связи с тем, что патогенез многих заболеваний связан с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов и склонностью к тромбообразованию, лечение и профилактика заключаются в назначении препаратов, влияющих на данные параметры. Внутрисосудистая активация тромбоцитов при повреждении эндотелия играет ключевую роль в процессах, в конечном итоге приводящих к атеротромбозу с окклюзией сосудов и последующим повреждением конечных органов-мишеней. Аспирин, антагонисты рецептора $P2Y_{12}$ для АДФ, ингибиторы GPIIb/IIIa (интегрин $\alpha IIb\beta 3$) и ворапаксар являются эффективными антитромбоцитарными средствами, но значительно повышают риск кровотечения [237, 239].

Аспирин (ацетилсалициловая кислота)

Аспирин или ацетилсалициловая кислота (АСК) необратимо ацетилирует сериновый остаток ЦОГ 1 и 2 типа, подавляя тем самым синтез простагландина G2 и H2 и, следовательно, образование ТХА2. Аспирин является антиагрегантной

терапией первой линии у пациентов с явным атеросклеротическим заболеванием как в острой, так и в долгосрочной вторичной профилактике ишемических событий. Согласно данным крупных мета-анализов, аспирин приводит к снижению риска атеротромботических событий на 20% по сравнению с плацебо у пациентов с высоким риском и групп вторичной профилактики [92].

Антагонисты P2Y₁₂

Доступные в настоящее время ингибиторы P2Y₁₂ включают 2 семейства: тиенопиридины – тиклопидин, клопидогрел и прасугрел, и производные нуклеозид–нуклеотидов – тикагрелор и кангрелор. Все тиенопиридины являются пролекарствами, которые должны быть превращены в активные метаболиты ферментной системой цитохрома печени (CYP) P450 перед необратимым связыванием с рецептором P2Y₁₂.

Тиклопидин в настоящее время не используется в клинической практике из-за его множественных побочных эффектов и не включен в актуальные гайдлайны.

Клопидогрел при приеме с аспирином – это современный режим двойной антитромбоцитарной терапии после планового чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) или периферической ангиопластики со стентированием. Однако он характеризуется замедленным началом действия, значительной вариабельностью ответа и недостаточной антитромботической активностью у некоторых пациентов [241].

Прасугрел обладает большей биодоступностью, более мощным антитромбоцитарным эффектом и меньшей вариабельностью межиндивидуального ответа, чем клопидогрел.

В отличие от тиенопиридинов, нуклеозидные антагонисты нуклеотидов тикагрелор и кангрелор не требуют биотрансформации, опосредованной CYP450, для обратимого связывания с рецептором P2Y₁₂ и ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Подобно прасугрелу, тикагрелор демонстрирует большую биодоступность и меньшую вариабельность ответа по сравнению с клопидогрелом [163].

Аналог АТФ кангрелор является единственным доступным внутривенным ингибитором $P2Y_{12}$. Он непосредственно и обратимо блокирует рецепторы $P2Y_{12}$ с быстрым началом действия в 2 минуты и коротким периодом полураспада от 3 до 5 минут [163].

Ингибиторы гликопротеина IIb/IIIa

Антагонисты рецепторов гликопротеина IIb/IIIa являются лиганд-миметическими молекулами, которые предотвращают связывание фибриногена с активированными тромбоцитами и тем самым непосредственно ингибируют агрегацию тромбоцитов.

В настоящее время одобрены три ингибитора GPIIb/IIIa: абциксимаб, тирофибан и эптифибатид. Абциксимаб представляет собой человеческий антиген-связывающий фрагмент моноклональных антител мыши. Эптифибатид – циклический гептапептид, а тирофибан – непептидная малая молекула. Все 3 средства вводятся внутривенно. Из-за высокого риска кровотечения их применение рекомендовано только для пациентов с острым коронарным синдромом с высокой тромботической нагрузкой [163].

Антагонисты PAR-1

PAR-1 отвечает за связывание тромбина с тромбоцитами человека, что обеспечивает сильную и стойкую активацию тромбоцитов. Ворапаксар является конкурентным антагонистом PAR-1 и может использоваться в дополнение к стандартной антиагрегантной терапии для вторичной профилактики ишемических событий у пациентов с инфарктом миокарда в анамнезе или симптоматическим заболеванием периферических артерий [244].

Проблемы современных антиагрегантов

В настоящее время широкий спектр современных препаратов, влияющих на функциональную активность тромбоцитов, не обеспечивает полную и эффективную профилактику и лечение тромботических осложнений. Резистентность к аспирину, по данным различных авторов, составляет от 5 до 45 % [5], а степень резистентности к клопидогрелу от 20 до 45% [38].

Недостаточная клиническая эффективность современных антиагрегантных препаратов объясняет необходимость поиска и создания новых соединений, способных более адекватно корректировать развитие нарушений в системе гемостаза при различных патологических состояниях. Все применяемые в настоящее время антиагреганты имеют рецепторный механизм действия. Современные исследования потенциальных лекарственных препаратов, влияющих на функциональную активность тромбоцитов, также направлены на подавление их рецепторной активности, при этом не учитываются значение каталитической поверхности клеточной мембраны. Кроме того, в настоящее время нет исследований соединений, имеющих мембранотропный механизм действия. Все это обуславливает значимость поиска новых точек приложения для подавления функциональной активности тромбоцитов и дальнейшего изучения механизмов активации тромбоцита.

1.9. Современные подходы к коррекции плазменно-коагуляционного звена гемостаза

Если антиагреганты предотвращают агрегацию тромбоцитов, то антикоагулянты ингибируют активность плазменных факторов свертывания крови [25]. При этом антикоагулянты не лизируют уже сформированные тромбы, но предотвращают образование новых или рост и распространение уже сформированных тромбов [55]. В течение многих десятилетий стандартной терапией для пациентов был варфарин. Однако из-за некоторых недостатков варфарина, включая необходимость постоянного регулярного мониторинга, были разработаны новые препараты, называемые прямыми пероральными антикоагулянтами.

Антикоагулянты включают парентеральные антикоагулянты, такие как гепарин и низкомолекулярные гепарины (НМГ), и пероральные антикоагулянты, к которым относятся антагонисты витамина К – например, варфарин, и пероральные прямые антикоагулянты (рисунок 11). Прямые пероральные антикоагулянты делятся на два класса: прямые ингибиторы тромбина – например,

дабигатран, и ингибиторы фактора Ха (анти-Ха) – например, апиксабан, эдоксабан, ривароксабан и бетриксабан. Идеальным антикоагулянтным препаратом является такой препарат, который не требует частого мониторинга, но может контролироваться, если необходимо, имеет четко определенную фармакокинетику (нет необходимости корректировать дозу при почечной или печеночной недостаточности), отличается простотой введения (однократное ежедневное пероральное введение) и возможностью легкой отмены при необходимости, а также отсутствием пищевых или лекарственных взаимодействий, быстрым началом действия. К сожалению, ни один из ныне существующих и применяемых антикоагулянтов не удовлетворяет всем этим критериям [169].

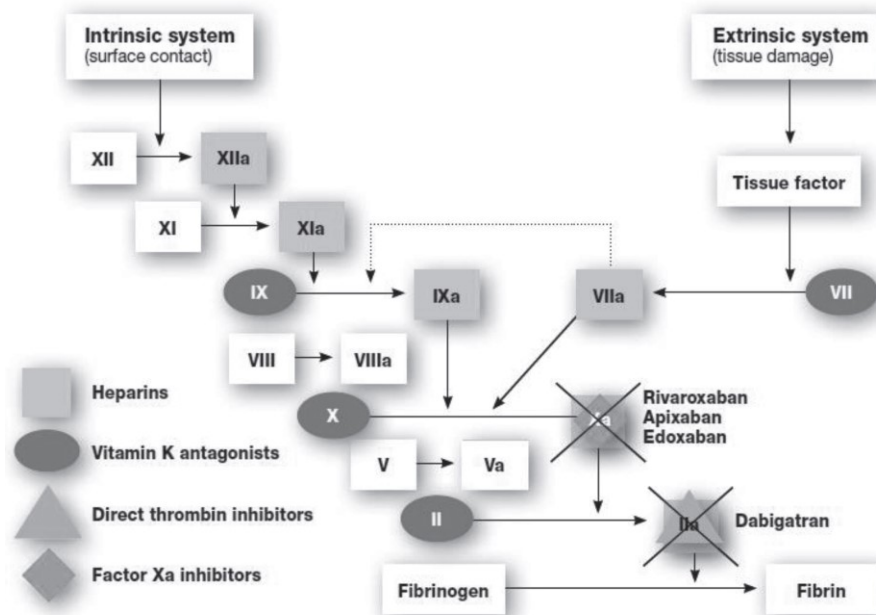


Рисунок 11 – Влияние антикоагулянтов на коагуляционный каскад [169]

Гепарины

Гепарин – это быстродействующий антикоагулянт, который можно разделить на два класса: нефракционированный гепарин (НФГ) и фракционированный, или НМГ. НМГ включают эноксапарин и дальтепарин. Гепарин связываются с антитромбином III (АТ-3) и повышают его активность.

АТ-3 – это естественный антикоагулянт, ингибирующий активность факторов XIIa, XIa, IXa и VIIa. Таким образом, гепарины инактивируют несколько внутренних активированных факторов (рисунок 11), что снижает активность тромбина [247].

В настоящее время мониторинг применения НФГ возможен путем оценки АЧТВ и анти-Ха активности (анти-Ха). АЧТВ используется чаще из-за его простоты автоматизации, доступности и более низкой стоимости, чем анти-Ха. Целевым терапевтическим уровнем является 1,5–2,5-кратное увеличение АЧТВ. Для оценки эффективности действия НМГ применяется анти-Ха [169]. Гепарины назначаются парентерально. Их преимуществом является быстрое начало действия, а также возможность быстрой отмены эффекта благодаря короткому периоду полувыведения.

Варфарин

Витамин К необходим для синтеза в печени факторов свертывания II, VII, IX и X (рисунок 11). Варфарин конкурентно ингибирует фермент комплекса эпоксидредуктазы-1 витамина К, который является ключевым ферментом для активации витамина К. Сложности назначения варфарина заключаются в подборе режима дозирования из-за выраженных индивидуальных различий в метаболизме и непредсказуемости дозозависимого эффекта. На метаболизм варфарина оказывают влияние генетические факторы, пища, прием других лекарственных средств и сопутствующие заболевания. После начала приема варфарина дозы титруются на основе результатов международного нормализованного соотношения (МНО). Еще одним недостатком варфарина является задержка достижения полного терапевтического эффекта, которая может достигать 5-7 дней. Задержка реализации антикоагулянтного эффекта обусловлена факторами свертывания, уже синтезированными и находящимися в кровотоке. Еще одним недостатком варфарина является возможность многочисленных лекарственных и пищевых взаимодействий [206].

Прямые ингибиторы тромбина

Дабигатран – пероральный антикоагулянт прямого действия, ингибитор тромбина, назначается перорально, не ингибирует CYP P450, что обуславливает низкую частоту лекарственных взаимодействий. Период полувыведения составляет 12-14 часов. В отличие от варфарина, дозозависимый эффект является предсказуемым и не требует регулярного лабораторного контроля [171].

Ингибиторы фактора Ха

Апиксабан – пероральный антикоагулянт прямого действия, ингибитор фактора Ха. Он быстро всасывается после приема внутрь и не зависит от приема пищи, имеет период полувыведения 12-15 часов. Доза подбирается исходя из показаний к лечению, возраста пациента, уровня креатинина в сыворотке крови и массы тела. К данному классу препаратов также относятся ривароксабан и эдоксабан.

1.10. Терпены и возможность их влияния на процесс инициирования системы гемостаза

Терпены представляют собой обширный класс природных соединений, широко представленный во всех живых организмах. Главным источником получения монотерпенов является неочищенная живица, получаемая из древесины хвойных растений при изготовлении целлюлозы – доступного и возобновляемого сырья. Основными фракциями скипидаров являются бициклические терпеновые углеводороды, состоящие главным образом из α -пинена (60-70%) и β -пинена (20-25%), а также небольших количеств лимонена (3-10%), анетолы (1-2%) и третичных алифатических спиртов (3-7%). Традиционно терпеноиды на растительной основе использовались людьми в пищевой, фармацевтической и химической промышленности [27].

Интерес к данному классу соединений связан с особенностями строения молекул терпенов, что позволяет предположить наличие биологической активности. Одной из функций терпеновых соединений является придание механических свойств клеточным мембранам. Терпены участвуют и в ключевых процессах, протекающих в мембранах: фарнезол принимает участие в процессе

алкилирования протеинов на стадии их созревания, убихиноны – в электронных переносах, доликолы (пренолы, включающие в себя более двадцати звеньев) являются основными партнерами процесса образования протеиновых гликозидов. В конечном итоге все эти функции терпенов играют важнейшую роль в процессе формирования и стабилизации мембран [28]. Терпеновый скелет способен к модификации в результате процессов окисления, ответственных за деградацию и функциональное разнообразие терпеноидов. Наиболее интересны реакции терпенов с серосодержащими реагентами и изучение данных биологической активности тиотерпеноидов. Многие продукты окислительного катаболизма терпенов являются биологически активными субстанциями.

Ранее Никитиной Л.Е и соавт. были разработаны синтетические подходы получения серосодержащих монотерпеноидов различной структуры [28, 69, 201, 217]. Показано, что разработанные соединения обладают противогрибковой, противовоспалительной, антимикробной и антихеликобактерной активностью, обладают низкой токсичностью, а также свободны от мутагенных и генотоксических эффектов [60, 218, 219].

В связи с вышеизложенным мы предположили, что терпеноиды могут обладать и антикоагуляционной активностью. Подтверждение этого предположения может открыть обнадеживающую перспективу применения этих соединений в качестве агента для изучения механизмов, влияющих на функциональную активность тромбоцитов. Недостаточная эффективность современных лекарственных препаратов оправдывает поиск новых мишеней антитромбоцитарного и антикоагуляционного воздействия.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект и предмет исследования

Диссертационная работа выполнена в научно-исследовательских лабораториях кафедры общей патологии и кафедры общей и органической химии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, а также в ГАУЗ «Республиканский центр крови МЗ РТ». ЯМР исследования проводились на базе кафедры медицинской физики Института физики КФУ и Института медицинской физики и биофизики Лейпцигского университета (Германия). Молекулярный докинг проведен в Институте химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук (г. Иваново). Атомно-силовая микроскопия выполнена в Научно-образовательном центре фармацевтики КФУ. Исследовательская работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Объектами исследования являлись: производные терпенов, синтезированные на основе β -пинена, изоборнеола, камфена и миртенола; тромбоциты крови человека; плазма крови здоровых доноров и больных с протромботическим состоянием – ИБС, а также модельные мембраны на основе додецилсульфата натрия (SDS), додецилфосфохолина (DPC) и фосфохолина.

Результаты исследования обработаны с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 2007. Все операции мы проводили с помощью Graph Pad. Prism software V.6 (GraphPad Software, Inc., США). Принимались во внимание средние точки данных и их стандартная ошибка. Проведен сравнительный анализ с помощью парного образца приложения t-критерия Стьюдента. Статистический анализ полученных результатов включает в себя методы описательной и сравнительной статистики. Анализ соответствия вида распределения признаку закона нормального распределения проведен с помощью теста Колмогорова-

Смирнова и Крускала-Уоллиса. Если вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы получали равным или меньше, чем 0,05, то делался вывод о наличии достоверных различий. Взаимосвязь между признаками оценена посредством корреляционного анализа: параметрическим методом Пирсона при нормальном распределении величин, непараметрическим методом Спирмена для распределения величин в ненормальных выборках (r). Результаты представлены в виде средних величин и стандартных отклонений.

2.2 Производные терпеноидов

В качестве мембранотропных агентов были выбраны терпеноиды борнановой структуры **1-3** и **6**, камфенового ряда **4**, пинановой структуры **5, 7-9** (рисунок 12). Синтез соединений был описан ранее в наших работах [12, 18, 103, 215, 218].

Структуры полученных соединений устанавливались при помощи данных ЯМР ^1H и ^{13}C («BrukerAvance», Германия), хроматомасс-спектрометрии («TurboMassGold», производитель «PerkinElmer», США) и рентгеноструктурного анализа, проведенного на дифрактометре («Bruker AXS GmbH», Германия).

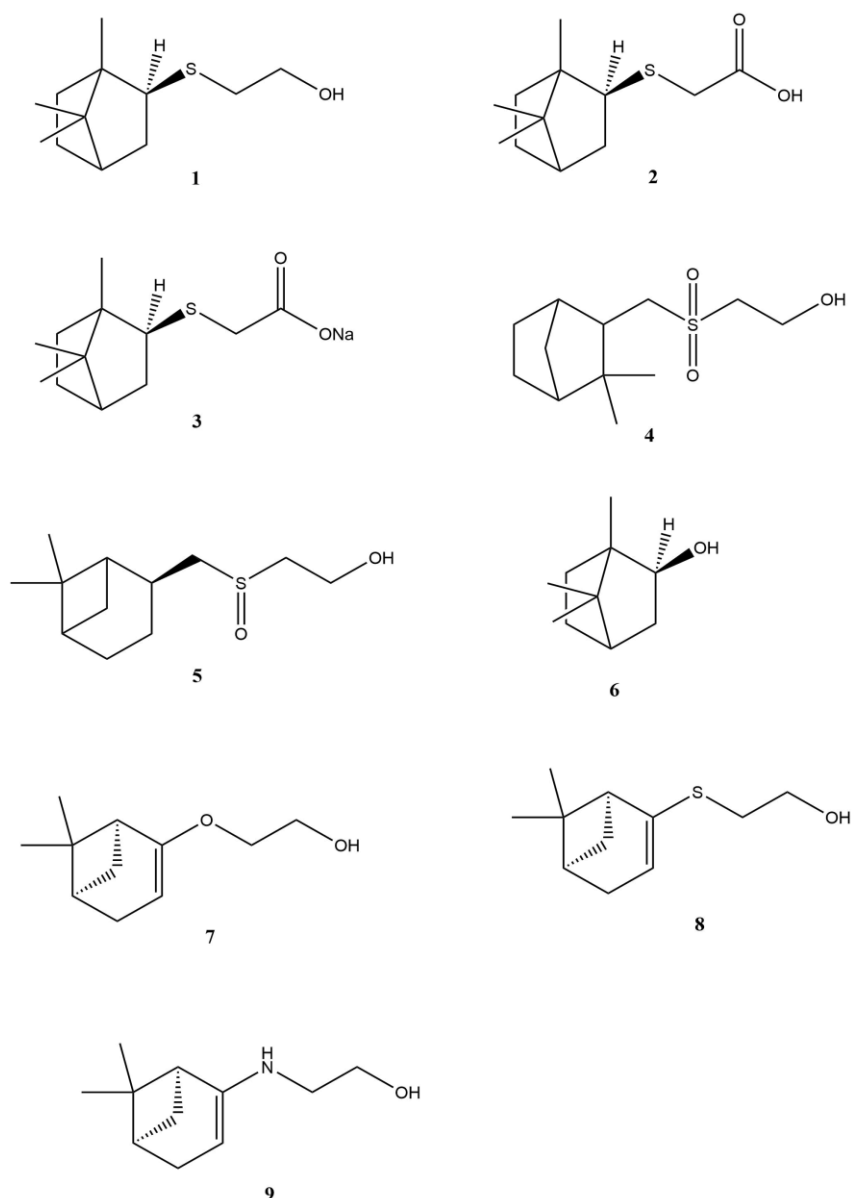


Рисунок 12 – производные терпеноидов

Соединение **1** – 2-((1S,2S,4S)-1,7,7-триметилбicyclo[2.2.1]гепт-2-ил]сульфанил)этанол.

Соединение **2** – 2.2.([(1R,2R,4R)-1,7,7-триметилбicyclo[2.2.1]гепт-2-ил]тио)уксусная кислота.

Соединение **3** – 2.3.([(1R,2R,4R)-1,7,7-триметилбicyclo[2.2.1]гепт-2-ил]тио)ацетат натрия.

Соединение **4** – 2-(((3,3-диметилбicyclo[2.2.1]гептан-2-ил)метил)сульфонил)этан-1-ол.

Соединение **5** – 2-((S)-(((1S,2R,5S)-6,6-диметилбicyclo[3.1.1]гептан-2-ил)метил)сульфанил)этан-1-ол.

Соединение **6** – изоборнеол.

Соединение **7** – 2-((((1S,5R)-6,6-диметилбицикло[3.1.1]гепт-2-ен-2-ил)метил)окси)этан-1-ол.

Соединение **8** – 2-((((1S,5R)-6,6-диметилбицикло[3.1.1]гепт-2-ен-2-ил)метил)тио)этан-1-ол.

Соединение **9** – 2-((((1S,5R)-6,6-диметилбицикло[3.1.1]гепт-2-ен-2-ил)метил)амино)этан-1-ол.

2.3. Определение цитотоксичности терпеноидов

С целью определения возможности использования изучаемых соединений в биологических исследованиях и выбора рабочих концентраций веществ были проведены эксперименты по установлению цитотоксичности тиотерпеноидов.

Основными реагентами данного метода являются растворы MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) и PMS (phenazine methosulfate). Оценка жизнеспособности клеток (фибробластов) в присутствии изучаемых соединений проводилась с помощью MTS-теста. MTS-тест является колориметрическим методом для определения пролиферативной активности и количества жизнеспособных клеток при анализе химиочувствительности к различным препаратам. В ходе эксперимента MTS трансформируется клетками в оптически активное вещество формазан. MTS-тест основан на колориметрической оценке оптической плотности формазана при длине волны 490 нм. В то же время PMS выступает в качестве акцептора электронов. Превращение MTS в формазан осуществляется ферментами – дегидрогеназами, которые присутствуют в метаболически активных клетках. Количество формазана, образованное клетками, измеренное путем определения его оптической плотностью при длине волны 490 нм, является прямо пропорциональным количеству живых клеток в культуре. Рабочие растворы готовили согласно протоколу производителя реагентов CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega, США).

2.3.1. Приготовление рабочих растворов для MTS-теста

Для приготовления раствора MTS 42 мг сухого порошка MTS (Promega, США) растворили в 21 мл раствора Дульбекко (DPBS) (ПанЭко, Россия). После полного растворения вещества доводили pH раствора до значений 6 – 6,5 добавлением 1 молярного раствора соляной кислоты (HCl). В стерильных условиях ламинарного бокса после фильтрования через 0,2 мкм фильтр аликвотировали по 950 мкл в пробирки. Образцы хранили в защищенном от света месте при -20°C . Для приготовления 1 мл раствора PMS 0,92 мг сухого порошка феназин метосульфата (Sigma, США) растворяли в 1 мл раствора Дульбекко (DPBS). Также фильтровали и аликвотировали по 50 мкл в микропробирки Eppendorf (Sarstedt, Германия). Упаковывали в фольгу и замораживали при -20°C .

2.3.2. Культивирование клеток для MTS-теста

Цитотоксичность исследуемых соединений определяли с использованием клеточной культуры фибробластов человека линии BJ (ATC.C., USA), культивируемых в среде DMEM/199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, GIBCO, Grand Island, NY), L-глутамина (0,3 мг/мл) и антибиотиков: пенициллина (100Е/мл) и стрептомицина (200 мг/мл) (Lonza, MD, USA), с помощью общепринятого МТТ-теста. Клеточную линию фибробластов инкубировали с исследуемым веществом в 96-луночных планшетах (Costar, USA), помещая их в CO_2 -инкубатор (LamSystems, Россия) на 24 часа при 37°C с 5% содержанием CO_2 .

Для этого клетки, достигшие 100% монослоя, пассировали в лунки 96-луночного планшета, к ним добавляли 1,5 мл трипсина (ПанЭко, Россия) и инкубировали в стандартных условиях CO_2 -инкубатора в течении 5-7 минут до отделения клеток от адгезивной поверхности пластика. Далее нейтрализовали трипсин средой в соотношении 1:2 и собирали суспензию клеток в пробирку для дальнейшего осаждения при помощи центрифугирования при 1000 оборотах в минуту в течение 3 минут. Затем супернатант отбирали, а к осадку клеток добавляли 1 мл MTS. 1 каплю получившейся суспензии клеток помещали на

слайд Counting Slid (Bio-Rad, США) и производили анализ на счетчике клеток TC 20TM Automated Cell Counter (Bio-Rad, Сингапур). В две лунки планшета добавляли питательную среду без клеток, данные пробы использовались в качестве отрицательного контроля. В остальные лунки добавляли по 100 мкл суспензии клеток в количестве 5×10^3 в ПКС на основе DMEM. При достижении монослоя клеток 70% в лунки добавляли соединения, либо производили трансфекцию. По истечении 24 часов после воздействия препаратов в каждую лунку планшета добавляли по 10 мкл смеси с раствором MTS/PMS (в соотношении 1:20). Через 1 час выполняли снятие результатов на планшетном фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, США) с использованием светофильтра 490 нм. Результаты получали в единицах оптической плотности с помощью программного обеспечения SkanIt Software 3.0 for Multiscan FC (Thermo Scientific, США). В качестве препарата сравнения использовали цитотоксик этопозид с концентрацией 40 мкМ/л. Контролем служил физиологический раствор, содержащий этиловый спирт в конечной концентрации 1,5%, используемый для получения раствора тиотерпеноида. Статистический анализ результатов проводили в программном обеспечении Excel 2010 (Microsoft, США).

2.4. Получение венозной крови и плазмы

Возможность использования синтезированных на основе терпенов веществ для коррекции гемостаза определяли *in vitro* на плазме крови человека. Взятие крови проводилось квалифицированным медперсоналом в медицинских учреждениях в полном соответствии с требованиями законодательства и разрешенных протоколов. Исследование было одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Взятие крови производилось при условии исключения приема препаратов, влияющих на свертывание крови и активность тромбоцитов за две недели до исследования. Эксперименты проводились *in vitro* на плазме крови здоровых доноров (n=20, возраст 20-35 лет) и больных с потенциально протромбогенным состоянием – ИБС (n=20, возраст 50-65 лет). Оценка размера выборки производилась на основе методологии, предложенной Д.

Коэном и реализованной в пакете *rwr* 1.3-0. 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 (центрифуга K23D, Германия) крови в течение 10 минут при скорости 1000 оборотов в минуту, после чего переливали верхний слой плазмы в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 минут при скорости 3000 оборотов в минуту для получения плазмы, бедной тромбоцитами, которая использовалась для разведения богатой тромбоцитами плазмы до фиксированной объемной концентрации тромбоцитов, определения коагуляционного гемостаза и тромбогенных свойств плазмы.

Плазму, обедненную микровезикулами, готовили путем фильтрации бесклеточной плазмы через мембрану с размерами пор 0,1 мкм (Millipore).

2.5. Определение агрегационной способности тромбоцитов

Индукцированная агрегация тромбоцитов проводилась на плазме, полученной от здоровых доноров. Спонтанная агрегационная активность измерялась на плазме крови больных с ИБС ($n=10$). Для эксперимента использовали плазму, богатую тромбоцитами.

Оценка агрегационной способности тромбоцитов проводилась по методу G. Born [72] при помощи анализатора «Chrono-Log Corporation» (США). Метод основан на обнаружении разницы светорассеивания после добавления агониста тромбоцитов в богатую тромбоцитами плазму. Оптическим контролем служил такой же объем плазмы, не содержащий тромбоциты. Оценивалась максимальная степень агрегации, выраженная в процентах. О степени агрегации судили по

максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции по сравнению с исходной величиной.

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.

Для индукции агрегации тромбоцитов применяли растворы: АДФ (5 мкМ), адреналина (10 мкМ), коллагена (2 мкг/мл), арахидоновой кислоты (0,5 мМ) и ристомицина (1 мг/мл) производства «Chrono-PAR» (США) в присутствии соединения (n=5 для каждого из соединений) и без него (n=5) на плазме крови здоровых доноров. Относительную эффективность полученного соединения определяли путем сравнения с ацетилсалициловой кислотой (n=5) и клопидогрелом (n=5), как наиболее клинически значимыми антиагрегационными препаратами. Для этого использовалась плазма больных ИБС, которые получали соответствующие лекарственные препараты. В исследовании в группе сравнения использовалась кровь 10 добровольцев в возрасте 50-65 лет: 5 человек принимали АСК в дозе 150 мг в сутки и 5 человек принимали клопидогрел в дозе 75 мг в сутки.

2.6. Определение тромбогенных свойств плазмы крови человека

2.6.1. Определение поверхностно-зависимых стандартных коагуляционных тестов

В спектр исследований коагуляционной активности плазмы были включены: АЧТВ, протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время (ТВ) в присутствии тиотерпеноидов (n=10 для каждого из соединений) и без них (n=10, контроль). Приготовление раствора терпеноидов описано в главе 2.4. Эксперименты проводились на плазме крови больных с протромбогенным

состоянием – ИБС. Коагуляционную активность определяли с помощью коагулометра «Минилаб-7001» (Россия).

При определении АЧТВ до начала анализа прогревали хлорид кальция 0,02М до 37° С. Далее добавляли в кювету 0,1 мл анализируемой плазмы и подогревали до 37° С, затем добавляли 0,1 мл лиофильно высушенного реагента на основе соевых фосфолипидов и фактора контакта – эллаговой кислоты (4,0 мл), смешивали и запускали таймер. Инкубировали смесь реагента и плазмы 3-5 минут (время активации) при 37°С, после чего добавляли 0,1 мл подогретого хлорида кальция 0,02 М и фиксировали время свертывания.

При установлении ПВ использовалась тромбопластин-кальциевую смесь, предварительно подготовленную за 20 мин до начала анализа, разведенную в 5,0 мл дистиллированной воды в соответствии с рекомендацией фирмы-изготовителя CoaguChek XS. Затем тромбопластин-кальциевую смесь помещали в водяную баню при +37°С и оставляли там до окончания работы. Далее, 0,1 мл плазмы прогревали в кювете коагулометра при +37°С. Через 60 секунд добавляли 0,2 мл прогретой тромбопластин-кальциевой смеси, и по таймеру определяли время свертывания. Точно также определяли ПТВ в контрольной нормальной плазме.

ТВ определяли при температуре +37°С, добавляя к 50 мкл плазмы 50 мкл заранее прогретого раствора тромбина фирмы Тромбо-тест, и по данным таймера определяли время образования сгустка. Точно также определяли ТВ в контрольной нормальной плазме.

2.6.2. Определение тромбодинамики

Тромбодинамика определялась на плазме крови больных с ИБС в присутствии терпеноидов (n=5 для каждого из соединений) и без них (n=5).

Тромбодинамика плазмы оценивалась 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)).

После приготовления плазмы, pH в ней стабилизировали на уровне 7,2-7,4 путем инкубации с 10% молочной кислотой (14 мкл на 1 мл плазмы) в течение 1 часа при 37⁰С в условиях контакта с атмосферным воздухом. За 10-20 минут до начала опыта в плазму добавляли ингибитор трипсина из кукурузы (200 мкг/мл). Непосредственно перед началом теста плазма рекальцифицировалась добавлением 12 мкл раствора хлорида кальция (1 ммоль/л) на 0,6 мл плазмы. Далее плазма помещалась в вертикально расположенную кювету с прозрачной стенкой, находящуюся в водяном термостате. Сверху кювета закрывалась вставкой, несущей на передней грани активатор – иммобилизованный тканевой фактор. От активатора вглубь плазмы происходил рост фибринового сгустка, который регистрировался видеокамерой по светорассеянию. Обработка результатов происходила при помощи специализированного программного обеспечения, позволяющего получить профили светорассеяния в разные моменты времени, анализ которых давал основные численные параметры тромбообразования, такие как время начала свертывания у активатора – задержка роста сгустка (T_{lag}), пространственная скорость роста сгустка (V), начальная скорость (V_i), стационарная скорость (V_{st}), размер сгустка через 30 минут (CS), плотность (D) и появление спонтанных сгустков (T_{sp}).

2.6.3. Определение коагуляционных свойств модельных мицелл

Растворы мицелл DPC и SDS были приготовлены в соответствии с рекомендациями Caillon и соавт. путем растворения их в соответствующем буфере до конечной концентрации 40 мМ/л [153]. Коагуляционная активность была установлена в тесте АЧТВ на плазме крови здоровых доноров ($n=5$ для каждой из групп) с использованием 40 мМ раствора мицелл DPC или SDS вместо каолин-кефалиновой смеси. Результаты АЧТВ при добавлении мицелл DPC и сравнивали с таковыми у контрольной плазмы ($n=5$) и с плазмой при добавлении тиотерпеноидов ($n=5$).

2.7. Определение микровезикул

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

Тромбоконцентрат заготавливался методом автоматического цитофереза на аппарате «Haemonetics corporation MSC+», производство США, при выполнении протокола LDP – сбора тромбоцитов, обедненных лейкоцитами (не более 1×10^6 в дозе), в установленном оператором количестве (2×10^{11} в дозе). Данные параметры сбора установлены по умолчанию и основаны на характеристиках среднестатистического донора и стандартных требованиях к процедуре сбора тромбоцитов. Для цитофереза использовались одноразовые системы (магистраль, колокол и гемаконы) для сбора тромбоцитов, производства «Haemonetics corporation MSC+», США.

Процедура заготовки включала в себя: допуск и подготовку донора, проведение венепункции при помощи подготовленной системы, отбор проб для анализов из закрытой системы в пластиковые мешки-сателлиты («Haemonetics corporation MSC+», США) или пробирки типа «BD Вакутейнер» (Becton Dickinson, США).

При проведении тромбоцитофереза используется принцип прерывистого потока через камеру сепарации (колоколом). Стабилизированная цитратом кровь через замкнутую систему стерильных магистралей поступает во вращающийся стерильный одноразовый колокол, где наиболее тяжелая фракция – эритроциты – отбрасываются к стенке, а самая легкая фракция – плазма – начинает выходить через специальный порт, после чего её можно собирать в специализированные мешки. В конце цикла на выходе из колокола вместе с плазмой появляются клетки крови – тромбоциты, что определяется оптическим датчиком, и тогда выходной поток направляется в мешок для сбора тромбоцитов – воздухопроницаемый контейнер для его сбора, транспортировки и хранения.

После окончания процедуры, мешки с тромбоконцентратом маркировались путем фиксации термонаклейки в соответствии с ГОСТом 52938-2008 и передавались для хранения.

Хранение тромбоконцентрата осуществлялось в мешках из специального пластика для сбора тромбоцитов (производитель «Haemonetics corporation MSC+», США) в течение 3 суток при $t +22-24^{\circ}\text{C}$ при постоянном помешивании в тромбомиксере («Presvak», Аргентина). Использовался антикоагулянт – цитрат декстроза (состав А), соотношение антикоагулянта к тромбоконцентрату составляло 1:9. Состав антикоагулянта: кислоты лимонной моногидрат – 8 гр.; натрия цитрат – 22 гр.; глюкозы моногидрат – 24,5 гр.; воды – до 1000 мл.

Количество тромбоцитарных микровезикул устанавливали с помощью проточного цитометра FACSCalibur («BectonDickinson», USA). Регистрация прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания в логарифмическом режиме позволяет дискриминировать микровезикулы в отдельной зоне. Абсолютное количество микровезикул в 1 мкл определяли по светорассеиванию за фиксированное время (60 секунд) с использованием программы CellQuest.

2.8. Атомно-силовая микроскопия

С помощью 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 наносились на предметное стекло и инкубировались во влажной среде при 20°C в течении 10 минут, в течение которых наблюдалась спонтанная адгезия тромбоцитов к стеклянной подложке. Фиксация клеток проводилась с помощью метилового спирта в течение 10 минут. Далее образец тщательно отмывали с помощью фосфатного буфера и высушивали при 20°C .

2.9. 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 [136]. 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. Расшифровка полученных данных производилась при помощи программы VMD. Использовался файл с координатами мицеллы, состоящей из 60 молекул SDS – стабилизированная модель мицеллы, предложенная группой A. MacKerell [156]. Файл с первоначальными координатами для исследуемых соединений был создан при помощи сервера Automated force field Topology Builder (ATB) [57]. Файлы топологии, описывающие строение молекул SDS и тиотерпеноида, были также созданы с помощью сервера ATB. Размер расчетной кубической ячейки составлял $6.5 \times 6.5 \times 6.5$ нм. Ячейка вмещала 60 молекул SDS в 1 мицелле / ~ 8 тысяч молекул воды (SPC типа [141]) / 60 ионов Na^+ / 1 молекула тиотерпеноида. Молекулы соединения располагались на расстоянии ~ 7 Å от поверхности мицеллы. В опытах использовался Термостат Берендсона – V-rescale, привязанный к температуре 300 К [201]. Для достижения давления использовался баростат Берендсона с давлением в 1 бар. Интегрирование производилось с помощью стандартного интегратора leap-frog, а временной шаг интегрирования был равен 2 нс (меньше характерного периода колебания связей соседних атомов в молекулах). Расстояние отсечки для ближнепольных ван-дер-ваальсовых сил равнялось 1,2 нм. Расчёт электростатических взаимодействий проводился методом быстрого суммирования по решётке PME [54]. Исследуемая система моделировалась на протяжении 20 нс.

2.10. ЯМР-спектроскопия в твердой и жидкой фазах

Исследования ЯМР высокого разрешения проводились в жидкой и твердой фазах на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III HD-700 с зондом 5 мм, используя стандартные 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 диффузионно-упорядоченной спектроскопии (2D DOSY) [148, 167], гомоядерной корреляционной спектроскопии (2D COSY) и ядерной спектроскопии с эффектом Оверхаузера (2D NOYSY) [244].

Для твердотельных ЯМР-измерений использовали раствор фосфолипидов 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC) и 1-пальмитоил(d_{31})-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 [64, 159].

Методики ЯМР-экспериментов подробно описаны в наших работах [103, 215, 218].

2.11. Молекулярный докинг

С целью выяснения возможного непосредственного взаимодействия тиотерпеноидов с рецепторами тромбоцитов, определяющими их агрегацию, был проведен молекулярный докинг рецептора P2Y_{12} с терпеноидами в программном

обеспечении Autodock 4.2 [65]. Результаты были сопоставлены с проведенным нами докингом активных метаболитов (АМ) популярных антиагрегантов – клопидогрела и тикагрелора с рецептором P2Y₁₂.

Структуры исследуемых соединений и АМ тикагрелора и клопидогрела были полностью оптимизированы с помощью CAMB3LYP / def2-TZVP [66, 246] в PC GAMESS v.12 [202]. С целью изучения возможности локализации лигандов внутри молекулы белка был выбран блок сетки 90 Å x 126 Å x 120 Å с шагом 0,7 Å в программе AutoDock. Для каждого расчета было выполнено 50 отдельных прогонов с использованием генетического алгоритма Ламарка. Комплексы лиганд-рецептор отсортированы по среднеквадратичному отклонению. Для каждого комплекса конформация с наименьшей энергией связывания была выбрана как наиболее стабильная. Молекулярные графики были построены с помощью UCSF Chimera [259].

Энергетические параметры сайтов связывания с рецептором определены для всех соединений. Для уточнения сайтов связывания и энергетических параметров специфическая стыковка была выполнена в программе GOLD v. 2021. Были изучены все атомы в радиусе 20 Å от лиганда. Для всех лигандов было выполнено 50 отдельных прогонов, как и в случае слепой стыковки. Для получения наиболее точных результатов в настройках GA была выбрана максимальная эффективность поиска 200% [102].

ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты исследования цитотоксичности

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 (рисунок 13, 14).

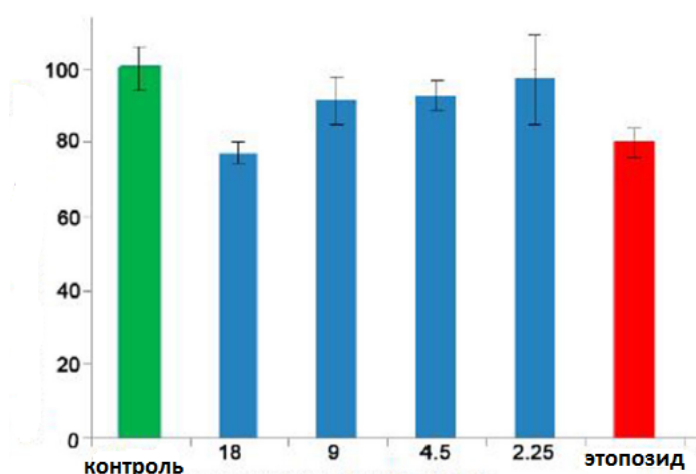


Рисунок 13 – Результаты МТТ-теста цитотоксичности соединения **5** в диапазоне концентрации от 18 до 2,25 мМ/л. По вертикали 0-120 – количество живых фибробластов, %. Контроль – физиологический раствор, содержащий 1,5% этиловый спирт. Этопозид – цитостатический препарат сравнения. Концентрация соединения в мМ/л

Наименьшая цитотоксичность была обнаружена для 2,25 мМ/л концентрации пинанового сульфоксида **5**. Цитотоксичность при максимальной концентрации в 18 мМ/л была сопоставима с этопозидом – цитостатиком сравнения. Минимальная концентрация вещества (2,25 мМ/л), сохраняющая биологические эффекты, почти не отличалась от контроля – физиологического раствора с 1,5%-содержанием этилового спирта, используемого для растворения соединения (рисунок 13).

Исследование наиболее водорастворимого борнанового соединения **3** также показало низкую цитотоксичность при концентрации менее 2 мМ /л (рисунок 14).

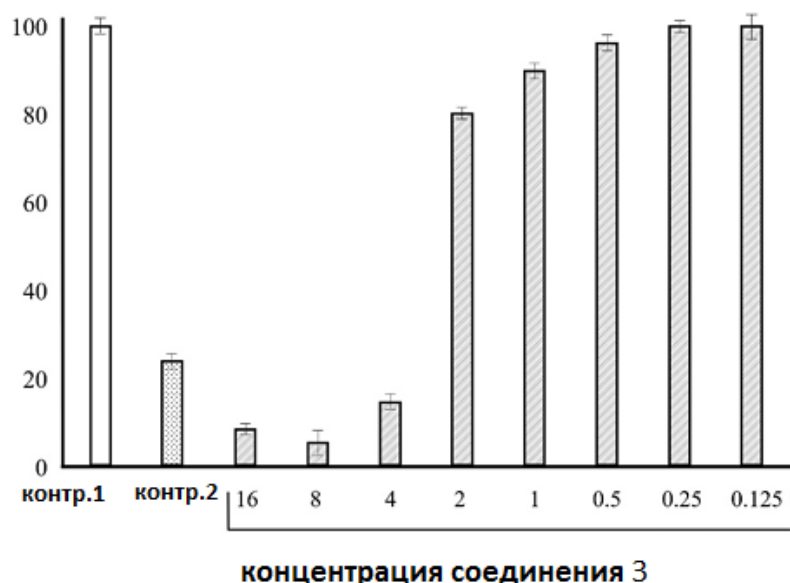


Рисунок 14 – Цитотоксичность соединения **3** на фибробластах ВJ человека (АТСС, США). Соединение **3** использовали в диапазоне концентраций (16–0,125 мМ/л). По вертикали – количество живых фибробластов, %. Контр. 1 – физиологический раствор, содержащий водный раствор этанола с конечной концентрацией 1,5% (отрицательный контроль). Цитотоксический препарат этопозид (Calbiochem, США) в концентрации 40 мкМ/л в качестве положительного контроля (контр. 2)

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

Выявленная низкая цитотоксичность соединений открывает перспективы для возможности использования их в клинической практике.

3.2. Влияние терпеноидов на агрегационную способность тромбоцитов

Изменение скорости агрегации тромбоцитов индуцируется различными физиологическими и патологическими агентами, вызывающими активацию специфических тромбоцитарных рецепторов. Биологические эксперименты

подтверждают не только мембраностабилизирующие свойства, но и рецепторную активность серосодержащих соединений.

Считается, что наиболее клинически значимыми для агрегации тромбоцитов являются пуринорецепторы, которые активируются АДФ, коллагеном, тромбином, ТХА₂, серотонином и адреналином (эпинефрином) [242] и I β -рецепторы, обуславливающие агрегацию тромбоцитов при участии фактора фон Виллебранда при воздействии антибиотика ристомицина [164]. Все исследуемые вещества снижали рецепторную активацию тромбоцитов: приводили к практически полному блокированию агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином и арахидоновой кислотой (более выражено для камфенового сульфона **4** и пинанового сульфоксида **5**), а также снижали влияние АДФ, коллагена и ристомицина (рисунок 15, таблица 1, 2).

Антиагрегационные эффекты были более выраженными, чем у клопидогрела и аспирина. 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.

Кроме того, все тиотерпеноиды практически полностью подавляли агрегацию тромбоцитов, вызываемую и арахидоновой кислотой. Арахидоновая кислота, в отличие от других индукторов, активирует тромбоциты без вовлечения рецепторов тромбоцитов путем проникновения через плазматическую мембрану [40]. Подавление этого воздействия тиотерпеноидами, вероятно, обусловлено их способностью стабилизировать мембраны за счет *ван-дер-ваальсовых* взаимодействий с фосфолипидами клеточных мембран [86].

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.

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	Клопидогрел 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*
Адрен алин	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

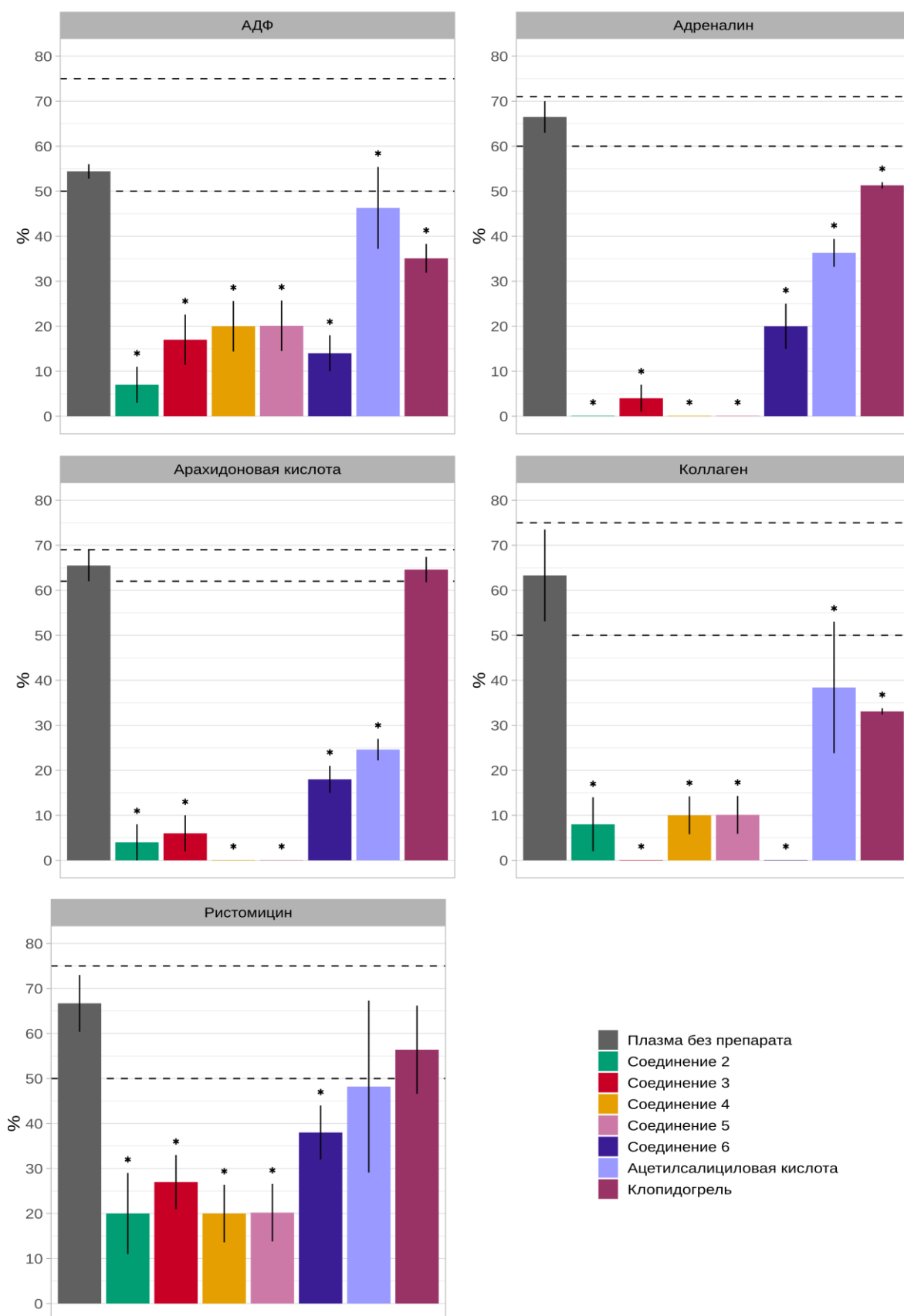


Рисунок 15 – Влияние терпеноидов на индуцированную агрегацию тромбоцитов (n=5 каждой из групп), * $p < 0,05$ по отношению к показателям без препарата

Тесты индуцированной агрегации мы также провели 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). Введение гетероатома в структуру терпенов придает молекулам амбифильность, что позволяет веществам встраиваться в структуру мембраны гидрофобной частью и препятствует рецепторной активации тромбоцитов.

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	$66,5 \pm 2.4$	$34.2 \pm \pm 1.2^*$	$30.4 \pm 3.2^*$	$23.4 \pm 2.8^*$
Адреналин	53.8 ± 2.2	$8.4 \pm 3.8^*$	$10.2 \pm 2.6^*$	$2.6 \pm 1.8^*$
Арахидоновая кислота	61.6 ± 1.4	0^*	0^*	0^*
Коллаген	70.4 ± 4.2	$11.6 \pm 3.4^*$	$4.4 \pm 2.8^*$	0^*
Ристомицин	72.7 ± 3.2	$30.2 \pm 2.4^*$	$20.8 \pm 5.2^*$	$42.4 \pm 3.8^*$

3.3 Влияние терпеноидов на коагуляционную активность плазмы

У больных ИБС, как правило, наблюдаются нарушения в системе гемостаза: 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 это говорит о том, что у больных ИБС присутствует тромбогенный сдвиг показателей системы гемостаза в сторону гиперкоагуляции [176]. Подобные характерные изменения в системе гемостаза наблюдались у больных ИБС, включенных в наше исследование (рисунок 16, таблица 3).

Результаты исследования выявили значительную антиагрегационную активность как борнанных соединений **2**, **3**, так и камфенового сульфона **4** и пинанового сульфоксида **5**: спонтанная скорость агрегации достоверно уменьшалась до нормальных значений (рисунок 15, таблица 3). Все

серосодержащие соединения в равной степени существенно ингибировали также и коагуляционную способность плазмы: АЧТВ повышалось и достигало нормальных значений и увеличивалось ПВ. Однако не было выявлено влияния на активность тромбина (тромбиновое время не претерпевало изменений). Из данных экспериментов следует, что синтезированные вещества блокируют как активацию тромбоцитов, так и плазменных факторов свертывания. Изоборнеол **6**, не содержащий атома серы, в меньшей степени понижал скорость агрегации тромбоцитов, и при этом не оказывал существенного влияния на показатели коагуляционного гемостаза. Следовательно, введение дополнительных молекулярных серосодержащих групп в состав исходных молекул терпенов приводило к проявлению выраженных антиагрегационных и антикоагуляционных свойств у синтезированных тиотерпеноидов (рисунок 16, таблица 3).

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

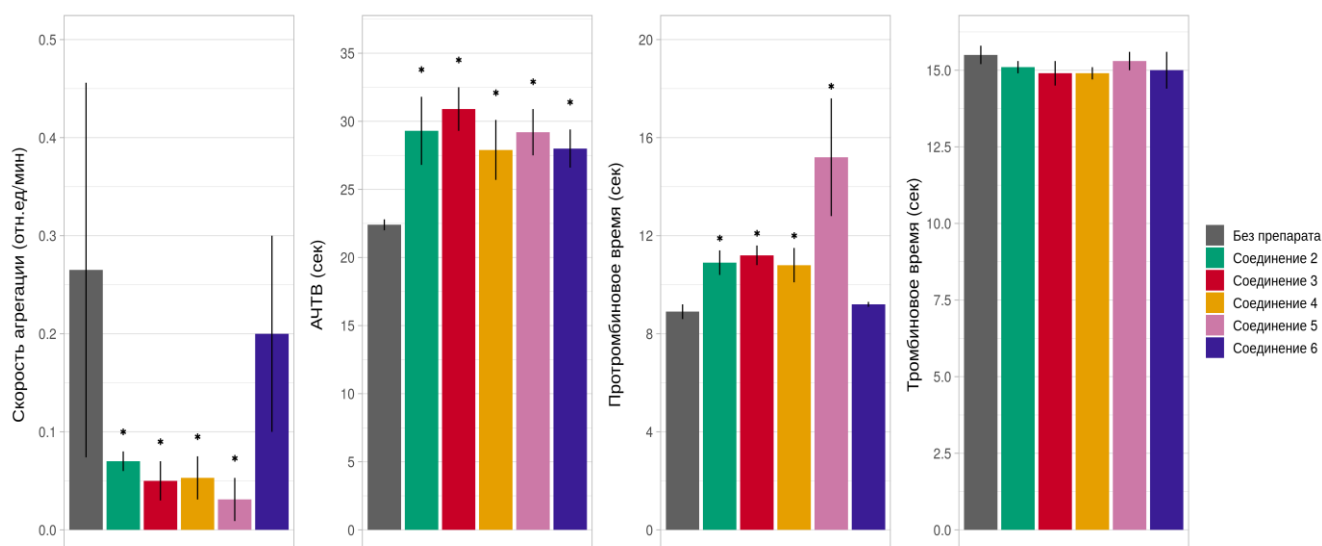


Рисунок 16 – Влияние тиотерпеноидов на агрегацию тромбоцитов и показатели коагуляционного гемостаза *in vitro* у пациентов с ИБС. $n=10$ для каждой из групп; * p – достоверность $<0,05$ по сравнению с показателями без препарата

3.4. Влияние тиотерпеноидов на процесс тромбодинамики

Метод тромбодинамики представляет собой моделированный процесс внешнего пути свертывания крови. Коагуляция – это пространственно неоднородный процесс, при котором каскад гемокоагуляции разворачивается на поверхности клеточной мембраны, а доставка факторов свертывания происходит благодаря диффузии. Часто оцениваемые показатели гемостаза – АЧТВ, ПВ и ТВ – имеют большее прикладное значение для выявления гипокоагуляции и недостаточно чувствительны, чтобы определить риск тромбоза. Тканевой фактор уникален среди факторов свертывания крови тем, что он экспрессируется на несосудистых клетках. Острое воспаление, включая сепсис, может вызвать гиперкоагуляцию. Воспаление может стимулировать экспрессию ТФ на эндотелиальных клетках и лейкоцитах. Тромбодинамика – это метод оценки состояния системы гемостаза путем прямой визуализации пространственного образования сгустка. В этом методе инициация коагуляции происходит путем введения поверхностно-иммобилизованного ТФ в плазму пациента. Далее происходит фиксация процесса образования и распространения сгустка

светорассеивающей камерой, делающей снимки каждые 15 секунд с расчетом параметров зависимости размера сгустка от времени [240].

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 , V_i , V_{st}), его размер (CS), плотность (D) и исчезали спонтанные сгустки фибрина, а время задержки роста не менялось (рисунок 17, таблица 4). Эти показатели практически не зависели от состава 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).

Таблица 4 – Изменения тромбодинамики при добавлении тиотерпеноидов. 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	$23,5 \pm 1,2^*$	$1,5 \pm 0,15$	$42,4 \pm 2,8^*$	$23,5 \pm 1,2^*$	$979 \pm 45,4^*$	$22505 \pm 344^*$
Соед. 3	$24,1 \pm 1,4^*$	$1,6 \pm 0,12$	$43,2 \pm 0,8^*$	$28,0 \pm 0,9$	$898 \pm 34,4^*$	$27878 \pm 478^*$
Соед.5	$31,7 \pm 2,1$	$1,2 \pm 0,12$	$50,9 \pm 0,8^*$	$31,7 \pm 2,1$	$1132 \pm 32,1^*$	$2577 \pm 228^*$
Норм.плазма	20,5-30	0,8-1,5	39,1-54,6	20,5-30	833-1173	14000-32000

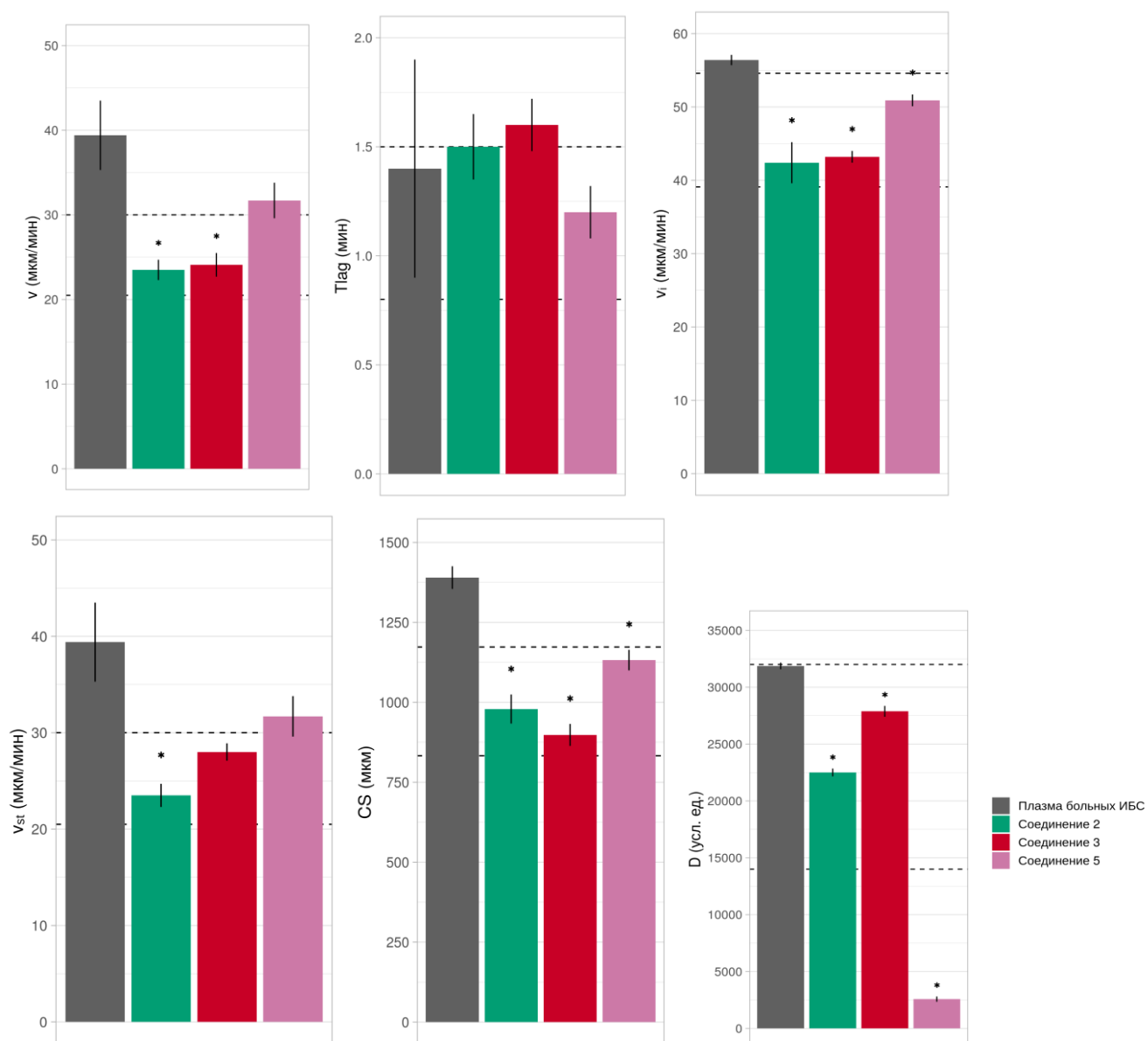


Рисунок 17 – Изменения тромбодинамики при добавлении тиотерпеноидов.

Примечание. Количество измерений n=5, *p – достоверность <0,05 по сравнению с плазмой больных ИБС

Подавление каталитической активности присутствующих в растворе микровезикул обуславливает антикоагуляционный эффект. Микровезикулы высвобождаются клетками в ответ на активацию или апоптоз. Среди разных микровезикул, присутствующих в крови здоровых людей, ТМВ являются самыми многочисленными и клинически наиболее значимыми. Они несут на своей поверхности комплекс молекул адгезии. Подобно тромбоцитам, ТМВ также вовлечены в процесс тромбообразования и принимают участие в каскаде

коагуляции. Уровни циркулирующих ТМВ возрастают при многих протромботических состояниях и заболеваниях – ревматоидном артрите, системной красной волчанке, злокачественных новообразованиях, сердечно-сосудистых заболеваниях, в том числе ИБС, и инфекциях, что указывает на их потенциальный вклад в патогенез и обоснованность их определения в качестве биомаркера [187]. В связи с этим мы провели эксперименты с плазмой крови больных с ИБС и плазмой крови здоровых доноров. На рисунке 18 А показано, что в плазме крови больных с ИБС есть выраженные процессы фибринообразования через 30 минут от начала видеорегистрации активации коагуляции. Удаление микровезикул из плазмы блокирует образование хлопьев фибрина, что подтверждает участие микровезикул в каскаде плазменного звена свертывания у пациентов с ИБС (рисунок 18 С). Добавление терпеноида 3 к плазме ведет к блокированию процессов образования фибрина, что объясняется снижением каталитической тромбогенной активности микровезикул у больных с ИБС (риунок 18 В).

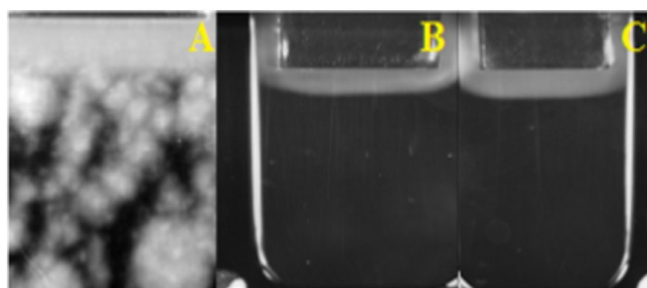


Рисунок 18 – А – плазма больных ИБС после 30 мин фоторегистрации активации коагуляционного гемостаза; В – плазма больных ИБС в присутствии соединения 3; С – плазма больных ИБС после удаления микровезикул

Аликвота из препарата тромбоконцентрата после удаления центрифугированием тромбоцитов содержит ТМВ, катализирующие образование хлопьев фибрина (рисунок 19 В). Однако в присутствии пинанового сульфоксида 5 данные процессы блокируются (рисунок 19 С). Данные изменения

свидетельствуют об инактивации каталитической активности микровезикул с помощью тиотерпеноидов.

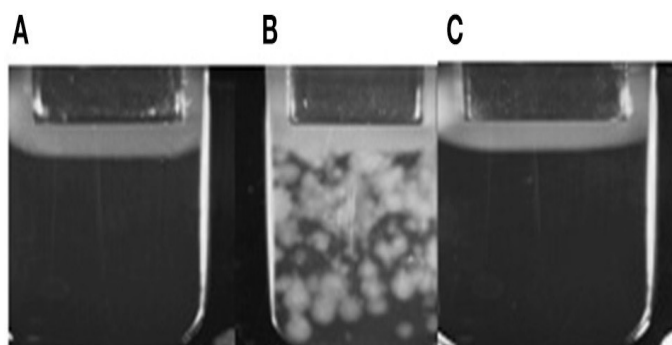


Рисунок 19 – А – аликвота плазмы из препарата тромбоконцентрата после удаления тромбоцитов и последующего удаления ТМВ; В – аликвота плазмы из препарата тромбоконцентрата после удаления тромбоцитов; С – аликвота из препарата тромбоконцентрата после удаления тромбоцитов с добавлением соединения 5

3.5. Динамика количества микровезикул при хранении тромбоконцентрата

В настоящее время при получении препаратов крови для предотвращения активации системы гемостаза в основном используют цитрат натрия или гепарин. Цитрат натрия связывает ионы Ca^{2+} , которые опосредует возможность активации тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а гепарин участвует в нейтрализации активности основного коагуляционного фермента – тромбина. Однако, по данным разных авторов, по результатам проточной цитометрии стабилизирующий эффект этих веществ бывает неполным – тромбоцитарные микровезикулы появляются в препаратах крови как при использовании цитрата, так и гепарина [18]. При введении в образец крови цитрата натрия связывается только внеклеточный кальций и не затрагивается внутриклеточный. Следовательно, увеличение концентрации внутриклеточного свободного кальция может быть достаточным для активации тромбоцитов, и поэтому цитрат натрия

только снижает эффективность этого процесса. Вместе с этим, объясняется неэффективность подавления активности сильного индуктора тромбообразования – тромбина, так как он не является единственным индуктором для этого процесса.

На примере борнановой соли **3** исследована способность тиотерпеноидов ингибировать активацию тромбоцитов, что подтверждается результатами определения тромбоцитарных микровезикул в тромбоконcentратах.

Из представленных данных следует, 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. При добавлении в препараты тромбоцитов тиотерпеноида количество микровезикул сокращалось в 3 раза на протяжении всего периода наблюдений, а снижение количества тромбоцитов было менее значительным по сравнению с контролем – плазмой без препарата с растворителем, используемым для получения раствора исследуемых соединений (таблица 5).

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*

Уменьшение количества микровезикул в препаратах тромбоцитов в присутствии тиотерпеноида обусловлено способностью данного класса соединений, как следует из предыдущих экспериментов, блокировать активацию тромбоцитов. Подавление тромбогенных свойств микровезикул, очевидно,

связано с понижением активности протромбиназы за счет модификации взаимодействия факторов этого комплекса с фосфолипидной поверхностью микровезикул.

3.6. Атомно-силовая микроскопия поверхности тромбоцитов

Наглядная визуализация процессов активации тромбоцитов возможна с помощью АСМ. В нормальных условиях тромбоциты находятся в сосудистом русле в состоянии покоя, но способны к быстрой активации при воздействии индукторов. Активация тромбоцитов запускается молекулам внеклеточного матрикса или растворимыми агонистами тромбоцитов, которые индуцируют внутриклеточную передачу сигналов через их соответствующие рецепторы – интегрины.

Изменение морфофункциональной структуры тромбоцитов подтверждается данными атомно-силовой микроскопии. Добавление тиотерпеноида в тромбоконцентрат приводило к стабилизации мембран тромбоцитов (рисунок 20).

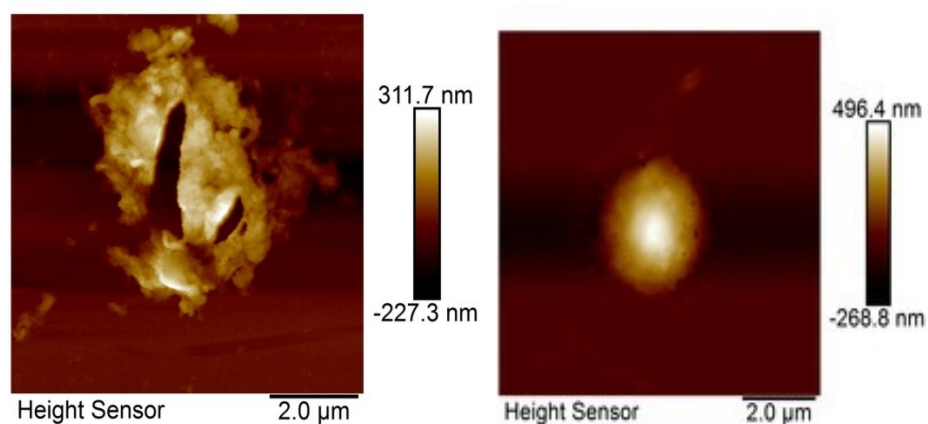


Рисунок 20 – Поверхность активированного тромбоцита, контроль (слева). Поверхность тромбоцита в присутствии камфенового соединения **4** после добавления индуктора (справа)

Поверхность активированного тромбоцита имеет множественные выросты – филоподии. Поверхность тромбоцита при добавлении тиотерпеноида **4** не имеет

филоподий, форма тромбоцита дисковидная, что подтверждает блокирование активации тромбоцитов путем стабилизации мембраны.

3.7. Коагуляционная активность модельных мицелл

Сами мицеллы DPC обладают каталитической коагуляционной активностью. Ранее нами было выявлено, что добавление тиотерпеноидов к раствору DPC приводит к удлинению АЧТВ [215]. Мы провели эксперименты с мицеллами SDS, чтобы обосновать использование мицелл SDS в качестве модельных при изучении 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). Эти результаты подтверждают утверждение о высокой коагулянтной активности отрицательно заряженной поверхности мембраны, на которой катализируется образование комплексов факторов свертывания. Активность этой поверхности обусловлена ее способностью связывать витамин К-зависимые факторы свертывания за счет Ca^{2+} -зависимого взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран [108] или, как в нашем случае, с отрицательно заряженной поверхностью мицелл SDS и DPC. Мембраны, состоящие из нейтральных фосфолипидов, также обладают прокоагулянтной активностью, однако значительно меньшей степени [108]. Это было показано на примере DPC-мицелл. Считается, что связывание витамин К-зависимых факторов свертывания крови с поверхностью клеточных мембран может быть дополнительно обеспечено их гидрофобным взаимодействием с ацильными цепями фосфолипидов [130, 205]. Доступность этих цепочек для взаимодействия с витамин К-зависимыми факторами показано в работе [108]. Блокирование коагуляционной способности мицелл в присутствии

терпеноидов объясняется их гидрофобным взаимодействием с модельными мембранами.

3.8. Результаты молекулярного моделирования с мембранами

С целью получения наглядной картины взаимодействия тиотерпеноидов с фосфолипидами клеточных мембран и выяснения молекулярного механизма этого связывания нами было проведено молекулярное динамическое моделирование пинанового сульфоксида **5** с мицеллами SDS. Осуществить подобное моделирование нам позволило наличие данных рентгеноструктурного анализа соединения **5**, исследованного нами ранее [218]. Выявлено, что тиотерпеноид погружается гидрофобной частью молекулы внутрь мицеллы SDS, а его гидрофильная часть (меркаптоэтанольный фрагмент) расположена на наружной поверхности мицеллы (рисунок 21).

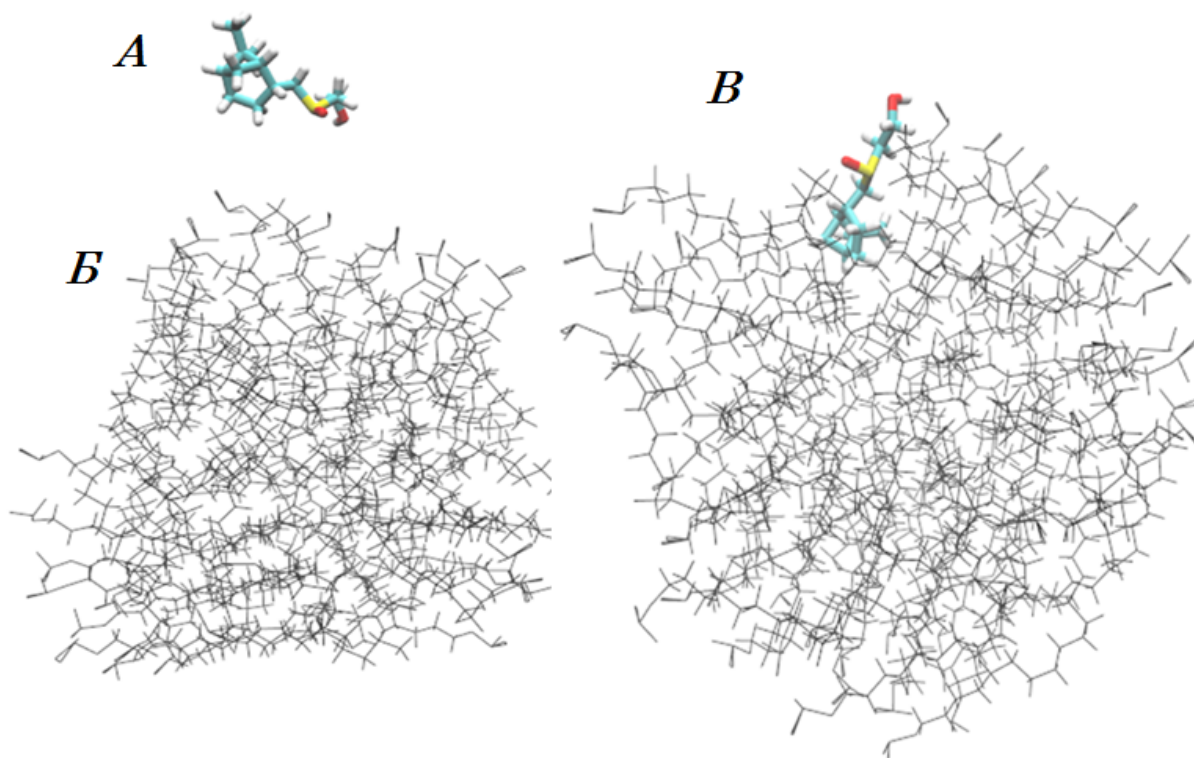


Рисунок 21 – Результаты взаимодействия соединения **5** и SDS-мицеллы. А – молекула соединения **5**; Б – мицелла из SDS-молекул; В – связывание молекулы соединения **5** на поверхности мицеллы после 20 нс моделирования

3.9. Результаты ЯМР-спектроскопии

Для установления характера возможного взаимодействия между тиотерпеноидами и клеточными мембранами мы использовали ЯМР-спектроскопию. 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 уширению сигналов в спектрах. По этой причине в качестве модельных клеточных мембран были использованы мицеллы SDS, DPC и фосфохолина (POPC), которые ранее широко применялись в аналогичных ЯМР-исследованиях. Взаимодействие молекул с фосфолипидными мембранами могут быть эффективно изучены с помощью эффекта Оверхаузера (NOE) [230]. У этого метода есть некоторые ограничения при проведении эксперимента в жидкой фазе из-за очень короткого времени спин-спиновой релаксации ^1H , приводящее к значительному уширению сигналов ЯМР. Эта проблема может быть решена с помощью модельных систем, таких как мицеллы DPC. DPC имеет такую же цвиттер-ионную структуру головки, как фосфатидилхолин, и может использоваться как простая модель мембран эукариот. В то же время мицеллы DPC значительно меньше, чем бислои фосфолипидов и, следовательно, больше подходит для ЯМР-спектроскопии в растворе, как это показано в работах [62, 142, 158, 177].

3.9.1. ЯМР-спектроскопия в жидкой фазе

С целью изучения взаимодействия исследуемых соединений с фосфолипидными мембранами нами были проведены ЯМР эксперименты как в присутствии, так и в отсутствие мицелл DPC. ^1H ЯМР-спектры соединений значительно изменялись после добавления мицелл.

Борнанный сульфид **2** был исследован в растворе CDCl_3 (рисунок 22, а). Сигналы протонов были изучены с использованием корреляций в $^1\text{H}\backslash^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}\backslash^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}\backslash^{13}\text{C}$

НМВС в ЯМР спектрах после точного подтверждения химической структуры сульфида **2** при помощи одномерных спектров ^1H и ^{13}C . Данное соединение оказалось растворимо в D_2O в присутствии мицелл DPC. Спектр протонного ЯМР соединения **2** в растворе CDCl_3 существенно отличался от спектра в растворе DPC / D_2O (рисунок 22, b).

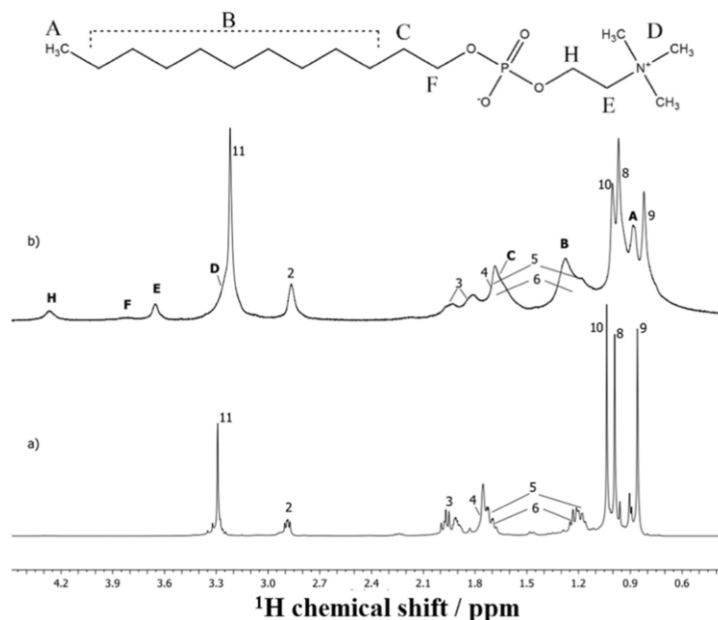


Рисунок 22 – Протонные ЯМР спектры соединения **2** в растворах CDCl_3 (a) и DPC / D_2O (b) при температуре 30 ° C. Цифры обозначают протоны соединения **2**, буквы A-H относятся к протонам DPC. Структура молекулы относительно протонных групп показана вверху спектров

Все сигналы были уширены и смещены в более высокие поля. Такие изменения в спектре ЯМР, очевидно, вызваны взаимодействием сульфида **2** с мицеллами DPC и возможным образованием комплекса между ними. Чтобы изучить взаимодействие соединения **2** с мицеллами DPC и структурные детали межмолекулярного комплекса, был проведен эксперимент 2D NOESY ЯМР (рисунок 23).

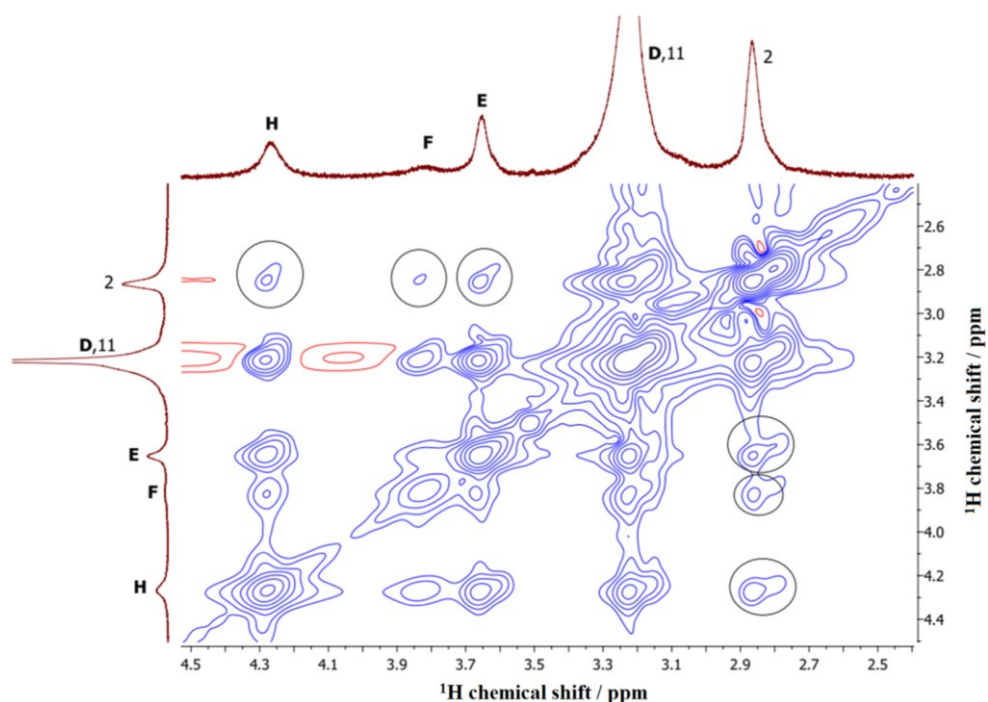


Рисунок 23 – Алифатическая область спектра ЯМР 2D NOESY соединения **2** в растворе DPC при температуре 30° С. Цифры соответствуют атомным группам в соединении **2**, буквы D-H относятся к углеводородным группам DPC.

Межмолекулярные кросс-пики выделены серыми кружками

К сожалению, большинство возможных межмолекулярных поперечных пиков перекрывались пиками, возникающими по причине внутримолекулярных NOE. Тем не менее, четко различимы поперечные пики между протоном H-2 сульфида **2** и протонами H, F и E мицеллы DPC. Таким образом, был сделан вывод, что соединение **2** образует молекулярный комплекс с мицеллами DPC и тиотерпеноид погружен относительно глубоко в гидрофобную часть мембраны. Расположение и ориентация тиорадикала – SCH_2COOH – не могли быть определены по данным ЯМР из-за того факта, что единственный ЯМР сигнал ^1H CH_2 -11 этого фрагмента был перекрыт с сигналом D DPC.

Сопоставление спектра ЯМР ^1H камфенового сульфона **4** (рисунок 24) и мицелл SDS проведено с помощью экспериментов 2D COSY, TOCSY и на основе анализа кратностей сигналов, интегральных значений и характерных химических сдвигов. Протоны CH_3 -8 и CH_3 -9 наблюдаются в виде синглетов при 0,69 и 0,87 м. д. Протоны CH_2 -5, CH_2 -6 и CH_2 -7 представлены в спектре в виде трех

квадруплетов АВ из-за неэквивалентности геминальных протонов. Протон при ОН-группе не отражался в спектре. Протоны $\text{CH}_2\text{-10}$ и $\text{CH}_2\text{-11}$ представлены в виде перекрывающихся мультиплетов с центрами 3,20 и 3,29 м. д. (миллионных долей) соответственно. Геминальные протоны $\text{CH}_2\text{-12}$ эквивалентны в спектре ЯМР и резонировали как триплеты при 3,92 м. д. Протоны CH-1 и CH-4 наблюдались как два расширенных сигнала, группа CH-2 дала сигнал как мультиплет при 1,87 м. д.

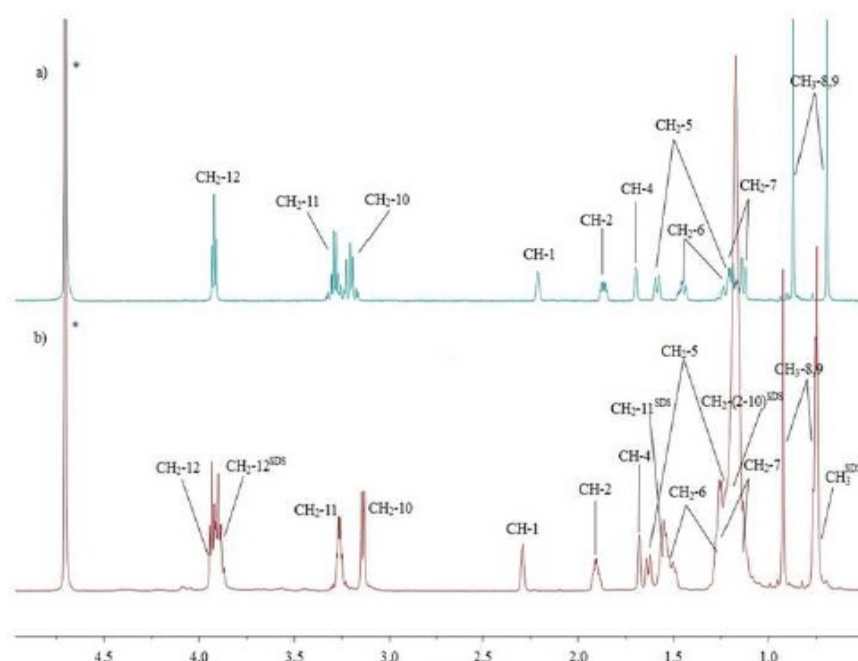


Рисунок 24 – Спектры ЯМР ^1H соединения **4** в растворах D_2O (а) и $\text{D}_2\text{O} + \text{SDS}$ (b) при 293 К. Сигнал растворителя отмечен звездочкой

Спектр ЯМР ^1H соединения **4** существенно изменялся в присутствии мицелл SDS (b на рисунке 24). Сигналы уширились, а некоторые из них сместились по сравнению со спектром в растворе D_2O . Существенные различия наблюдаются для фрагментов $\text{CH}_2\text{-10}$ и $\text{CH}_2\text{-11}$. Сигнал $\text{CH}_2\text{-10}$ представлен дублетом, сигнал $\text{CH}_2\text{-11}$ довольно широкий, его константа спин-спинового взаимодействия изменилась. Сигналы CH-1 и CH-2 сместились в слабое поле. Остальные сигналы практически не изменились. Эти различия между ^1H ЯМР спектром соединения **4** с мицеллами SDS и без них могут быть объяснены дополнительным взаимодействием вещества с модельной мембраной. Значительные изменения

сигналов CH₂-10 и CH₂-11 позволили нам выдвинуть гипотезу о том, что серосодержащий фрагмент также взаимодействует с SDS, но уже с ее гидрофильной частью. Чтобы доказать, что камфеновый сульфон **4** образует межмолекулярный комплекс с мицеллой SDS, были проведены эксперименты DOSY. Коэффициент самодиффузии в D₂O составлял $(5,6 \pm 0,1) \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$ (получено из 2D DOSY-спектра). Однако данные сильно отличались в растворе D₂O + SDS и совпадали со значением коэффициента самодиффузии для мицеллы SDS: $(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$. Это означает, что тиотерпеноид **4** связывается с модельной мембраной в растворе D₂O.

Для изучения молекулярного механизма комплексообразования был проведен эксперимент 2D NOESY (рисунок 25).

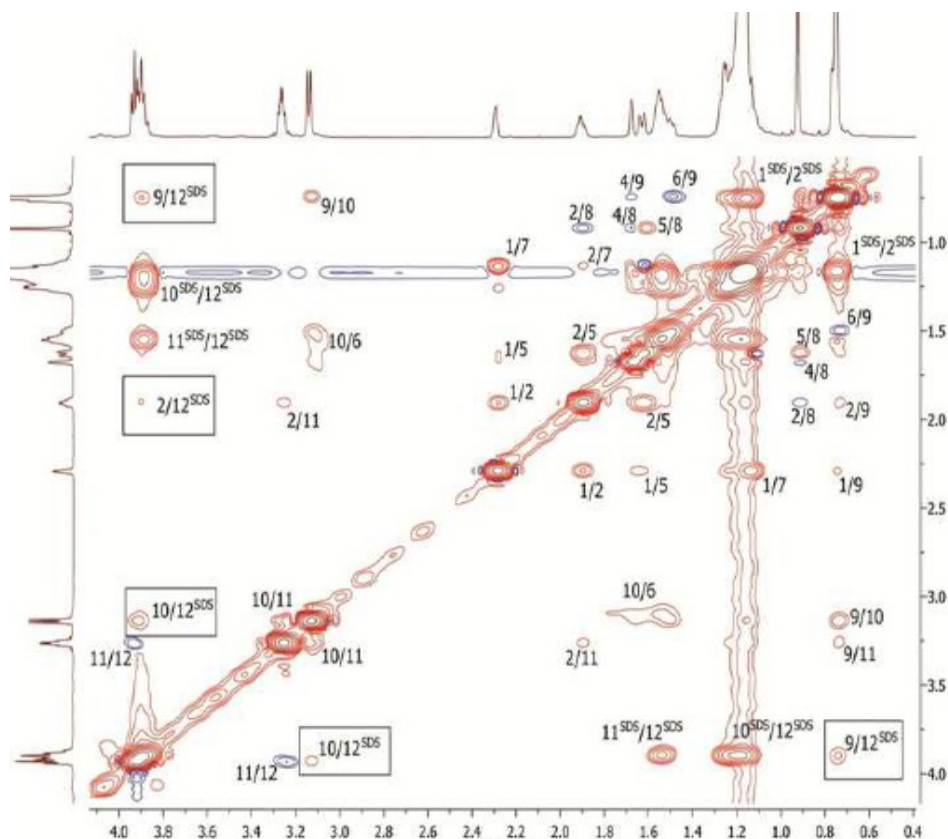


Рисунок 25 – 2D NOESY ЯМР-спектр соединения **4** в растворе D₂O + SDS при 293K. Межмолекулярные NOE показаны столбиками. Нумерация протонов терпеноида **4** и SDS соответствует рисунку 24. Время перемешивания 0,3 с

Были выявлены несколько сайтов межмолекулярного взаимодействия. Перекрестные пики между протонами $\text{CH}_2\text{-12}$ SDS (^{12}SDS) и $\text{CH}_2\text{-2}$, $\text{CH}_2\text{-10}$, $\text{CH}_2\text{-12}$ соединения указывают на то, что сульфона **4** взаимодействует с поверхностью мицеллы.

Вероятно, один или оба кислорода S=O связываются с полярными группами в головке SDS, следовательно, наблюдается эффект Оверхаузера с соседними протонами $\text{CH}_2\text{-2}$, $\text{CH}_2\text{-10}$ и $\text{CH}_2\text{-12}$.

ЯМР исследования пинанового сульфоксида **5** также были выполнены с помощью 2D $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HSQC и $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMBC ЯМР экспериментов (рисунок 26-27). Протоны $\text{CH}_3\text{-8}$ и $\text{CH}_3\text{-9}$ дают два синглета с химическими сдвигами 1,07 и 0,88. Протоны $\text{CH}_2\text{-12}$ резонируют в спектре как АВ-квадруплет при 3.87 м. д. Было установлено, что геминальные протоны H^6 и $\text{H}^{6'}$, относящиеся к $\text{CH}_2\text{-6}$, сильно различаются. Они образовывали в спектре ЯМР ^1H два мультиплета с химическими сдвигами 2,27 и 0,89 м. д. Аналогичная картина наблюдалась для геминальных протонов H^3 и $\text{H}^{3'}$, связанных с $\text{CH}_2\text{-3}$ (1,99 и 1,54 м. д.). Сигналы протонов $\text{CH}_2\text{-4}$ перекрываются резонансными сигналами $\text{CH}\text{-1}$ и $\text{CH}\text{-5}$, но по 2D-спектрам было установлено, что сигналы этой метиленовой группы имеют химические сдвиги 1,86 и 1,76 м. д. Геминальные протоны $\text{CH}_2\text{-10}$ и $\text{CH}_2\text{-11}$ также различались. Соответствующие мультиплеты перекрывались и имели резонансы в спектре ЯМР ^1H в районе 2,8-3,0 м. д. Химические сдвиги $\text{CH}\text{-1}$ и $\text{CH}\text{-5}$ были определены согласно экспериментам 2D ЯМР. Они наблюдались в спектре как перекрывающиеся мультиплеты при 1.81 м. д. Все связанные с протонами углеродные сигналы были отнесены к спектру $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HSQC (рисунок 27). Наконец, химический сдвиг сигнала C-7 был определен на основании результатов $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$.

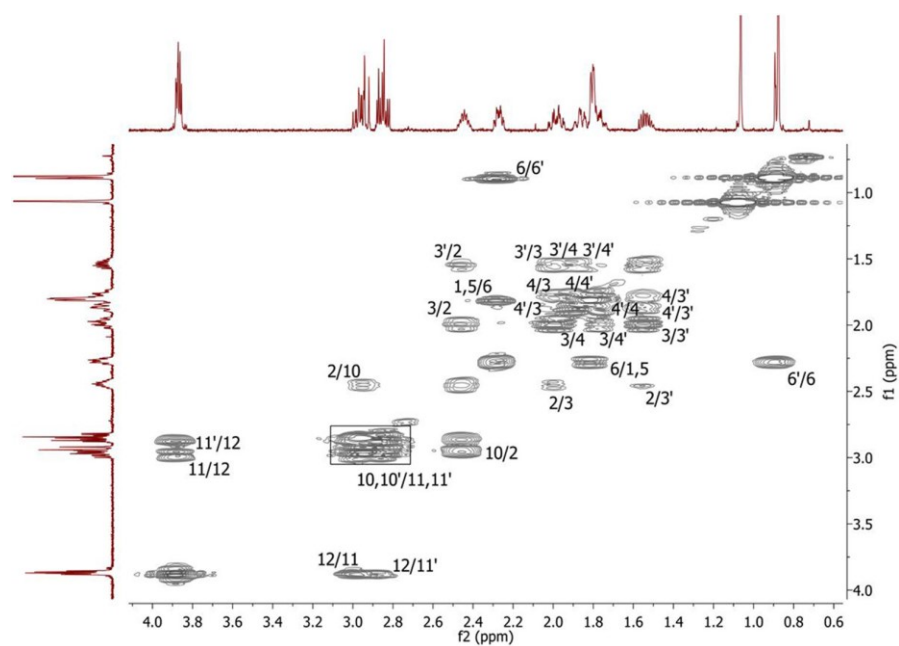


Рисунок 26 – 2D ^1H - ^1H COSY спектр соединения **5** в D_2O , $T = 293\text{ K}$

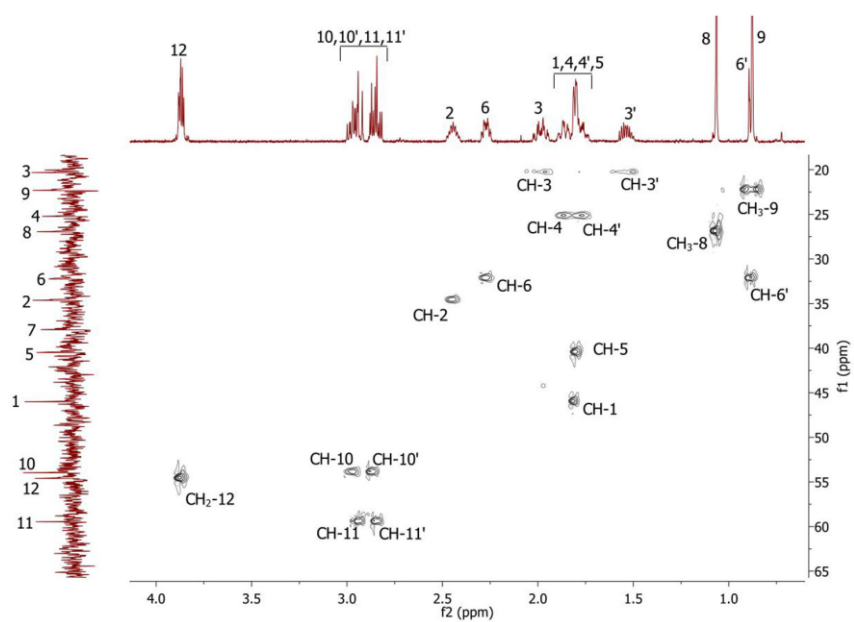


Рисунок 27 – 2D ^1H - ^{13}C HSQC спектр соединения **5** в D_2O , $T = 293\text{ K}$

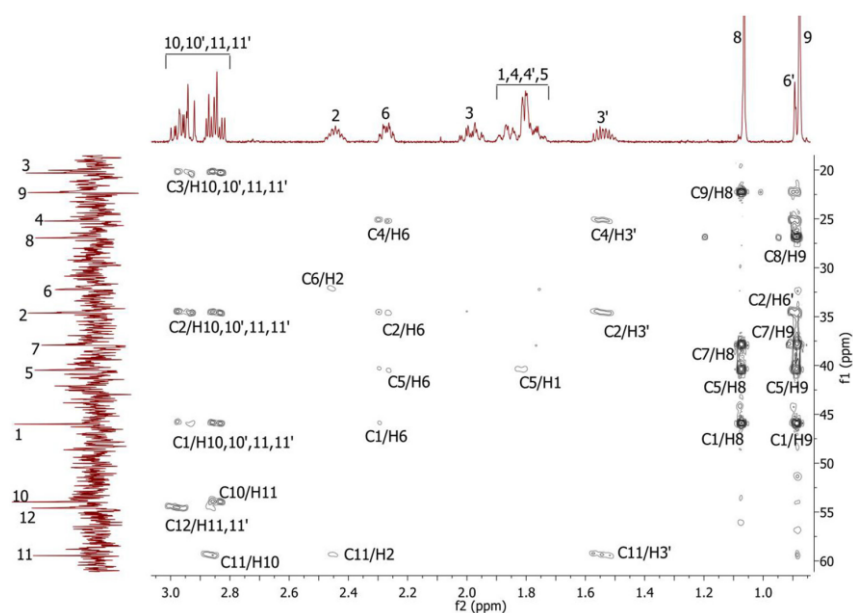


Рисунок 28 – 2D ^1H - ^{13}C NMR спектр соединения **5** в D_2O , $T = 293\text{ K}$

Спектр ЯМР ^1H сульфида **8** значительно изменился после добавления мицелл DPC (рисунок 29).

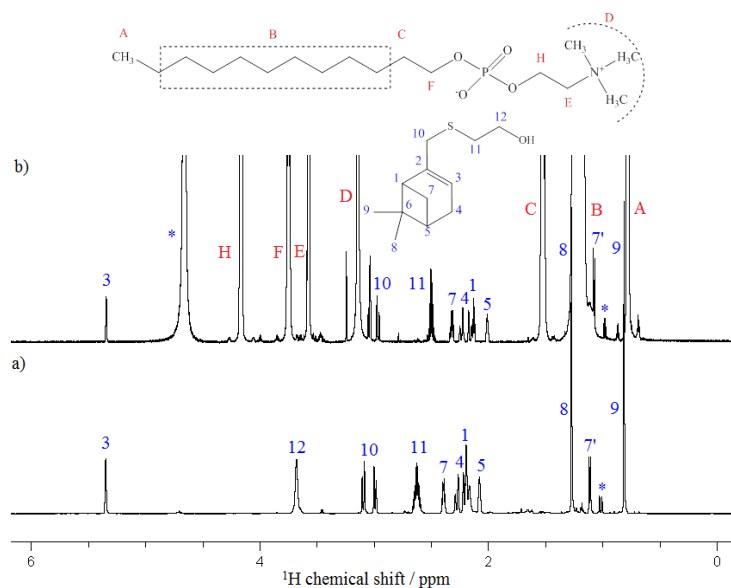


Рисунок 29 – Спектры ЯМР ^1H соединения **8** в растворах CDCl_3 (a) и $\text{D}_2\text{O} + \text{DPC}$ (b) при 300 K. Цифры обозначают протоны соединения **8**, буквы A-H соответствуют протонам DPC. Химические структуры молекулы DPC и соединения **8** показаны в верхней части рисунка. Сигналы растворителя отмечены звездочками

Сигналы протонов CH_2 -10 и CH_2 -11 стали более узкими. К сожалению, изменения формы сигналов CH_3 -8, 9 и CH_2 -12 не могли быть проанализированы из-за наложения на сигналы DPC. Однако переход в слабое поле сигналов H-1, H-4, H-5, H-7 позволил проанализировать эти сигналы. Эти различия в спектрах ЯМР ^1H сульфида **8** в чистом растворителе CDCl_3 и в системе мицелл $\text{D}_2\text{O}+\text{DPC}$, очевидно, обусловлены взаимодействием исследуемого монотерпеноида с модельной мембраной.

Для выяснения механизма образования комплекса между соединением **8** и мицеллой DPC были проведены эксперименты 2D NOESY ЯМР (рисунок 30). Наблюдалось несколько межмолекулярных ядерных эффектов Оверхаузера (NOE), указывающих на близкое пространственное расположение соответствующих химических групп исследуемого соединения и мицеллы DPC. Перекрестные пики между сигналами C, E, F и H DPC и сигналами CH_3 -8, CH_2 -10 и CH_2 -11 серосодержащего миртенолового соединения **8** служат свидетельством взаимодействия исследуемого соединения с поверхностью мицеллы DPC.

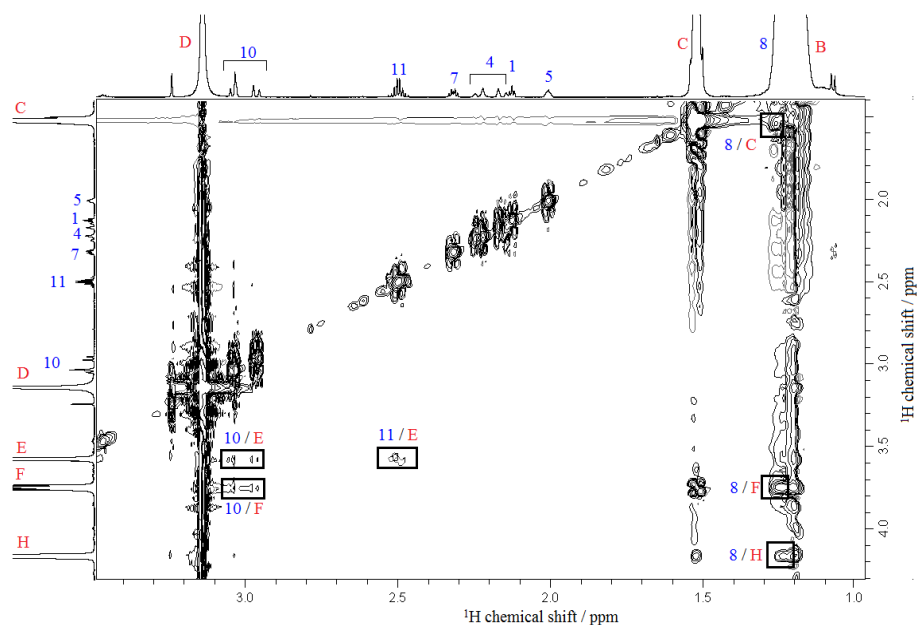


Рисунок 30 – Фрагмент спектра ЯМР 2D NOESY соединения **8** в растворе DPC при 300 К. Цифры обозначают протоны соединения **8**, буквы В-Н относятся к протонам DPC. Межмолекулярные кросс-пики выделены жирными черными рамками

С целью установления факта погружения соединения **8** в мембрану были проведены эксперименты 2D DOSY ЯМР (рисунок 31). Незначительное различие коэффициентов диффузии наблюдалось для протонов молекулы DPC ($D = (9,281 \pm 0,742) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$) и для сульфида **8** ($D = (9,798 \pm 0,784) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$), что свидетельствует о том, что соединение **8** связывается с поверхностью мицелл DPC. Таким образом, данные ЯМР в жидкой фазе подтверждают устойчивое комплексообразование между мицеллами DPC и исследуемым соединением **8**.

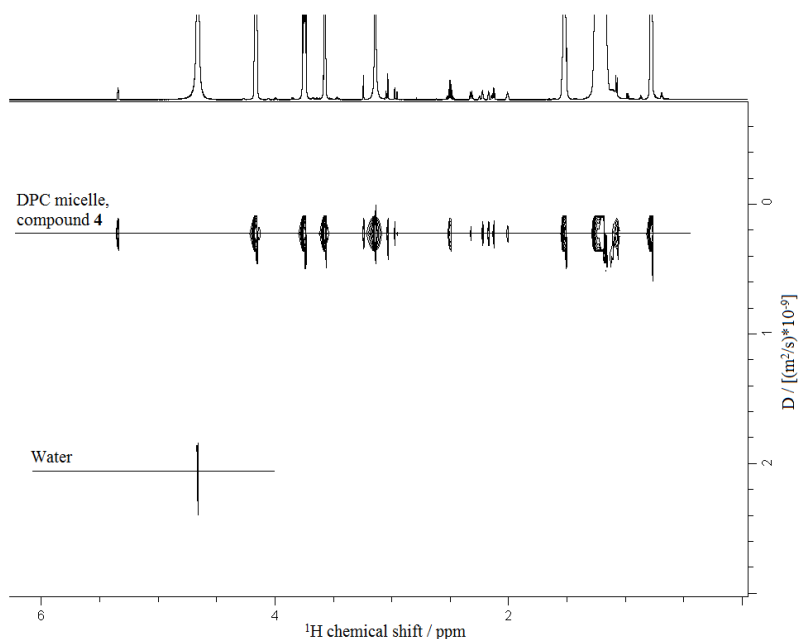


Рисунок 31 – Спектр 2D DOSY ЯМР соединения **8** в растворе DPC / D_2O при температуре 300 К

Чтобы проверить, взаимодействуют ли эфир **7** и амин **9**, содержащие вместо атома серы атомы азота или кислорода с модельными мембранами, также были проведены эксперименты 2D DOSY. Значительно различающиеся коэффициенты диффузии наблюдались для протонов молекулы DPC ($D = (9,566 \pm 0,765) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$) и для содержащего кислород соединения **7** ($D = (13,488 \pm 1,079) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$). Кроме того, эксперимент 2D DOSY ЯМР показал, что мицеллы азотсодержащего соединения **9** и DPC имеют значительно различающиеся коэффициенты самодиффузии в растворе D_2O ($(16,360 \pm 1,309) \cdot 10^{-11}$ и $(9,560 \pm 0,765) \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$,

соответственно), что позволяет утверждать, что соединения **7** и **9** не связываются с мицеллами DPC.

3.9.2. ЯМР-спектроскопия в твердой фазе

Эксперименты в твердой фазе с везикулами POPS проведены для натриевой соли на основе изоборнеола **3** и спирта аналогичной структуры изоборнеола **6** с помощью ЯМР ^{31}P и ^2H . В первую очередь мы провели эксперименты ^{31}P ЯМР в твердом теле с целью изучения биологически релевантного жидкокристаллического фазового состояния фосфолипидных мембран в присутствии терпеноидов. На рисунке 32 показаны спектры ЯМР ^{31}P и ^2H D-POPS в отсутствие и в присутствии соединений **3** и **6** в мольном соотношении 4:1. Типичная форма линии ЯМР ^{31}P , характерная для жидкокристаллического бислая, остается в присутствии 20 мол. % этих соединений. Путем моделирования формы линий твердотельных спектров ЯМР ^{31}P (красные линии) были определены значения анизотропии химического сдвига $\Delta\sigma$. В присутствии соединения **6** значение $\Delta\sigma$ незначительно падает от 45,5 м. д. (для мембран из чистого POPS) до 44,0 м. д., тогда как в присутствии соединения **3** она снижается более значительно до 41,0 м. д.

Такие изменения значений анизотропии химического сдвига ^{31}P можно объяснить более высокой молекулярной подвижностью или изменением ориентации головки POPS в присутствии исследуемых соединений.

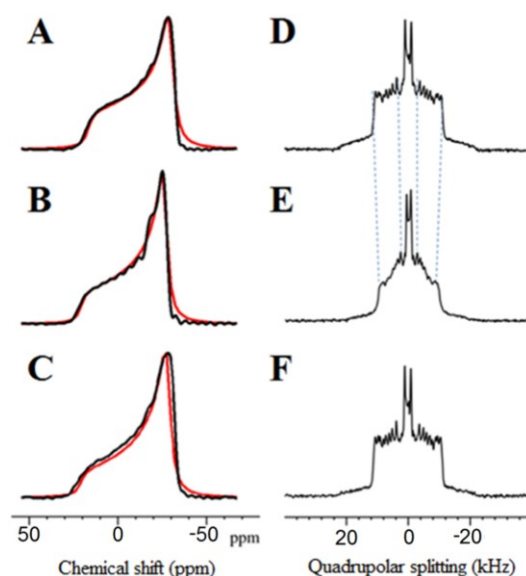


Рисунок 32 – ЯМР ^{31}P спектры (левая колонка) и ^2H (правая колонка) D-POPC в отсутствие (A и D) и в присутствии соединений **3** (B и E) и **6** (C и F) при 50 мас.% H_2O при 30°C . Мольная доля соединений **3** и **6** и POPC составляла 1: 4

Чтобы получить более подробное представление о расположении изученных соединений относительно мембраны были проведены измерения ЯМР ^1H NOESY MAS. Из-за высокой молекулярной подвижности липидов мембраны в жидкокристаллической фазе, полученные скорости кросс-релаксации отражают вероятность контакта между соответствующими молекулярными группами. Следовательно, количественный анализ скоростей кросс-релаксации между соединениями и различными молекулярными сегментами POPC могут быть использованы для получения данных о расположении исследуемой молекулы в липидной мембране, как это было показано для некоторых небольших молекул ранее [141, 145, 213, 226]. На приведенных рисунках 33-34 видно, что изоборнеол **6** взаимодействует с углеводородной частью мицеллы только за счет одной метильной группы гем-диметильного фрагмента молекулы, тогда как в случае с серосодержащим соединением **3** наблюдается дополнительное взаимодействие метиленовой группы гидрофильного фрагмента с углеводородным фрагментом мицеллы, расположенным ближе к гидрофильной ее части.

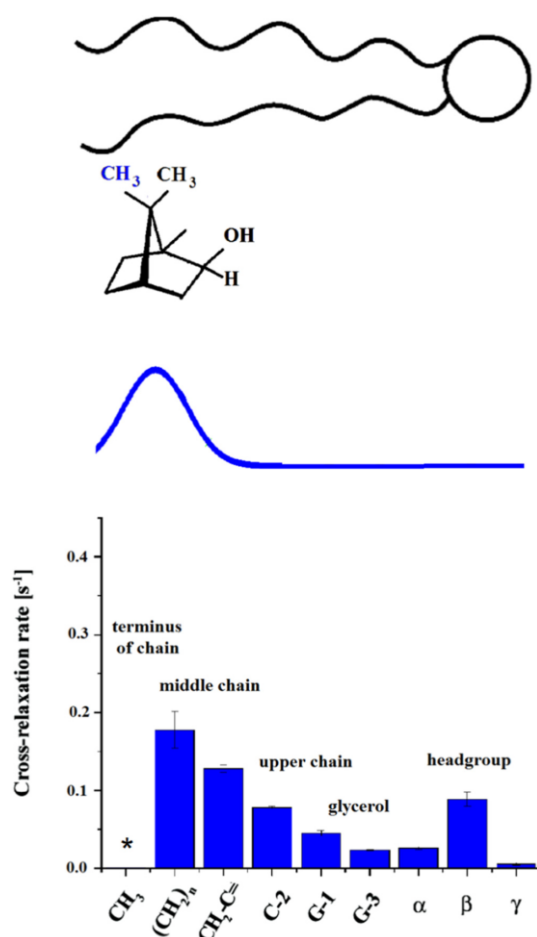


Рисунок 33 – Скорости кросс-релаксации выделенных молекулярных групп изоборнеола **6** по отношению к молекулярному фрагменту POPC, * означает, что эти кросс-пики не были проанализированы из-за возможного перекрытия сигнала с сигналом групп CH₃ соединения **6** и POPC

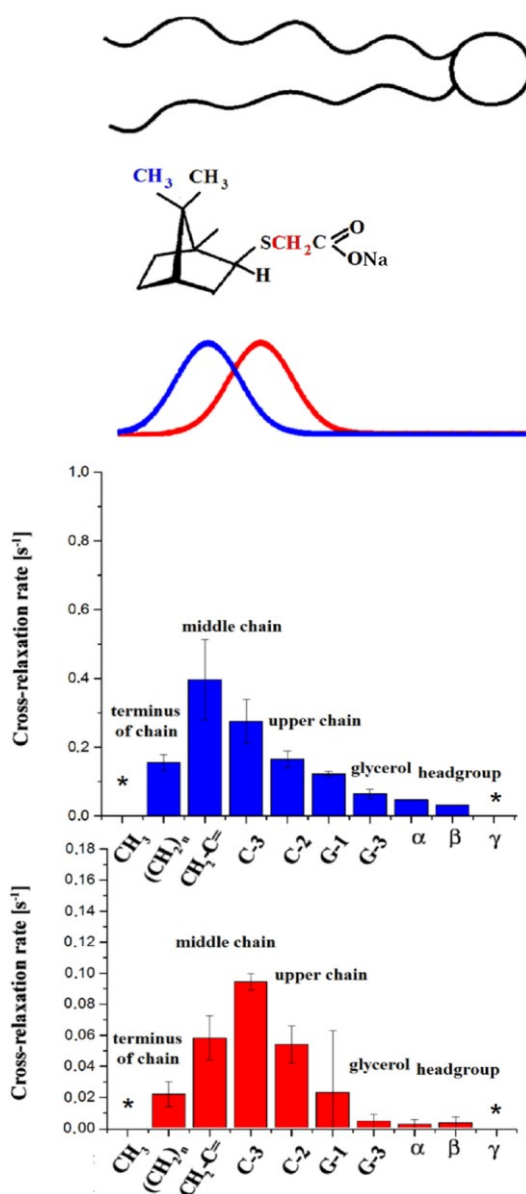


Рисунок 34 – Скорости кросс-релаксации выделенных молекулярных групп соединения **6** по отношению к молекулярному фрагменту РОРС, * означает, что эти кросс-пики не были анализированы из-за возможного перекрытия сигнала с сигналом групп CH₃ соединения **6** и РОРС

Таким образом, изоборнеол **6**, не содержащий атом серы, погружен более глубоко внутрь мицеллы, как бы «проваливаясь» в нее, тогда как серосодержащий борнанный сульфид **3** расположен ближе к гидрофильной части мицеллы, что позволяет гидрофильной части молекулы сульфида **3** выступать в роли своеобразного «якоря», что свидетельствует о проявлении этим соединением сильных мембранотропных свойств.

3.10. Результаты молекулярного докинга с рецептором P2Y₁₂ тромбоцитов

Подавление АДФ-индуцированной агрегации при добавлении тиотерпеноидов в плазму крови было показано в тестах индуцированной агрегации (см.гл.3.2).

P2Y₁₂ является важным трансмембранным хеморецептором тромбоцитов, индуцируемым АДФ. Кроме того, P2Y₁₂ участвует в миграции фосфатидилсерина на поверхность мембраны тромбоцитов. Появление ФС на поверхности цитоплазматической мембраны ведет к увеличению тромбогенности цитоплазматической мембраны [80]. Несмотря на то, что сам по себе АДФ не может вызвать высвобождение плотных гранул тромбоцитов, он может усилить индуцированную сильными агонистами секрецию тромбоцитов [80, 188] и вызванное тканевым фактором образование тромбина [77, 104].

Этот рецептор участвует в агрегации тромбоцитов и, таким образом, является важной мишенью антитромбоцитарного эффекта различных соединений. С целью изучения молекулярных механизмов активации рецептора и объяснения особенностей антиагрегантного действия сульфида **1**, сульфоксида **5**, а также соединений **7-9**, мы исследовали возможность их связывания с P2Y₁₂. Молекулярный докинг применяется для расширения понимания характера и энергетики взаимодействия низкомолекулярных лигандов с биомолекулами.

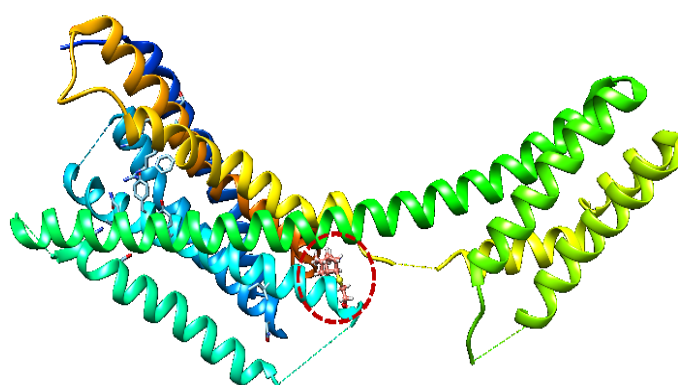
Важным аспектом нашего исследования являлось сравнение полученных результатов сайтов связывания данных соединений с активными метаболитами популярных антиагрегантов, реализующих свой эффект через P2Y₁₂ – клопидогрелом и тикагрелором. Как известно, клопидогрел реализует свое биологическое воздействие после ряда метаболических превращений, необратимо ингибируя связывание АДФ с P2Y₁₂ [243].

Тикагрелор, в отличие от клопидогрела, не предотвращает связывание АДФ с рецептором P2Y₁₂, а приводит к подавлению АДФ-индуцированной передачи внутриклеточных сигналов. Основным метаболитом тикагрелора является активный метаболит AR-C124910XX, который и проявляет биоактивность [109].

Результаты проведенного нами слепого докинга показали, что вне зависимости от особенностей строения терпеноидов, они локализуются вблизи внутриклеточной С-концевой области рецепторного белка P2Y₁₂ (рисунок 35, 36, 39). Анализ состава аминокислотных остатков гидрофобного кармана, в котором локализуются терпеноиды **1**, **5** и **7-9**, показал, что все терпеноиды, кроме азотсодержащего соединения **9**, локализуются в структурно идентичном кармане (таблица 6).

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



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

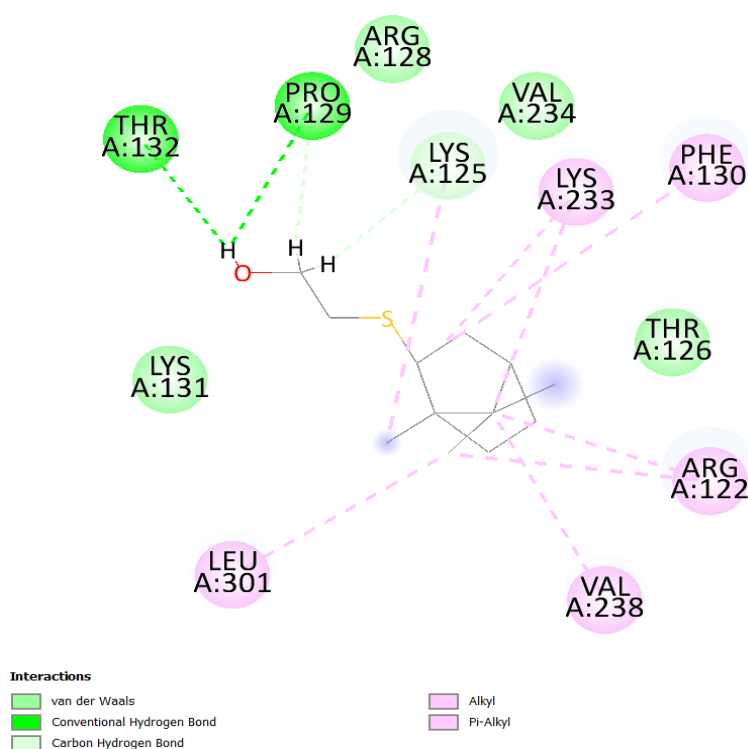


Рисунок 35 – Модель молекулярного докинга и сайтов связывания соединения **1** с P2Y₁₂

Терпеноиды удерживаются в кармане P2Y₁₂ за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а также водородных связей с реакционными группами аминокислотных остатков. Сайты и тип взаимодействий терпеноидов с реакционными центрами аминокислотных остатков представлены на рисунках 35, 36. Как видно из полученных нами данных, для всех структур характерно:

1) образование водородных связей посредством взаимодействия атомов OH-, S=O- и O=S=O- групп с реакционными группами THR132, LYS131, PHE130, PRO129, ARG128, THR126, LYS125 (1.881 – 2.499 Å);

2) ван-дер-ваальсовы взаимодействия с LEU301, LYS237, VAL234, LYS131, PRO129, ARG128, THR126, LYS125, ARG122;

3) гидрофобные взаимодействия атомов терпенового фрагмента и атома серы сульфидной группы с LEU301, VAL238, LYS233, PHE130, LYS125, ARG122. Таким образом, представленная нами модификация функциональных групп и строения терпенового скелета существенно не влияет на гидрофобность, и, следовательно, сродство терпеноидов **1** и **5** к обнаруженному карману P2Y₁₂.

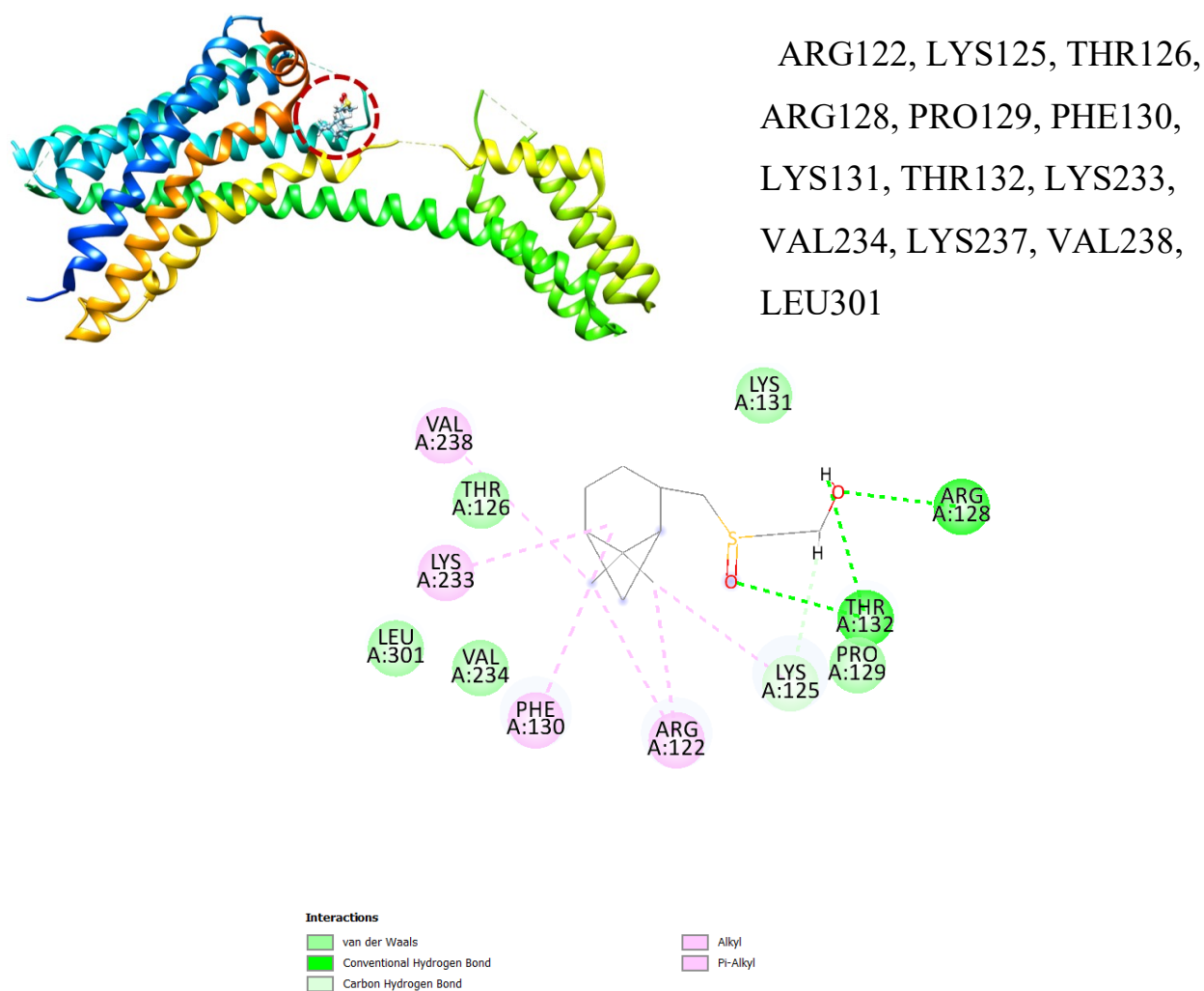


Рисунок 36 – Модель молекулярного докинга и сайтов связывания соединения **5** с P2Y₁₂

Чтобы получить представление о возможном использовании изучаемых нами соединений в качестве антиагрегантных препаратов, мы сравнили их сродство к P2Y₁₂ с аффинностью АМ клопидогрела и тикагрелора к P2Y₁₂. АМ тикагрелора локализуется вблизи внеклеточной N-концевой области рецептора P2Y₁₂ (рисунок 37) 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 (рисунок 35, 36).

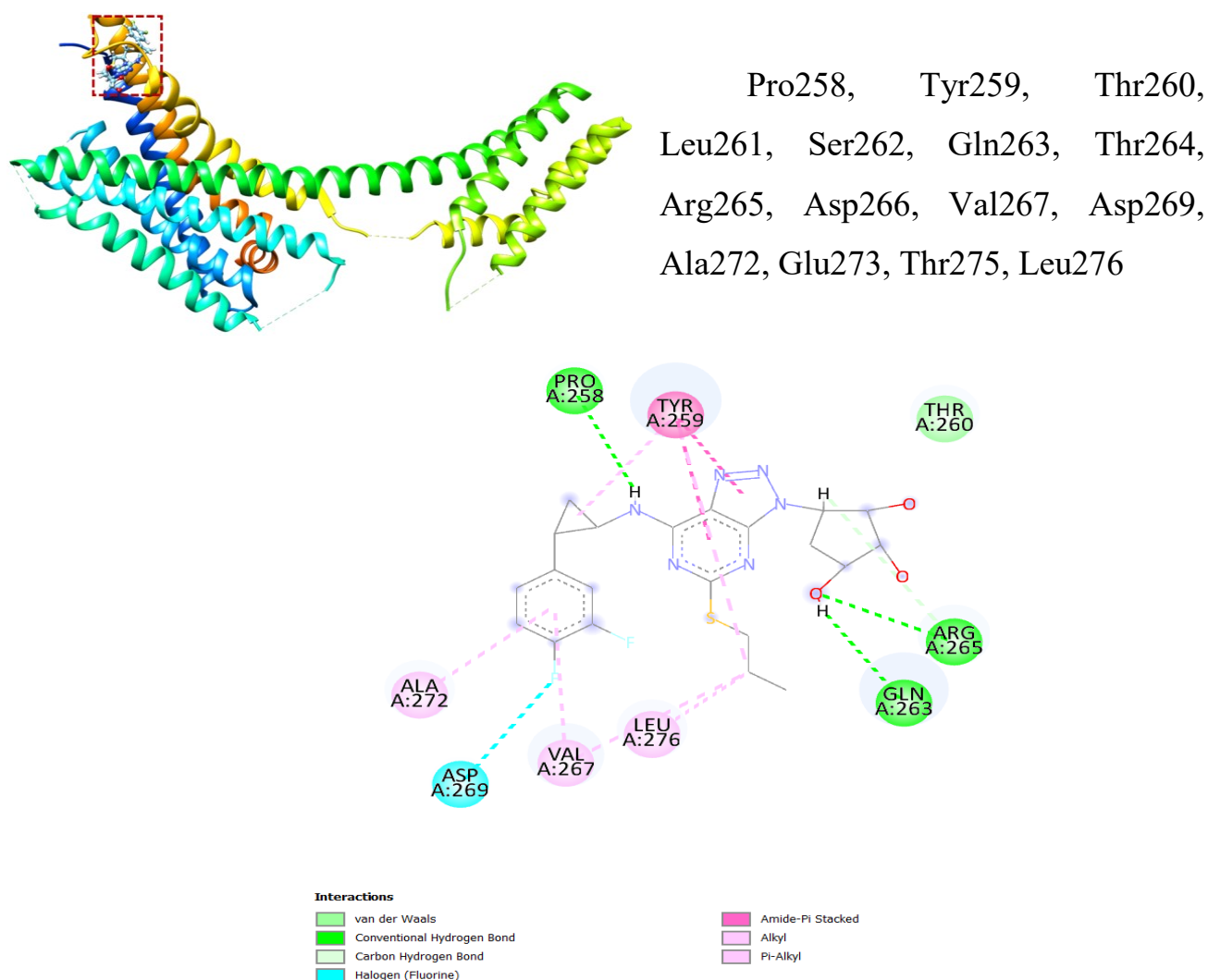
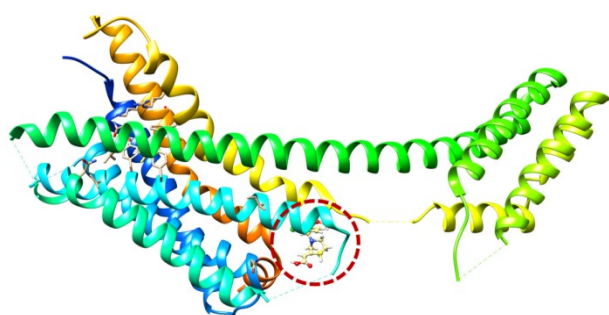


Рисунок 37 – Модель молекулярного докинга и сайтов связывания АМ тикагрелора с P2Y₁₂

Данный факт свидетельствует о том, что механизм блокирования рецептора P2Y₁₂ для АМ тикагрелора и серосодержащих соединений различается. Это может объясняться вероятными различиями в механизме действия тикагрелора и тиотерпеноидов: тикагрелор не подавляет связывание P2Y₁₂ со своим агонистом – АДФ, а модифицирует последующий внутриклеточный ответ, в то время как изучаемые нами соединения, вероятно, предотвращают именно связывание рецептора со своим лигандом. Данное предположение подтверждается результатами связывания докинга с клопидогрелом (рисунок 38).



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

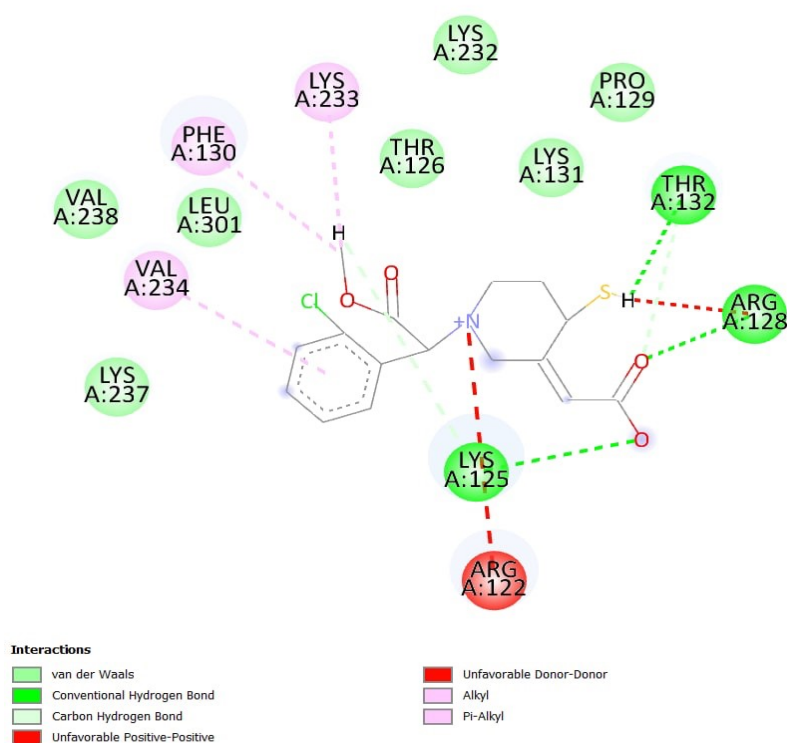


Рисунок 38 – Модель молекулярного докинга и сайтов связывания АМ клопидогрела с P2Y₁₂

Результаты молекулярного докинга показывают, что АМ клопидогрела локализован вблизи С-концевой области, как и тиотерпеноиды, с образованием идентичных сайтов взаимодействия (рисунок 38). Сравнительный анализ энергий связывания терпеноидов и АМ клопидогрела с P2Y₁₂ показывает, что тиотерпеноиды имеют большее сродство к белку рецептора P2Y₁₂ (таблица 7), что и объясняет более выраженный антиагрегантный эффект тиотерпеноидов в тестах индуцированной агрегации.

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

3.10.1. Молекулярный докинг с целью изучения влияния гетероатома в составе терпеноидов на агрегационную активность соединений

Молекулярный докинг был проведен для соединений **7-9** (с одинаковыми терпеновыми фрагментами, но отличающимися гетероатомами гидрофильной части молекул), с рецептором P2Y₁₂ с целью выявить значение гетероатома для реализации этого взаимодействия. Результаты исследования показали, что все соединения расположены во внутриклеточной области рецептора P2Y₁₂, ближе к С-концевой области рецептора (рисунок 39). Все изученные соединения взаимодействуют с P2Y₁₂ через образование водородных связей с эфирной и гидроксильной группами эфира **7**, гидроксильной группой сульфида **8** и амино- и гидроксильной группами амина **9**. Эти группы расположены близко (расстояние от 1,7 до 2,1 Å) к функциональным группам аминокислотных остатков (ARG128, THR132, GLU1004, ASP1005, GLU1008), образующим сайты связывания в рецепторе P2Y₁₂ (рисунок 39, таблица 6).

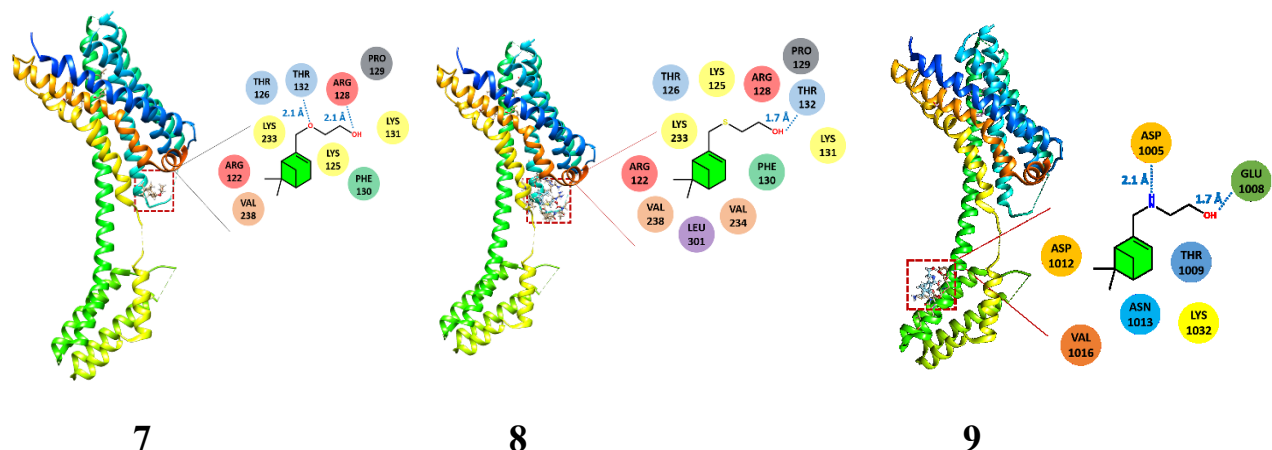


Рисунок 39 – Молекулярный докинг взаимодействия соединений 7-9 с P2Y₁₂. Синие пунктирные линии показывают образование водородных связей и расстояние между ними

С целью изучения свободной энергии Гиббса связывания терпеноидов с P2Y₁₂, на следующем этапе мы провели эксперимент с помощью программного инструмента GOLD. Интересно, что ΔG_{bind} увеличивается в серии изменений гетероатома от серы к кислороду и азоту (рисунок 40), указывая на наиболее стабильный комплекс P2Y₁₂ с сульфидом 8.

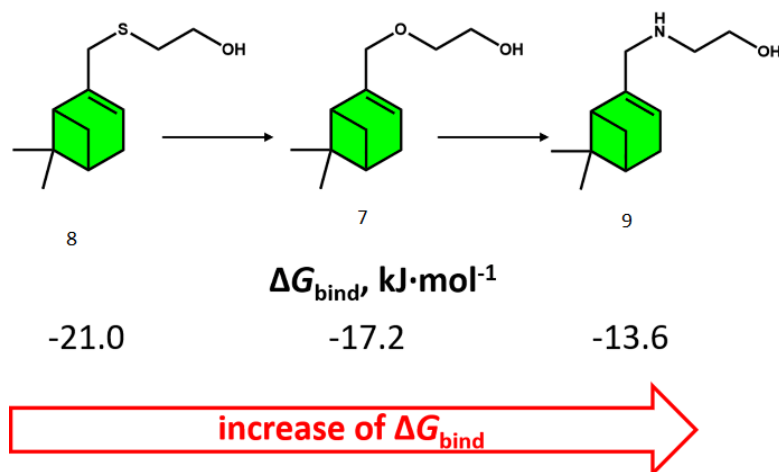


Рисунок 40 – Изменение свободной энергии Гиббса (ΔG_{bind}) терпеноидов 7-9 при связывании с P2Y₁₂

Эти данные позволяют предположить, что антиагрегантная активность амина 9 регулируется скорее за счет стабилизации мембраны, чем за счет

блокирования рецептора. По-видимому, гидрофобная часть встраивается в фосфолипидную мембрану, тогда как гидрофильный хвост слабо удерживается внутриклеточной областью рецептора P2Y₁₂.

Из проведенных нами исследований сделан вывод о том, что именно введение атома серы придает большее сродство к тромбоцитарному рецептору P2Y₁₂.

Таким образом, результаты молекулярного докинга подтверждают связывание P2Y₁₂ с изучаемыми соединениями, при этом в ряду серосодержащих соединений сродство к рецептору существенно не различается и не зависит от терпенового скелета и углеводородного радикала, однако именно атом серы придает терпеноидам большую аффинность к рецептору.

ГЛАВА 4.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тромбоциты играют ключевую роль в системе гемостаза, и многие патологические процессы зависят от их функциональной активности. В экспериментах кровь больных с ИБС обладает повышенной агрегационной способностью, также наблюдаются изменения коагуляционного гемостаза, что подтверждает известные факты о повышенной функциональной активности тромбоцитов и коагуляционного потенциала плазмы крови у больных с данным заболеванием. В связи с тем, что многие патологические процессы приводят к изменениям в системе гемостаза, для выяснения роли изменений в структуре и функции клеточных мембран тромбоцитов при гиперкоагуляции мы провели эксперименты с кровью и плазмой больных с потенциальным протомботическим состоянием – ИБС. Данное заболевание представляет собой, как известно, прогрессирующий процесс, в основе которого лежат атеросклеротические поражения коронарного сосудистого русла и нарушения в системе гемостаза. Морфологической основой этого состояния служат различной степени выраженности процессы тромбообразования в сосудах над надрывом атеросклеротической бляшки или над эрозией эндотелия коронарной артерии и дистальные тромбоэмболии [176]. Повышение агрегации тромбоцитов является одним из важных звеньев патогенеза острых форм ИБС. У больных ИБС отмечается высокая спонтанная агрегационная активность тромбоцитов и повышенная коагуляционная активность плазмы [172]. Именно поэтому является оправданным исследование антикоагуляционной и антиагрегационной активности на плазме и крови больных с ИБС.

В результате проведенных нами исследований были получены данные о зависимости функциональной активности тромбоцитов от каталитических свойств мембраны. В качестве агентов с потенциальным стабилизирующим влиянием на клеточную мембрану мы использовали серию терпеноидов.

Агрегация тромбоцитов может быть обратимой или необратимой. Обратимые реакции тромбоцитов включают адгезию, изменение формы и обратимую агрегацию. Необратимая реакция тромбоцитов включает дегрануляцию и вторичную необратимую агрегацию. Роль комплекса мембранных белков GPIIb/IIIa (интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$) является основополагающей в агрегации тромбоцитов. Данный комплекс является рецептором для фибриногена и фактора Виллебранда. В покоящихся тромбоцитах он остается в своей неактивной форме. Комплекс образуется посредством кальций-зависимой ассоциации GPIIb и GPIIIa. Активация тромбоцитов АДФ и большинством других агонистов индуцирует конформацию GPIIb/IIIa, которые превращают его в связывающую фибриноген форму. Фибриноген соединяет две молекулы GPIIb/IIIa на близлежащих тромбоцитах. Этот процесс является общим в агрегации тромбоцитов, индуцированной разными агонистами, в условиях низкой скорости кровотока. При высокой скорости кровотока роль в соединении рецепторов GPIIb/IIIa на соседних тромбоцитах берет на себя ФВ [181].

Важной находкой проведенного исследования явилось обнаружение способности исследуемых соединений оказывать влияние на показатели индуцированной агрегации тромбоцитов (глава 3.2). Известно, что тромбоциты активируются агонистами, связывающимися со специфическими рецепторами, которые представлены на поверхностной мембране тромбоцитов. Активация с последующей адгезией и агрегацией тромбоцитов реализуется под влиянием различных агонистов – АДФ, коллагена, ТХА₂, тромбина, серотонина, адреналина. Первоначальная адгезия тромбоцитов к месту повреждения *in vivo* опосредуется связыванием коллагена в субэндотелиальном матриксе поврежденного сосуда с расположенным на поверхности тромбоцитов интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$, а также связыванием фактора Виллебранда с комплексом поверхностного гликопротеина Ib тромбоцитов GP1b-IX-V [107]. GPVI – это рецептор гликопротеина мембраны тромбоцитов для коллагена, который играет ключевую роль в активации тромбоцитов, индуцированной коллагеном. На интактном тромбоците он существует в виде мономерной формы и обладает

низким сродством к коллагену. Гликопротеин GPIIb при контакте с коллагеном формирует комплекс с факторами IX и V в присутствии ФВ и фосфатидилсерина на наружной поверхности мембран. В результате активации комплекса GPIIb-IX-V происходит димеризация GPVI, что ведет к повышению его чувствительности к коллагену [128]. Коллагеновые волокна обладают высокой тромбогенностью, причем коллагены I, III и IV типов являются наиболее распространенными формами, встречающимися в кровеносных сосудах [73]. Выявленное подавление индуцированной коллагеном агрегации может свидетельствовать и об инактивации GPVI, с одной стороны, а также о блокировании связывания ФВ с GPIIb-IX-V на поверхности тромбоцитов. Данные изменения могут происходить как за счет прямого рецепторного воздействия терпеноидов, так и под влиянием мембранотропного эффекта: гидрофобные взаимодействия с мембраной ведут к стабилизации ее структуры и препятствуют активации теназного комплекса за счет этого взаимодействия. Формирование теназного комплекса возможно только при наличии фосфатидилсерина на поверхности мембран тромбоцитов или микровезикул. Асимметрия фосфолипидов в покоем тромбоците обеспечивает атромбогенность ее поверхности. ФС на внешней поверхности мембраны активированного тромбоцита является плацдармом для активации внутреннего теназного комплекса и протромбиназы [68], что обуславливает протромботическую готовность тромбоцитов при различных патологических состояниях, в том числе при ИБС.

За начальной адгезией тромбоцитов к коллагену следует адгезия тромбоцитов друг к другу с образованием тромбоцитарной пробки. Агонисты взаимодействуют с рецепторами тромбоцитов, что приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция в результате высвобождения его из внутриклеточных источников и поступления из плазмы. Для нормальной агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, необходима совместная активация рецепторов $P2Y_{12}$ и $P2Y_1$, для которых он является агонистом [80]. Выявленное в работе снижение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии исследуемых соединений позволяет предположить инактивацию рецепторов $P2Y$ тромбоцитов.

Важно отметить, что в наших экспериментах антиагрегантные свойства превосходили таковые у клопидогрела, специфического блокатора $P2Y_{12}$.

Рецепторы, связанные с G-белком, к которым относятся $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ и рецепторы тромбина, активируют фосфолипазу $C\beta$ ($PLC\beta$). Эти процессы ведут к трансформации комплексов $GP_{IIb}/IIIa$ (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$), что позволяет им связывать фибриноген плазмы. Активация $PLC\beta$ или $PLC\gamma$ инициирует образование диацилглицерина и трисфосфата инозита. Диацилглицерин способствует притоку кальция, а трисфосфата инозит мобилизует внутриклеточные запасы кальция. Активность мембранной фосфолипазы $A2$ стимулируется повышением концентрации кальция в тромбоцитах, что приводит к высвобождению арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов. ЦОГ-1 превращает арахидоновую кислоту в простагландин H_2 – промежуточный продукт, который далее метаболизируется тромбоксансинтазой в TXA_2 . TXA_2 является сильным активатором тромбоцитов. Препараты, ингибирующие ЦОГ-1, к которым относится аспирин, снижают агрегацию, вызванную коллагеном, и приводят значительному снижению агрегации, вызванной и арахидоновой кислотой. Подавление вызванной арахидоновой кислотой агрегации тромбоцитов может использоваться для оценки эффективности антиагрегантной терапии аспирином [181]. В ходе проведенных нами агрегационных тестов с арахидоновой кислотой было выявлено практически полное подавление агрегации по сравнению с контролем, причем эффект был более выраженным, чем для ацетилсалициловой кислоты. Арахидоновая кислота, в отличие от других индукторов, реализует свое действие не через рецепторный аппарат на поверхности тромбоцитов, а проникая непосредственно через мембрану [40]. Таким образом, потеря данного свойства в присутствии тиотерпеноидов подтверждает конформационные изменения мембран под влиянием терпеноидов, препятствующие ее проницаемости.

Нами также была показана активация агрегации адреналином, что отражало TXA_2 -опосредованный путь активации тромбоцитов. Адреналин стимулирует α_2 -адренорецепторы тромбоцитов, что ингибирует аденилатциклазу и ведет к снижению содержания цАМФ. Другим механизмом действия является

способность адреналина изменять проницаемость клеточной мембраны для ионов кальция. Снижение концентрации цАМФ в сочетании с повышением содержания внутриклеточного кальция ведет к агрегации тромбоцитов [231]. Выявленное нами практически полное угнетение индуцированной адреналином агрегации под влиянием исследуемых соединений объясняется не только угнетением выработки ТХА₂, но и снижением проницаемости мембраны, что доказывает важность структуры и клеточной мембраны для агрегационной готовности тромбоцитов.

Другим интересным фактом, полученным в ходе выполнения работы, являлось подавление агрегации тромбоцитов, активированной ристомисином, что косвенно отражает активность ФВ. Ранее было показано, что ристомисин способен стимулировать взаимодействие ФВ с тромбоцитарным гликопротеидом Ib *in vitro* [192]. Следовательно, достоверное снижение данного показателя под действием терпеноидов может происходить в результате подавления активности комплекс GPIb-IX-V.

Подавление всех видов индуцированной агрегации при использовании терпеноидов предполагает не только мультирецепторный, но мембранный механизм действия. Вероятно, для полноценной активации рецепторов тромбоцитов при воздействии лигандов с последующей их активацией важна пластичность клеточной мембраны.

Результаты, представленные в главе 3.3, свидетельствуют о нормализации АЧТВ, снижении скорости агрегации, увеличении протромбинового времени под действием всех соединений, содержащих гетероатомы, однако для соединения **6** (изоборнеола) гипокоагуляционные и антиагрегационные эффекты были менее выражены. Данные наблюдения позволяют предположить роль амбифильности молекул для реализации гемоактивности. Введение атома серы в состав соединений приводило к статистически значимым изменениям коагуляционных тестов и скорости спонтанной агрегации. Гетероатом в составе терпеноидов придает молекулам амбифильность: терпеновый остов является гидрофобным, а углеводородный тиорадикал является гидрофильным. Такие свойства

обеспечивают взаимодействие исследуемых веществ с мембраной, продемонстрированное с помощью разнообразных методов. Молекулярное моделирование позволило получить наглядную визуализацию характера связывания соединений с мембраной на примере модельных мицелл (глава 3.8). Сами по себе модельные мембраны SDS и DPC обладают прокоагулянтной каталитической активностью (глава 3.7). Добавление терпеноидов приводит к значительному снижению тромбогенной активности мицелл, что подтверждается тестами АЧТВ. Молекулярное моделирование показало, что терпеновый остов встраивается в толщу самой мицеллы, в то время как гидрофильный углеводородный конец расположен сверху мембраны, вероятно, обуславливая взаимодействие с плазменными факторами свертывания крови (глава 3.8).

Увеличение АЧТВ в экспериментах с терпеноидами свидетельствует о влиянии на внутренний путь активации каскада свертывания (глава 3.3). Этот тест отражает формирование и работу ферментных комплексов внутреннего пути активации системы гемостаза на каолин-кефалиновой поверхности. Каолин-кефалиновая смесь представляет собой частицы оксида кремния и алюминия с добавлением фосфолипидов, полученных путем экстракции их тканевого тромбопластина. Внутренний путь активации начинается с активации фактора XII [224]. Молекула фактора XII активируются отрицательно заряженными поверхностями и различными органическими веществами, в том числе и длинноцепочечными жирными кислотами, входящие в состав мембранных липидов [14]. Очевидно, связывание серосодержащих производных терпенов с фосфолипидами мембран и повышение их жесткости за счет образования гидрофобных связей между углеводородным радикалом терпеноидов и ацильными цепями липидов снижает возможность контакта и последующей активации фактора XII. Следовательно, как в тесте тромбодинамики, так и в тесте АЧТВ, вероятное снижение активности комплексов внутреннего пути гемостаза у больных с ИБС в присутствии серосодержащих производных терпенов обусловлено ингибированием гидрофобного связывания витамин К-зависимых факторов с фосфолипидной поверхностью.

Увеличение протромбинового времени в присутствии исследуемых соединений свидетельствует о подавлении и внешнего пути коагуляционного гемостаза. В результате активации свертывания крови по внешнему пути образуется комплекс внешней теназы. В присутствии ионов кальция под влиянием тканевого фактора, активированного фактора VII образуется активированный фактор X, участвующих в формировании протромбиназы. Тканевой фактор не обладает ферментативной активностью, но является кофактором фактора свертывания VII/VIIa. Образованный комплекс VIIa-ТФ, называемый внешней теназой, становится способен в присутствии ионов кальция активировать факторы IX и X. Наличие ФС в составе специфически организованных фосфолипидов является обязательным условием проявления каталитической активности плазмы [19].

В тестах тромбодинамики на плазме крови больных с ИБС индукция выпадения сгустков фибрина происходит при контакте плазмы с тканевым фактором (глава 3.4). Данный тест отражает внешний путь активации свертывания крови. ТФ образует комплекс с фактором VIIa, называемый внешней теназой, который активирует фактор X, превращая его в активную форму. С появлением фактора Xa на фосфолипидной поверхности модельного тканевого фактора формируется протромбиназа. Комплекс Xa-Va при взаимодействии с фосфолипидами и ионами кальция расщепляет протромбин до тромбина. Тромбин, в свою очередь, катализирует образование фибрин-мономера, в дальнейшем полимеризующегося в нити фибрина. Нити фибрина под действием фактора XIIIa преобразуются в сеть волокон, образующих фибриновый гель [157]. Все эти последующие после появления фактора Xa превращения отражаются в показателях скорости образования сгустка из нитей фибрина, которая снижалась в присутствии исследуемых веществ, что означает ингибирование активности протромбиназного комплекса. Таким образом, полученные результаты тромбодинамики и данные стандартного коагуляционного теста показали, что полученные вещества ингибируют активацию коагуляционных факторов в

протромбиназном комплексе и не влияют на каталитическую способность тромбина, о чем свидетельствуют отсутствие изменений тромбинового времени.

Асимметрия фосфолипидного состава мембран является ключевым звеном в регуляции функциональной активности тромбоцитов. Активация тромбоцита в патологических условиях при воздействии различных индукторов ведет к исчезновению данной асимметрии и экспозиции ФС на поверхности. ФС имеет ацильные цепи с ненасыщенными жирными кислотами, тогда как ФХ, представленный на поверхности покоящихся тромбоцитов, имеет преимущественно насыщенные ацильные цепи. Контакт ФС с ионами кальция, содержащимися в большом количестве в межклеточной жидкости или плазме, приводит к его кластеризации. Молекулы ФС имеют форму конуса и приводят к разрыхлению мембраны и увеличению ее текучести. Для адекватной активации внутреннего теназного комплекса (факторов VIIIa, IXa и X) и протромбиназы (Va, Ха, протромбин), необходима экспозиция ФС на поверхности мембраны тромбоцитов. Взаимодействие фактора X и протромбина с клеточными мембранами предполагают возможность комбинированного связывания белка с фосфолипидами мембран за счет кальций-опосредованного электростатического и гидрофобного взаимодействий между ними [9, 20]. Ca^{2+} -опосредованное взаимодействие этих белков происходит путем образования кальциевых мостиков между отрицательно заряженными группами фосфолипидов мембран и остатками γ -карбоксиглутаминовых кислот в факторе X и протромбина. Мостики могут быть чисто ионными и хелатными, в зависимости от вида отрицательно заряженных фосфолипидов. ФС обеспечивает наиболее эффективное связывание белка за счет хелатных кальциевых мостиков [21]. Фактор X, как и протромбин, при связывании ионов Ca^{2+} претерпевает конформационный переход, приводящий к экспонированию гидрофобных аминокислотных остатков, вступающих в гидрофобное взаимодействие с ацильными цепями фосфолипидов [68].

Для проявления кофакторной функции фактора Va в протромбиназе также необходимо его взаимодействие с фосфолипидами. Кроме того, фактор V содержит 19 остатков цистеина, часть из которых образуют внутридоменные

дисульфидные связи, а некоторые содержат свободные сульфгидрильные группы [101], с которыми могут вступать во взаимодействие серосодержащие группы тиотерпеноидов. Это, в свою очередь, может изменить конформацию фактора Va и понизить его активность в протромбиназе. Из этого следует, что экспозиция ФС и липидная подвижность имеют значение для каталитической активности протромбиназы при гиперкоагуляции. Экспозиция ФС обеспечивается боковой подвижностью липидов. Очевидно, этим можно объяснить понижение скоростей тромбообразования в тесте тромбодинамики в присутствии тиотерпеноидов, так как терпены способны стабилизировать мембраны за счет *ван-дер-ваальсовых* взаимодействий с фосфолипидами клеточных мембран [86].

Значимость состояния мембраны и асимметрии липидов для реализации патологической протромбогенной активности клеточной мембраны подтверждается влиянием тиотерпеноидов на количество ТМВ при хранении тромбоконцентрата (глава 3.5). Образование ТМВ происходит при активации тромбоцитов [17, 26]. Гидрофобное взаимодействие терпеноидов с мембраной, вероятно, обуславливает ее стабилизацию, что снижает способность тромбоцитов к образованию ТМВ и доказывает важное значение данного вида связывания с мембранами в патогенезе заболеваний, сопровождающихся повышенной функциональной активностью тромбоцитов.

Особенности строения выбранных синтезированных соединений позволяют предположить, что снижение активности протромбиназы может быть связано с ингибированием гидрофобного взаимодействия фактора X и протромбина с фосфолипидами. Наличие углеводородного терпенового скелета молекул обеспечивает их гидрофобное взаимодействие с ацильными цепями фосфолипидов и тем самым снижает возможность подобного взаимодействия аминокислотных гидрофобных кластеров факторов свертывания. Поэтому более гидрофобный борнанный сульфид **2**, по-видимому, более активен при подавлении тромбообразования в тесте тромбодинамики по сравнению с натриевой солью **3** и пинановым сульфоксидом **5**. Более высокая растворимость соединения **3** существенно сказывалась в тесте тромбодинамики при наличии

свободной фосфолипидной тромбогенной поверхности в виде взвешенных в плазме микровезикул – исчезали спонтанные сгустки фибрина в плазме с выраженными гиперкоагуляционными проявлениями (глава 3.4). Следовательно, Ca^{2+} -опосредованное связывание фактора X и протромбина сохраняется, что, очевидно, и обеспечивает менее эффективную работу протромбиназы без участия гидрофобного взаимодействия – уменьшается размер фибринового сгустка (CS). Таким образом, в плазме крови больных с гиперкоагуляционными проявлениями тиотерпеноиды ингибируют активацию коагуляционных факторов протромбиназного комплекса на модельной фосфолипопротеиновой поверхности тканевого фактора за счет стабилизации фосфолипидов, взаимодействуя с их ацильными цепями, и, возможно, изменяя активность кофакторного белка – фактора Va, связываясь с его сульфгидрильными группами.

Удаление фосфолипопротеиновых микровезикул из исследуемых образцов плазмы крови больных с ИБС отражалось аналогичным образом на показателях тромбодинамики, как и в случаях присутствия тиотерпеноидов. Особенно это было заметно в плазме с выраженными гиперкоагуляционными проявлениями, в которой присутствовали свободные фибриновые сгустки (рисунок 18). В этом случае центром формирования сгустков выступали микровезикулы, поверхность которых содержит теназный и протромбиназный комплексы [87]. Удаление с помощью фильтрации этих частиц из плазмы, как и введение в нее тиотерпеноидов, в одинаковой степени приводило к исчезновению свободных фибриновых сгустков. Следовательно, эти данные подтверждают определяющую роль фосфолипопротеиновой поверхности для реализации тромбогенного потенциала плазмы крови у больных с гиперкоагуляционными проявлениями и возможности ее ингибирования серосодержащими терпенами.

Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в результате активации тромбоцитов различными патологическими индукторами вызывает определенные структурные изменения. Тромбоцит из дисковидного становится сферическим с длинными мембранными выступами. Гранулы тромбоцитов централизуются, и они опорожняют свое содержимое в канальцевую систему, а оттуда – в плазму.

Реакция изменения формы тромбоцитов опосредуется цитоскелетом тромбоцитов, сетью микротрубочек и актиновых нитей. Изменение формы вызывает основные изменения в организации цитоскелета, приводящие к полимеризации легких цепей актина и миозина, что приводит к превращению тромбоцитов из двояковогнутых дисков в распространенные клетки неправильной формы с цитоплазматическими выростами. Во время этого процесса тромбоциты резко увеличивают площадь своей поверхности, индуцируя взаимодействие их друг с другом и агрегацию [129]. Данные изменения мы наблюдали методом атомно-силовой микроскопии (глава 3.6). Активация происходила при контакте со стеклянной подложкой. Нами было выявлено, что добавление терпеноида ингибировало спонтанную активацию и последующее за этим изменение формы тромбоцита.

Наличие самого факта гидрофобного взаимодействия мембран с исследуемыми соединениями было также подтверждено методом ЯМР-спектроскопии (глава 3.9). 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. Оказалось, что добавление серосодержащего фрагмента в состав терпена ведет к более поверхностной ориентации соединения в мембране, чем в случае исходного терпеноида (например, изоборнеола), который при взаимодействии с мембраной «провалился» глубоко внутрь углеводородного ядра мицеллы. Гидрофильный фрагмент терпеноида локализовался ближе к наружной поверхности цепи, а терпеновое основание удерживалось в глубине мицеллы за счет гидрофобного связывания.

Важной находкой оказалась доказанное связывание исследуемых веществ с рецептором тромбоцитов $P2Y_{12}$ (глава 3.10). Подавление АДФ-индуцированной агрегации позволило также предположить прямое подавление рецепторной

активности 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. Оказалось, что все серосодержащие соединения вне зависимости от терпеновой основы и углеводородного радикала взаимодействуют с С-концевой областью рецептора, располагаясь в структурно-идентичном кармане аминокислотных остатков рецептора. Клопидогрел, как было показано, также локализуется в данном кармане, что позволяет предположить аналогичный клопидогрелу механизм действия у изучаемых соединений. Известно, что клопидогрел реализует свой эффект в результате блокирования связывания АДФ с P2Y₁₂ [241, 243]. Вероятно, тиотерпеноиды реализуют свой эффект также в результате блокирования данного взаимодействия. Интересным наблюдением оказалось то, что P2Y₁₂ образует более стабильные комплексы с терпеноидами в сравнении с клопидогрелом на основании анализа энергий связывания, что делает понятным более выраженное подавление АДФ-индуцированной агрегации тиотерпеноидами. Как оказалось, тикагрелор локализуется в N-концевой области рецептора. Иной сайт взаимодействия объясняется иным механизмом действия данного препарата – он не препятствует связыванию P2Y₁₂ со своим лигандом, но модифицирует внутриклеточный ответ [109]. Кроме того, анализ энергий связывания идентичных по структуре, но различающихся гетероатомами пиненовых соединений **7-9** 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.

Проведенные нами лабораторные исследования плазмы при использовании терпеноидов позволили выявить важность гидрофобного взаимодействия в проявлении каталитической активности мембран. Разнообразные методики выявили характер связывания исследуемых веществ с модельными мембранами, что позволяет предположить характер их связывания с плазматической мембраной тромбоцитов. Стабилизация мембран тромбоцитов с помощью

мембранотропных терпеноидов ведет к уменьшению подвижности фосфолипидов между наружным и внутренним слоем в составе мембраны за счет гидрофобного взаимодействия, что препятствует экспозиции ФС на поверхности тромбоцитов и ведет к снижению протромбогенного потенциала мембранной поверхности тромбоцитов даже при гиперкоагуляционных состояниях. С другой стороны, активация каскада свертывания крови при контакте с мембранами, не содержащими ФС, говорит и о других механизмах активации коагуляционного гемостаза. Связывание терпеноидов с мембранами препятствует гидрофобному взаимодействию факторов свертывания с мембранами, что подтверждает важность данного вида взаимодействия в механизмах активации плазменных факторов свертывания в патогенезе нарушений системы гемостаза.

Кроме того, выявленная низкая цитотоксичность исследуемых соединений, в сочетании с выраженной антиагрегационной способностью, превосходящей эффекты современных антиагрегантов, и антикоагуляционными свойствами делает их перспективными веществами, на основе которых можно создать новые лекарственные средства. В настоящее время нет аналогичных по механизму активности соединений, которые подавляли бы и агрегационную способность тромбоцитов, и плазменно-коагуляционное звено гемостаза. Следует отметить, что исследуемые соединения способны подавлять и рецепторную активацию тромбоцитов – в частности, возможность связывания соединений с рецептором $P2Y_{12}$ была показана не только агрегационными тестами, но и методом молекулярного докинга.

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что функциональная активность тромбоцитов зависит от каталитической активности их мембран. Гидрофобные взаимодействия с мембраной играют ключевую роль в как в активации тромбоцитов, так и в активации плазменного звена гемостаза при гиперкоагуляционном синдроме. Данные, полученные в результате исследования, свидетельствуют о важной роли гидрофобного связывания различных индукторов с мембранами для реализации тромбогенной активности тромбоцитов в патогенезе нарушений системы гемостаза.

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 мы использовали серию 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 подавления рецепторной активации тромбоцитов. Способность терпеноидов снижать коагуляционный потенциал при ИБС выявлен не только для самих тромбоцитов, но и для тромбогенных микрочастиц. Кроме того, оказалось, что тиотерпеноиды способны уменьшать количество микровезикул при хранении тромбоконцентрата. Данное свойство также объясняется стабилизирующим действием соединений на мембрану, что приводит к уменьшению ее текучести и препятствует образованию ТМВ.

С целью подтверждения и исследования возможных взаимодействий изучаемых соединений с клеточной мембраной, мы исследовали их связывание с модельными тромбогенными поверхностями, являющимися моделью мембран эукариотических клеток. 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. Полученные нами данные позволяют говорить о наличии гидрофобного взаимодействия терпеноидов с модельными мембранами, а также о пространственной ориентации терпенов относительно поверхности мицелл. Установлено, что тиотерпеноиды встраиваются терпеновым остовом в мембрану, при этом гидрофильный тиорадикал располагается на наружной поверхности мицеллы. Гидрофобные взаимодействия с мембраной обуславливают снижение каталитической активности мембран тромбоцитов при

воздействии различных физиологических и патологических индукторов, что подтверждено нашими экспериментами. Интересной находкой оказалась разница во взаимодействии с мембранами терпеноидов, содержащих атом серы, и изоборнеола, не содержащего тиорадикала, что подтверждает важность серосодержащего фрагмента в этом взаимодействии. Подавление рецепторной активации тромбоцитов, выявленное при помощи тестов индуцированной агрегации тромбоцитов, было доказано результатами проведенного молекулярного докинга терпеноидов с АДФ-рецептором тромбоцитов $P2Y_{12}$. Данные этого эксперимента подтверждают ингибирование рецепторной активации тромбоцитов терпеноидами. Все серосодержащие соединения располагаются в структурно-идентичном аминокислотном кармане рецептора $P2Y_{12}$, аналогичном таковому для клопидогрела. Кроме того, обнаружено, что терпеновый остов и углеводородный радикал практически не влияют на сайты и энергию связывания, однако именно атом серы дает наибольшую аффинность соединений к рецептору, при этом сродство тиотерпеноидов к рецептору $P2Y_{12}$ превосходит аффинность клопидогрела.

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. С учетом низкой цитотоксичности, уникального сочетания антиагрегационного и антикоагуляционного эффектов, тиотерпеноиды являются перспективными соединениями для коррекции тромбофилических состояний, а также могут быть использованы для стабилизации препаратов крови.

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 рецептора 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 мембранотроных 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю, д.м.н., доценту С. В. Киселеву за всестороннюю помощь при планировании и проведении всей диссертационной работы, за участие в экспериментальной части исследования; своему научному консультанту д.х.н., проф., зав. каф. общей и органической химии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России Л. Е. Никитиной за ценные советы при планировании исследования, помощь и участие на всех этапах диссертационной работы; д.м.н., проф., зав. каф. общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России С. В. Бойчуку за помощь в обсуждении результатов исследования и предоставленные данные по изучению цитотоксичности исследуемых веществ. Автор выражает искреннюю признательность д.х.н., проф. кафедры медицинской физики Института физики КФУ В. В. Ключкову и проф. Института медицинской физики и биофизики Лейпцигского Университета (Германия) Н. А. Scheidt за проведение ЯМР-исследований; к.х.н., старшему научному сотруднику А. А. Ксенофонтову и инженеру-исследователю П. С. Бочарову ФГБУН Института химии растворов им. Г. А. Крестова РАН (г. Иваново) за проведенный эксперимент по молекулярному докингу; к.ф.-м.н., доценту кафедры медицинской физики Института физики КФУ А. В. Халиуллинной за проведение молекулярного моделирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АМ – активный метаболит

анти-Ха – ингибитор фактора Ха

АСК – ацетилсалициловая кислота

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

Ацетил-КоА – ацетил-коэнзим А

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДВС – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИЛ-1 – интерлейкин-1

ИЛ-6 – интерлейкин-6

ИМ – инфаркт миокарда

ИТП – иммунная тромбоцитопеническая пурпура

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

М.д. – миллионные доли

мДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

МНО – международное нормализованное отношение

НМГ – низкомолекулярный гепарин

НФГ – нефракционированный гепарин

ПВ – протромбиновое время

ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия

РНК – рибонуклеиновая кислота

СД – сахарный диабет

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
 ТВ – тромбиновое время
 ТМВ – тромбоцитарные микровезикулы
 ТФ – тканевой фактор
 ТХА2 – тромбоксан А2
 ФВ – фактор Виллебранда
 ФИ – фосфатидилинозитол
 ФС – фосфатидилсерин
 ФС-β – фосфолипаза С β
 ФХ – фосфатидилхолин
 ФЭА – фосфатидилэтаноламин
 цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
 цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
 ЦОГ – циклооксигеназа
 ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс
 2D COSY – гомоядерная корреляционная спектроскопия
 2D DOSY – диффузионно-упорядоченная спектроскопия
 2D NOYSY – ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера
 ADF – фактор деполимеризации актина
 AMPK – аденозинмонофосфат-активированная протеинкиназа
 AT-3 – антитромбин III
 ATB – Automated force field Topology Builder
 COVID-19 – новая коронавирусная инфекция 2019 года
 CYP P450 – цитохром печени P450
 Del-1 – онтогенетический эндотелиальный локус-1
 DPC – додецилфосфохолин
 D-POPC – 1-пальмитоил(d31)-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин
 FcR – Fc-рецептор
 FSC – прямое малоугловое светорассеивание

- Gla – γ -карбоксиглутамат
- GPCR – G-протеиновые рецепторы
- GPIb – гликопротеин Ib
- GPVI – гликопротеин VI
- Gq – GTP-binding protein q
- ICAM-1 – молекулы межклеточной адгезии 1
- IP – рецептор простациклина
- IP3 – инозитол трифосфат
- LAMP – лизосомально-ассоциированный мембранный протеин
- MPV – средний объем тромбоцитов
- MTS – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
- NO – оксид азота
- NOE – эффект Оверхаузера
- PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа
- PAR – рецептор, активируемый протеазой
- PGH2 – простагландин H2
- PGI2 – простациклин
- PI3-K – фосфоинозитид-3-киназа
- PMS – phenazine methosulfate
- POPC – 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
- SDS – додецилсульфат натрия
- SFLLRN – рецептор тромбина активирующий пептид
- SSC – боковое малоугловое светорассеивание
- WDR1 – домен повтора 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиментарный фактор как вероятный индуктор воспаления или липидный компонент механизма транспорта кишечного эндотоксина / П.Л. Окороков, И.А. Аниховская, М.М. Яковлева [и др.] // Физиология человека. – 2012. – Т. 38, № 6. – С. 105-112.
2. Аниховская, И. А. Эндотоксиновая теория атеросклероза / И. А. Аниховская, А. А. Кубатиев, М. Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2015. – Т. 41, № 1. – С. 106–116. – doi: 10.7868/S0131164615010026.
3. Антиагрегационная активность солей производных 7-тиетанилксантина в условиях *in vitro* / А. В. Самородов, Ф. Х. Камилов, А. Р. Халимов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 32.
4. Антитромботическая активность антиагрегантного средства ангикур на модели артериального тромбоза у крыс с изопротеренолиндуцированным инфарктом миокарда / А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, Ф. А. Халиуллин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 9. – С. 303–306. – doi: 10.47056/0365-9615-2021-172-9-303-306.
5. Антиэндотоксиновое направление в лечении хронического воспаления и женского бесплодия / Г. Г. Энукидзе, И. А. Аниховская, А. А. Марачев, М. Ю. Яковлев. – Москва : ЗАО «КДО-тест», 2007. – 80 с. – (Новые лечебно-диагностические технологии). – ISBN 5-8443-0041-6.
6. Аспиринорезистентность: причины, принципы диагностики, клинические исходы / А. Т. Душпанова, К. С. Абсатарова, А. Е. Уалиева [и др.] // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2016. – № 2. – С. 87–93.
7. Атеросклероз и эндотоксин / Ю. В. Конев, Л. Б. Лазебник, М. Ю. Яковлев, И. А. Аниховская // Клиническая геронтология. – 2004. – Т. 10, № 7. – С. 36–42.
8. Баркаган, З. С. Геморрагические мезенхимальные дисплазии: новая

классификация нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, Г. А. Суханова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2004. – № 1 (17). – С. 14–16.

9. Взаимодействие протромбина человека с тканевым тромбопластином / Д. М. Зубаиров, В. Н. Тимербаев, С. В. Киселев [и др.] // Биохимия. – 1989. – Т. 54, № 6. – С. 1046–1054.

10. Возрастные и гендерные особенности показателей системной эндотоксинемии и их взаимосвязь с общепризнанными лабораторными факторами риска атеросклероза / Д. П. Покусаева, И. А. Аниховская, Л. А. Коробкова, М. Ю. Яковлев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63. № 3. – С. 13-19.

11. Галяутдинов, Г. С. Особенности системы гемостаза у пациентов с ишемической болезнью сердца / Г. С. Галяутдинов, Е. А. Чудакова // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. 93, № 1. – С. 3–7. – doi: 10.17816/KMJ2134.

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

13. Дисбаланс гуморального звена антиэндотоксинового иммунитета как вероятный фактор патогенеза аутоиммунных заболеваний / А. И. Гордиенко, В. А. Белоглазов, А. В. Кубышкин [и др.] // Физиология человека. – 2019. – Т. 45, № 3. – С. 123–128. – doi: 10.1134/S0131164619030068.

14. Зубаиров, Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д. М. Зубаиров. – Казань : Издательство «ФЭН», 2000. – 367 с.

15. Зубаиров, Д. М. Синдром ДВС в свете теории непрерывного внутрисосудистого свертывания крови / Д. М. Зубаиров. – Казанский медицинский журнал. – 1988. – Т. 69, № 5. – С. 321.

16. Зубаиров, Д. М. Современные доказательства концепции непрерывного свертывания крови в организме / Д. М. Зубаиров // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – № 1 (41). – С. 17–21.

17. Зубаиров, Д. М. Эндотелиальные микровезикулы – посредники межклеточных взаимодействий в сосудистом секторе / Д. М. Зубаиров, Л. Д. Зубаирова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2011. – № 2 (46). – С. 6–13.
18. Исследование воздействия тиотерпеноидов пинанового ряда на систему гемостаза и функциональную активность тромбоцитов человека / М. М. Воронцова, Р. Г. Тураев, С. В. Киселев [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2014. – Т. 7, № 5. – С. 62–67.
19. Киселев, С. В. Взаимодействие фактора X человека с тканевым тромбопластином / С. В. Киселев, Д. М. Зубаиров, В. Н. Тимарбаев // Биомедицинская химия. – 2003. – Т. 49, № 5. – С. 443–452.
20. Киселев, С. В. Влияние радиационного воздействия на взаимодействие протромбина с фрагментами клеточных мембран / С. В. Киселев, Д. М. Зубаиров, С. В. Киршин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – № 11. – С. 515–518.
21. Киселев, С. В. Значение структуры клеточных мембран в иницировании свертывания крови : специальность 14.00.16 : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Киселев Сергей Васильевич. – Казань, 2005. – 231 с.
22. Кишечный фактор прогрессирования ВИЧ-инфекции / Г. Р. Хасанова, О. И. Биккинина, В. А. Анохин [и др.] // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 3. – С. 278–288. – doi: 10.31857/S0042132420030059.
23. Кишечный эндотоксин в патогенезе воспалительной патологии глаза и антиэндотоксиновая составляющая ее лечения / Я. Х. Вышегуров, И. А. Аниховская, Ю. Е. Батманов, М. Ю. Яковлев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 1. – С. 12–14.
24. Кишечный эндотоксин в регуляции активности системы гемостаза и патогенезе ДВС-синдрома / М. В. Мешков, И. А. Аниховская, М. М. Яковлева, М. Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2005. – Т. 31, № 6. – С. 91–96.
25. Клинический и фармако-экономический анализ применения различных антикоагулянтов для профилактики послеоперационных тромбозов у

онкологических больных / А. Н. Шилова, А. Ф. Лазарев, П. А. Воробьев [и др.] // Российский онкологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 34–36.

26. Микровезикулы в крови / Д. М. Зубаиров, И. А. Андрушко, Л. Д. Зубаирова [и др.] // Научные технологии. – 2005. – Т. 6, № 8-9. – С. 54–58.

27. Никитина, Л. Е. Синтез серосодержащих монотерпеноидов : специальность 02.00.03 «Органическая химия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук / Никитина Лилия Евгеньевна. – Казань, 2001. – 38 с.

28. Никитина, Л. Е. Синтез серосодержащих монотерпеноидов : специальность 02.00.03 «Органическая химия» : диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук / Никитина Лилия Евгеньевна. – Казань, 2001. – 330 с.

29. Показатели агрегационной функции тромбоцитов у больных раком молочной железы и желудочно-кишечного тракта / А. Н. Шилова, Е. Ф. Котовщикова, А. Ф. Лазарев [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, № 2 (72). – С. 72–74.

30. Показатели маркеров системного воспаления и системной эндотоксинемии у пациентов с эндогенными психозами / С. А. Зозуля, И. Н. Отман, О. А. Юнилайнен [и др.] // Патогенез. – 2020. – Т. 18, № 1. – С. 34–41. – doi: 10.25557/2310-0435.2020.01.34-41.

31. Полиреактивная трансформация иммуноглобулинов класса G как вектор поиска потенциальных средств повышения активности антиэндотоксинового иммунитета / А. И. Гордиенко, Н. В. Химич, В. А. Белоглазов [и др.] // Физиология человека. – 2020. – Т. 46, № 5. – С. 107–114. – doi: 10.31857/S0131164620040050.

32. Прогностическая значимость показателей системной эндотоксинемии в атерогенезе / Д. П. Покусаева, И. А. Аниховская, Л. А. Коробкова [и др.] // Физиология человека. – 2019. – Т. 45, № 5. – С. 99–109. – doi: 10.1134/S0131164619050138.

33. Раби, К. Локализованная и рассеянная внутрисосудистая

коагуляция / К. Раби. – Москва : Медицина, 1974. – 215 с.

34. Синтез, антиагрегационная и антикоагулянтная активность солей 2-[3-метил-8-морфолино-7-(тиетанил-3)ксантинил-1]уксусной кислоты / Е. Э. Клен, В. А. Небогатова, Л. И. Баширова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 1. – С. 23–29. – doi: 10.29296/25877313-2020-01-04.

35. Системная эндотоксинемия в патогенезе атеросклероза / Н. В. Чижилов, И. А. Аниховская, В. Г. Лиходед [и др.] // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 3. – С. 266–274.

36. Созинов, А. С. Системная эндотоксинемия в патогенезе повреждения и регенерации печени при хронических вирусных гепатитах В и С : специальность 14.00.10 «Инфекционные болезни» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Созинов Алексей Станиславович. – Санкт-Петербург, 2004. – 35 с.

37. Сопряженность процессов системного воспаления и системной эндотоксинемии при эндогенных психозах / С. А. Зозуля, И. Н. Отман, И. В. Олейчик [и др.] // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2020. – № 3 (108). – С. 17–27. – doi: 10.26617/1810-3111-2020-3(108)-17-27.

38. Сулимов, В. А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам (аспирину, клопидогрелу) у пациентов, подвергающихся elective стентированию коронарных артерий / В. А. Сулимов, Е. В. Мороз // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 23–30. – doi: 10.20996/1819-6446-2012-8-1-23-30.

39. Фаткулин, И. Ф. Наследственные и приобретенные дефекты системы гемостаза в акушерско-гинекологической практике / И. Ф. Фаткулин, Д. М. Зубаиров. – Москва : МЕДпресс-информ, 2002. – 64 с. – ISBN 5-901712-23-4.

40. Шитикова, А. С. Тромбоцитарный гемостаз / А. С. Шитикова. – Санкт-Петербург : Изд-во СПбГМУ, 2000. – 227 с.

41. Эндотоксин кишечной микрофлоры в клинике и патогенезе хронической ишемии нижних конечностей / Н. В. Чижилов, В. Г. Лиходед, А. М.

Светухин, М. Ю. Яковлев. – Пенза : Издательство ПГПУ, 2002. – 150 с.

42. Эндотоксиновая агрессия в развитии нарушений гемостаза у детей с хирургическими заболеваниями / М. В. Мешков, И. А. Аниховская, Р. А. Уразаев, М. Ю. Яковлев // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2006. – № 3. – С. 32–37.

43. Эндотоксиновая агрессия как причина послеоперационных осложнений в детской хирургии : (новые перспективы профилактики) / М. В. Мешков, Ю. К. Гатауллин, В. Б. Иванов, М. Ю. Яковлев. – Москва : Московские учебники, 2007. – 143 с. – (Новые лечебно-диагностические технологии). – ISBN 5-8443-0040-4.

44. Эндотоксиновая агрессия как универсальный фактор патогенеза расстройств гемостаза у детей с урологическими заболеваниями / М. В. Мешков, И. А. Аниховская, Ю. К. Гатауллин, М. Ю. Яковлев // Урология. – 2006. – № 1. – С. 15–19.

45. Эндотоксиновый компонент патогенеза ВИЧ-инфекции / Г. Р. Хасанова, В. А. Анохин, О. И. Биккинина, М. Ю. Яковлев // Патогенез. – 2020. – Т. 18, № 1. – С. 4–16. – doi: 10.25557/2310-0435.2020.01.4-16.

46. Эндотоксиновый компонент патогенеза хронических вирусных заболеваний / И. А. Аниховская, А. А. Кубатиев, Г. Р. Хасанова, М. Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2015. – Т. 41, № 3. – С. 118–126. – doi: 10.7868/S0131164615030029.

47. Яковлев, М. Ю. Кишечный эндотоксин и воспаление / М. Ю. Яковлев // Дерматовенерология : Национальное руководство. Краткое издание. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – С. 70–76.

48. Яковлев, М. Ю. Кишечный эндотоксин: иммунитет – воспаление – старение, как звенья одной цепи / М. Ю. Яковлев // Патогенез. – 2020. – Т. 18, № 1. – С. 82–94. – doi: 10.25557/2310-0435.2020.01.82-94.

49. Яковлев, М. Ю. Системная эндотоксинемия. Гомеостаз и общая патология / М. Ю. Яковлев. – Москва : Наука, 2021. – 184 с. – ISBN 978-5-02-040858-6.

50. Яковлев, М. Ю. Роль кишечной микрофлоры и недостаточности

барьерной функции печени в развитии эндотоксинемии и воспаления / М. Ю. Яковлев // Казанский медицинский журнал. – 1988. – Т. 69, № 5. – С. 353–358.

51. Яковлев, М. Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М. Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2003. – Т. 29. № 4. – С. 98-109.

52. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with ACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / M. Valgimigli, H. Bueno, R. A. Byrne [et al.] // Eur. Heart J. – 2018. – Vol. 39, No. 3. – P. 213–260. – doi: 10.1093/eurheartj/ehx419.

53. A role of the fast ATP-gated P2₁ cation channel in thrombosis of small arteries in vivo / B. Hechler, N. Lenain, P. Marchese [et al.] // J Exp Med. – 2003. – Vol. 198, No. 4. – P. 661–667. – doi: 10.1084/jem.20030144.

54. A smooth particle mesh ewald method / U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz [et al.] // J. Chem. Phys. – 1995. – Vol. 103. – P. 8577–8592. – doi:10.1063/1.470117.

55. Abrams, A. Clinical drug therapy: Rationale for nursing practice / A. Abrams, C. Lammon, S. Pennington. – ed. 9th. – Philadelphia, PA : Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

56. Agonist and antagonist effects of diadenosine tetraphosphate, a platelet dense granule constituent, on platelet P2Y₁, P2Y₁₂ and P2X₁ receptors / H. Chang, I. B. Yanachkov, A. D. Michelson [et al.] // Thromb Res. – 2010. – Vol. 125, No. 2. – P. 159–165. – doi: 10.1016/j.thromres.2009.11.006.

57. An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0 / A. K. Malde, L. Zuo, M. Breeze [et al.] // J Chem Theory Comput. – 2011. – Vol. 7, No. 12. – P. 4026–4037. – doi: 10.1021/ct200196m.

58. An update on P2Y₁₃ receptor signalling and function / R. Pérez-Sen, R. Gómez-Villafuertes, F. Ortega [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2017. – Vol. 1051. – P. 139–168. – doi: 10.1007/5584_2017_91.

59. Andrews, R. K. The GPIb-IX-V complex / R. K. Andrews, M. C. Berndt // In: Platelets ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press. – 2013. – P. 195–213.
60. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released / J. E Jr Italiano, J. L. Richardson, S. Patel-Hett [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 111, No. 3. – P. 1227–1233. – doi: 10.1182/blood-2007-09-113837.
61. Antifungal activity of bicyclic monoterpenoids and terpene sulfides / L. E. Nikitina, V. A. Startseva, L. Y. Dorofeeva [et al.] // Chemistry of Natural Compounds. – 2010. – Vol. 46, No. 1. – P. 28–32. – doi: 10.1007/s10600-010-9517-5.
62. Antimicrobial peptide protegrin-3 adopt an antiparallel dimer in the presence of DPC micelles: A high-resolution NMR study / K. S. Usachev, S. V. Efimov, O. A. Kolosova [et al.] // Journal of Biomolecular NMR. – 2015. – Vol. 62, No. 1. – P. 71–79. – doi: 10.1007/s10858-015-9920-0.
63. Antithrombotic effects of targeting alpha IIb beta 3 signaling in platelets / A. J. Ablooglu, J. Kang, B. G. Petrich [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113. – P. 3585–3592. – doi: 10.1182/blood-2008-09-180687.
64. Arnold, D. P. Aromatic ring currents illustrated-NMR spectra of tin (IV) porphyrin complexes: an advanced undergraduate experiment / D. P. Arnold // J. Chem. Educ. – 1988. – Vol. 65, No. 12. – P. 1111. – doi: <https://doi.org/10.1021/ed065p1111>.
65. AutoDock4 andAutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom [et al.] // J. Comput. Chem. – 2009. – Vol. 30. – P. 2785–2791. – doi: 10.1002/jcc.21256.
66. Bannwarth, C. A simplified time-dependent density functional theory approach for electronic ultraviolet and circular dichroism spectra of very large molecules / C. Bannwarth, S. Grimme // Comput. Theor. Chem. – 2014. – Vol. 1040. – P. 45–53. – doi: 10.1016/j.comptc.2014.02.023.
67. Bessis, M. Living blood cells and their ultrastructure / M. Bessis. – New York : Springer-Verlag, 1973. – 767 p.

68. Bevers, E. M. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane / E. M. Bevers, P. L. Williamson // *Physiol Rev.* – 2016. – Vol. 96. – P. 605–645. – doi: 10.1152/physrev.00020.2015.
69. BF₃-catalyzed addition of thiols to (+)-camphene / A. V. Bodrov, L. E. Nikitina, V. A. Startseva [et al.] // *Russ J Gen Chem.* – 2013. – Vol. 83, No. 1. – P. 80–86.
70. Biousse, V. The coagulation system / V. Biousse // *J Neuroophthalmol.* – 2003. – Vol. 23, No. 1. – P. 50–62. – doi: 10.1097/00041327-200303000-00011.
71. Bodin, S. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes / S. Bodin, H. Tronchère, B. Payrastre // *Biochim Biophys Acta.* – 2003. – Vol. 1610, No. 2. – P. 247–257. – doi: 10.1016/s0005-2736(03)00022-1.
72. Born, G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G. V. Born // *Nature.* – 1962. – Vol. 194. – P. 927–929. – doi: 10.1038/194927b0.
73. Borst, O. Glycoprotein VI – novel target in antiplatelet medication / O. Borst, M. Gawaz // *Pharmacol Ther.* – 2021. – Vol. 217. – P. 107630. – doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107630.
74. Brewer, D. B. Max Schultze (1865), G. Bizzozzero (1882) and the discovery of the platelet / D. B. Brewer // *Br J Haematol.* – 2006. – Vol. 133, No. 3. – P. 251–258. – doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x.
75. Brodsky, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / R. A. Brodsky // *Blood.* – 2014. – Vol. 124. – P. 2804–2811. – doi: 10.1182/blood-2014-02-522128.
76. Brown, D. A. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts / D. A. Brown, E. London // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 17221–17224. – doi: 10.1074/jbc.R000005200.
77. Butenas, S. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? / S. Butenas, T. Orfeo, K. G. Mann // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – Vol. 29, No. 12. – P. 1989–1996. – doi: 10.1161/ATVBAHA.108.177402.
78. cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC

phosphatase signaling pathway / A. Aburima, K. S. Wraith, Z. Raslan [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122, No. 20. – P. 3533–3545. – doi: 10.1182/blood-2013-03-487850.

79. Castaman, G. A bleeding disorder characterised by isolated deficiency of platelet microvesicle generation / G. Castaman, L. Yu-Feng, F. Rodeghiero // *Lancet Lond Engl*. – 1996. – Vol. 347. – P. 700–701.

80. Cattaneo, M. P2Y₁₂ receptors: structure and function / M. Cattaneo // *J Thromb Haemost*. – 2015. – Vol. 13, Suppl. 1. – P. S10–16. – doi: 10.1111/jth.12952.

81. Cattaneo, M. The platelet P2 receptors / M. Cattaneo // In: *Platelets* ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press. – 2013. – P. 261–281.

82. cGMP signaling inhibits platelet shape change through regulation of the RhoA-Rho Kinase-MLC phosphatase signaling pathway / A. Aburima, K. Walladbegi, J. D. Wake, K. M. Naseem // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2017. – Vol. 15, No. 8. – P. 1668–1678. – doi: 10.1111/jth.13738.

83. Characterization of sodium dodecylsulphate and dodecylphosphocholine mixed micelles through NMR and dynamic light scattering / G. Manzo, M. Carboni, A. C. Rinaldi [et al.] // *Magn. Reson. Chem*. – 2013. – Vol. 51, No. 3. – P. 176–183. – doi: 10.1002/mrc.3930.

84. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions / J. A. Coppinger, G. Cagney, S. Toomey [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103, No. 6. – P. 2096–2104. – doi: 10.1182/blood-2003-08-2804.

85. Chee, Y. L. Coagulation / Y. L. Chee // *J R Coll Physicians Edinb*. – 2014. – Vol. 44, No. 1. – P. 42–45. – doi: 10.4997/JRCPE.2014.110.

86. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens / M. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, J. Hadian [et al.] // *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*. – 2006. – Vol. 71, No. 3. – P. 1327–1333.

87. Circulating microparticles alter formation, structure, and properties of fibrin clots / L. D. Zubairova, R. M. Nabiullina, C. Nagaswami [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 17611. – doi: 10.1038/srep17611.
88. Clemetson, K. J. Platelet receptors / K. J. Clemetson, J. M. Clemetson // In: *Platelets* ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press. – 2013. – P. 169–194.
89. Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for acute minor ischaemic stroke or high risk transient ischaemic attack: systematic review and meta-analysis / Q. Hao, M. Tampi, M. O'Donnell [et al.] // *BMJ.* – 2018. – Vol. 18, No. 363. – P. k5108. – doi: 10.1136/bmj.k5108.
90. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19 / M. Levi, J. Thachil, T. Iba, J. H. Levy // *Lancet Haematol.* – 2020. – Vol. 7. – P. e438–e440. – doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
91. Coagulopathy in COVID-19 / T. Iba, J. H. Levy, M. Levi, J. Thachil // *J Thromb Haemost.* – 2020. – Vol. 18, No. 9. – P. 2103–2109. – doi: 10.1111/jth.14975.
92. Collaborative metaanalysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients / C. Baigent, C. Sudlow, R. Collins, R. Peto // *BMJ.* – 2002. – Vol. 324, No. 7329. – P. 71–86. – doi: 10.1136/bmj.324.7329.71.
93. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles / G. Tans, J. Rosing, M. C. Thomassen [et al.] // *Blood.* – 1991. – Vol. 77. – P. 2641–2648.
94. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome / E. Castoldi, P. W. Collins, P. L. Williamson, E. M. Bevers // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 4399–4400. – doi: 10.1182/blood-2011-01-332502.
95. Contact-and agonist-regulated microvesiculation of human platelets / Y. Zhang, X. Liu, L. Liu [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2013. – Vol. 110. – P. 331–399. – doi: 10.1160/TH12-11-0853.
96. Custodio-Chablé, S. J. Platelet activation as a trigger factor for inflammation and atherosclerosis / S. J. Custodio-Chablé, R. A. Lezama, E. Reyes-

Maldonado // *Cir Cir.* – 2020. – Vol. 88, No. 2. – P. 233–243. – doi: 10.24875/CIRU.19000725.

97. De Candia, E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history / E. De Candia // *Thromb Res.* – 2012. – Vol. 129, No. 3. – P. 250–256. – doi: 10.1016/j.thromres.2011.11.001.

98. De Gaetano, G. Platelet adhesion and aggregation and fibrin formation in flowing blood: a historical contribution by Giulio Bizzozero / G. de Gaetano, C. Cerletti // *Platelets.* – 2002. – Vol. 13, No. 2. – P. 85–89. – doi: 10.1080/09537100220122457.

99. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential / M. Zahid, S. Loyau, M. Bouabdelli [et al.] // *Anal Biochem.* – 2011. – Vol. 417, No. 2. – P. 274–282. – doi: 10.1016/j.ab.2011.06.036.

100. Detection of P2Y (14) protein in platelets and investigation of the role of P2Y (14) in platelet function in comparison with the EP (3) receptor / N. Dovlatova, Y. D. Wijeyeratne, S. C. Fox [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2008. – Vol. 100, No. 2. – P. 261–270.

101. Determination of the disulfide bridges in factor Va heavy chain / J. Xue, M. Kalafatis, J. R. Silveira [et al.] // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33, No. 44. – P. 13109–13116. – doi: 10.1021/bi00248a021.

102. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking / G. Jones, P. Willett, R. C. Glen [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 267, No. 3. – P. 727–748. – doi: 10.1006/jmbi.1996.0897.

103. Development of approaches to the study of the interaction of biologically active thioterpenoids with model membranes / L. E. Nikitina, S. V. Kiselev, A. V. Bodrov [et al.] // *BioNanoScience.* – 2017. – Vol. 7, No. 4. – P. 600–607. – doi: 10.1007/s12668-017-0432-0.

104. Differential involvement of the P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors in platelet procoagulant activity / C. Leon, C. Ravanat, M. Freund [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – Vol. 23, No. 10. – P. 1941–1947. – doi: 10.1161/01.ATV.0000092127.16125.E6.

105. Dorsam, R. T. Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets / R. T. Dorsam, M. Tuluc, S. P. Kunapuli // *J Thromb Haemost.* – 2004. – Vol. 2, No. 5. – P. 804–812. – doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00692.x.
106. Dowal, L. Targeting platelet G-protein coupled receptors (GPCRs): looking beyond conventional GPCR antagonism / L. Dowal, R. Flaumenhaft // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2011. – Vol. 8, No. 2. – P. 140–154. – doi: 10.2174/157016110790886938.
107. Dynamic redistribution of glycoprotein Ib/IX on surface-activated platelets. A second look / J. G. White, M. D. Krumwiede, D. J. Cocking-Johnson, G. Escolar // *Am J Pathol.* – 1995. – Vol. 147, No. 4. – P. 1057–1067.
108. Effect of membrane fluidity and fatty acid composition on the prothrombin converting activity of phospholipids vesicles / J. W. P. Govers-Riemslog, M. P. Janssen, R. F. A. Zwaal, J. Rosing // *Biochemistry.* – 1992. – Vol. 31, No. 41. – P. 10000–10008. – doi: 10.1021/bi00156a020.
109. Effects of food and gender on pharmacokinetics of ticagrelor and its main active metabolite AR-C124910XX in healthy Chinese subjects / W. Feng, D. Liu, Y. Wang [et al.] // *Int J Clin Pharmacol Ther.* – 2018. – Vol. 56, No. 8. – P. 372–380. – doi: 10.5414/CP203220.
110. Efficacy and safety of alternative oral administrations of P2Y₁₂-receptor inhibitors: Systematic review and meta-analysis / M. Serenelli, R. Pavasini, F. Vitali [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2019. – Vol. 17, No. 6. – P. 944–950. – doi: 10.1111/jth.14434.
111. Elbatarny, H. S. Leptin-mediated activation of human platelets: Involvement of a leptin receptor and phosphodiesterase 3A-containing cellular signaling complex / H. S. Elbatarny, D. H. Maurice // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* – 2005. – Vol. 289, No. 4. – P. E695–E702. – doi: 10.1152/ajpendo.00125.2005.

112. Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state / A. E. Michelsen, A. T. Notø, E. Brodin [et al.] // *Thromb Res.* – 2009. – Vol. 123, No. 6. – P. 881–886. – doi: 10.1016/j.thromres.2008.10.016.

113. Engelmann, B. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity / B. Engelmann, S. Massberg // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 13, No. 1. – P. 34–45. – doi: 10.1038/nri3345.

114. Escolar, G. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension / G. Escolar, M. Krumwiede, J. G. White // *Am J Pathol.* – 1986. – Vol. 123, No. 1. – P. 86–94.

115. Escolar, G. The platelet open canalicular system: a final common pathway / G. Escolar, J. G. White // *Blood Cells.* – 1991. – Vol. 17, No. 3. – P. 467–485, discussion P. 486–495.

116. Evidence that integrin alpha IIb beta 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation / T. Oki, K. Eto, K. Izawa [et al.] // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284, No. 45. – P. 31463–31472. – doi: 10.1074/jbc.M109.030213.

117. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration / N. Arraud, R. Linares, S. Tan [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2014. – Vol. 12, No. 5. – P. 614–627. – doi: 10.1111/jth.12554.

118. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin / F. A. Baglia, K. O. Badellino, C. Q. Li [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, No. 3. – P. 1662–1668.

119. FLOW-Induced PROtrusions (FLIPRs) a platelet-derived platform for the retrieval of microparticles by monocytes and neutrophils / C. Tersteeg, H. F. Heijnen, A. Eckly [et al.] // *Circ Res.* – 2014. – Vol. 114, No. 5. – P. 780–791. – doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302361.

120. Gachet, C. Platelet purinergic receptors in thrombosis and inflammation / C. Gachet, B. Hechler // *Hamostaseologie.* – 2020. – Vol. 40, No. 2. – P. 145–152. – doi: 10.1055/a-1113-0711.

121. Gailani, D. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis / D. Gailani, T. Renné // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2007. – Vol. 27, No. 12. – P. 2507–2513. – doi: 10.1161/ATVBAHA.107.155952/
122. Gardiner, C. Impact of haemostatic mechanisms on pathophysiology of preeclampsia / C. Gardiner, M. Vatish // *Thromb Res.* – 2017. – Vol. 151, Suppl. 1. – P. S48–S52. – doi: 10.1016/S0049-3848(17)30067-1.
123. Gay, L. J. Contribution of platelets to tumour metastasis / L. J. Gay, B. Felding-Habermann // *Nat Rev Cancer.* – 2011. – Vol. 11, No. 2. – P. 123–134. – doi: 10.1038/nrc3004.
124. Ge, S. Quantitative and real-time detection of secretion of chemical messengers from individual platelets / S. Ge, N. J. Wittenberg, C. L. Haynes // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47, No. 27. – P. 7020–7024. – doi: 10.1021/bi800792m.
125. Gleissner, C. A. Platelet chemokines in vascular disease / C. A. Gleissner, P. von Hundelshausen, K. Ley // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – Vol. 28, No. 11. – P. 1920–1927. – doi: 10.1161/ATVBAHA.108.169417.
126. Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets / O. Berlanga, T. Bori-Sanz, J. R. James [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2007. – Vol. 5, No. 5. – P. 1026–1033. – doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02449.x.
127. Golino, P. How to study the effects of platelet aggregation and thrombosis on coronary vasomotion and their clinical relevance / P. Golino, F. Crea, J. T. Willerson // *Ital Heart J.* – 2002. – Vol. 3, No. 4. – P. 220–225.
128. GPIIb/IIIa-selective activation of platelets induces platelet signaling events comparable to GPVI activation events / E. E. Gardiner, J. F. Arthur, Y. Shen [et al.] // *Platelets.* – 2010. – Vol. 21, No. 4. – P. 244–252. – doi: 10.3109/09537101003695339.
129. Gremmel, T. Platelet Physiology / T. Gremmel, A. L. Frelinger, A. D. Michelson // *Semin Thromb Hemost.* – 2016. – Vol. 42, No. 3. – P. 191–204. – doi: 10.1055/s-0035-1564835.
130. Hansson, K. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation / K. Hansson, J. Stenflo // *J Thromb Haemost.* – 2005. – Vol. 3, No. 12. – P. 2633–2648. – doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01478.x.

131. Hargett, L. A. On the origin of microparticles: From «platelet dust» to mediators of intercellular communication / L. A. Hargett, N. N. Bauer // *Pulm Circ.* – 2013. – Vol. 3, No. 2. – P. 329–340. – doi: 10.4103/2045-8932.114760.
132. Hartwig, J. H. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments / J. H. Hartwig // *J Cell Biol.* – 1991. – Vol. 112, No. 3. – P. 407–425. – doi: 10.1083/jcb.112.3.407.
133. Hechler, B. Purinergic receptors in thrombosis and inflammation / B. Hechler, C. Gachet // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2015. – Vol. 35, No. 11. – P. 2307–2315. – doi: 10.1161/ATVBAHA.115.303395.
134. Hegyi, E. Immunogold probing of platelet factor 4 in different ploidy classes of rat megakaryocytes sorted by flow cytometry / E. Hegyi, L. K. Heilbrun, A. Nakeff // *Exp Hematol.* – 1990. – Vol. 18, No. 7. – P. 789–793.
135. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes / F. A. Ruiz, C. R. Lea, E. Oldfield, R. Docampo // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, No. 43. – P. 44250–44257. – doi: 10.1074/jbc.M406261200.
136. Humphrey, W. VMD: visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // *J Mol Graph.* – 1996. – Vol. 14, No. 1. – P. 33–38. – doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
137. Immuno-analysis of microparticles: probing at the limits of detection / S. L. Latham, N. Tiberti, N. Gokoolparsadh [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 16314. – doi: 10.1038/srep16314.
138. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform / B. Jr. Nagy, K. Bhavaraju, T. Getz [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, No. 11. – P. 2557–2567. – doi: 10.1182/blood-2008-07-169268.
139. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation / F. Swieringa, H. M. Spronk, J. W. Heemskerk, P. E. van der Meijden // *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis.* – 2018. – Vol. 2, No. 3. – P. 450–460. – doi: 10.1002/rth2.12107.

140. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ / K. Bledzka, M. M. Pesho, Y. Q. Ma, E. F. Plow // In: Platelets ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press. – 2013. – P. 233–248.
141. Interaction models for water in relation to protein hydration / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, J. Hermans // Intermolecular Forces ; editor B. Pullman. – D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1981. – P. 331–342.
142. Interaction of different statins with model membranes by NMR data / L. F. Galiullina, O. V. Aganova, I. A. Latfullin [et al.] // Biochim Biophys Acta. – Biomembranes. – 2017. – Vol. 1859, No. 3. – P. 295–300. – doi: 10.1016/j.bbamem.2016.12.006.
143. Interaction of statins with phospholipid bilayers studied by solid-state NMR spectroscopy / L. F. Galiullina, H. A. Scheidt, D. Huster [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2019. – Vol. 1861, No. 3. – P. 584–593. – doi: 10.1016/J.BBAMEM.2018.12.013.
144. Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation / H. Suzuki, K. Murasaki, K. Kodama, H. Takayama // Br J Haematol. – 2003. – Vol. 121, No. 6. – P. 904–912.
145. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy / H. A. Scheidt, A. Pampel, L. Nissler [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2004. – Vol. 1663, No. 1–2. – P. 97–107. – doi: 10.1016/J.BBAMEM.2004.02.004.
146. Kaur, R. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies / R. Kaur, M. Kaur, J. Singh // Cardiovasc Diabetol. – 2018. – Vol. 17, No. 1. – P. 121. – doi: 10.1186/s12933-018-0763-3.
147. Khodadi, E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules / E. Khodadi // Cardiovasc Toxicol. – 2020. – Vol. 20, No. 1. – P. 1–10. – doi: 10.1007/s12012-019-09555-4.
148. Khodov, I. A. Accuracy of Determination of Self-Diffusion Coefficients in Studies of Porphyrin-Based Complexes by 2D DOSY / I. A. Khodov //

Macroheterocycles. – 2017. – Vol. 10, No. 3. – P. 313–316. – doi: 10.6060/mhc170200k.

149. Kim, S. P2Y₁₂ receptor in platelet activation / S. Kim, S. P. Kunapuli // Platelets. – 2011. – Vol. 22, No. 1. – P. 54–58. – doi: 10.3109/09537104.2010.497231.

150. King, S. M. Development of platelet secretory granules / S. M. King, G. L. Reed // Semin Cell Dev Biol. – 2002. – Vol. 13, No. 4. – P. 293–302. – doi: 10.1016/s1084952102000599.

151. Komatsuya, K. Function of Platelet Glycosphingolipid Microdomains/Lipid Rafts / K. Komatsuya, K. Kaneko, K. Kasahara // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21, No. 15. – P. 5539. – doi: 10.3390/ijms21155539.

152. Koupenova-Zamor, M. Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity / M. Koupenova-Zamor, K. Ravid // Front. Pharmacol. – 2018. – Vol. 9. – P. 37. – doi: 10.3389/fphar.2018.00037.

153. L. Caillon, O. Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation / L. Caillon, O. Lequin, L. Khemtémourian // Biochim Biophys Acta. – 2013. – Vol. 1828, No. 9. – P. 2091–2098. – doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.014.

154. Leger, A. J. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases / A. J. Leger, L. Covic, A. Kuliopulos // Circulation. – 2006. – Vol. 114, No. 10. – P. 1070–1077. – doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.574830.

155. Linden, M. D. Platelets: Pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis / M. D. Linden, D. E. Jackson // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2010. – Vol. 42, No. 11. – P. 1762–1766. – doi: 10.1016/j.biocel.2010.07.012.

156. MacKerell, Jr A. D. Molecular dynamics simulation analysis of a sodium dodecyl sulfate micelle in aqueous solution: decreased fluidity of the micelle hydrocarbon interior / Jr A. D. MacKerell // Journal of Physical Chemistry. – 1995. – Vol. 99, No. 7. – P. 1846–1855. – doi: 10.1021/j100007a011.

157. Mackman, N. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis / N. Mackman, R. E. Tilley, N. S. Key // Arterioscler

Thromb Vasc Biol. – 2007. – Vol. 27, No. 8. – P. 1687–1693. – doi: 10.1161/ATVBAHA.107.141911.

158. Mäler, L. Artificial Membrane Models for the Study of Macromolecular Delivery / L. Mäler, A. Gräslund // *Macromolecular Drug Delivery*. – 2009. – P. 129–139.

159. McCabe, M. A. Fast-Fourier-transform depacking / M. A. McCabe, S. R. Wassall // *J. Magn. Reson. Ser. B*. – 1995. – Vol. 106, No. 1. – P. 80–82. – doi: 10.1006/jmrb.1995.1013.

160. Mean platelet volume and coronary artery disease / K. Pafili, T. Penlioglou, D. P. Mikhailidis, N. Papanas // *Curr Opin Cardiol*. – 2019. – Vol. 34, No. 4. – P. 390–398. – doi: 10.1097/HCO.0000000000000624.

161. Mean platelet volume in type 2 diabetes mellitus / T. A. Kodiatte, U. K. Manikyam, S. B. Rao [et al.] // *J Lab Physicians*. – 2012. – Vol. 4, No. 1. – P. 5–9. – doi: 10.4103/0974-2727.98662.

162. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles / R. Flaumenhaft, J. R. Dilks, J. Richardson [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, No. 5. – P. 1112–1121.

163. Michelson, A. D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease / A. D. Michelson // *Nat Rev Drug Discov*. – 2010. – Vol. 9, No. 2. – P. 154–169. – doi: 10.1038/nrd2957.

164. Milner, E. P. Ristocetin-mediated interaction of human von Willebrand factor with platelet glycoprotein Ib evokes a transient calcium signal: observations with Fura-PE3 / E. P. Milner, Q. Zheng, J. C. Kermode // *J. Lab. Clin. Med*. – 1998. – Vol. 131, No. 1. – P. 49–62. – doi: 10.1016/s0022-2143(98)90077-4.

165. Mitochondrial damage-associated molecular patterns as potential proinflammatory mediators in post-platelet transfusion adverse effects / K. Yasui, N. Matsuyama, A. Kuroishi [et al.] // *Transfusion (Paris)*. – 2016. – Vol. 56, No. 5. – P. 1201–1212. – doi: 10.1111/trf.13535.

166. Molecular dynamics with coupling to an external bath / J. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren [et al.] // *J. Chem. Phys.* – 1984. – Vol. 81. – P. 3684–3690. – doi: 10.1063/1.448118.

167. Morris, K. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy / K. Morris, C. Jr. Johnson // *J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – Vol. 114, No. 8. – P. 3139–3141. – doi: 10.1021/ja00034a071.

168. Mutations in the coflin partner Aip1/Wdr1 cause autoinflammatory disease and macrothrombocytopenia / B. T. Kile, A. D. Panopoulos, R. A. Stirzaker [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, No. 7. – P. 2371–2380. – doi: 10.1182/blood-2006-10-055087.

169. Myers, K. A review on the new and old anticoagulants / K. Myers, A. Lyden // *Orthop Nurs.* – 2019. – Vol. 38, No. 1. – P. 43–52. – doi: 10.1097/NOR.0000000000000517.

170. Nagata, S. Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure / S. Nagata, T. Sakuragi, K. Segawa // *Curr Opin Immunol.* – 2020. – Vol. 62. – P. 31–38. – doi: 10.1016/j.coi.2019.11.009.

171. New oral anticoagulants: Their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events / Y. H. Mekaj, A. Y. Mekaj, S. B. Duci [et al.] // *Therapeutics and Risk Management*. – 2015. – Vol. 11. – P. 967–977. – doi:10.2147/TCRM. S84210.

172. Nording, H. Platelets as therapeutic targets to prevent atherosclerosis / H. Nording, L. Baron, H. F. Langer // *Atherosclerosis*. – 2020. – Vol. 307. – P. 97–108. – doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.018.

173. Novel assay demonstrates that coronary artery disease patients have heightened procoagulant platelet response / L. Pasalic, E. Wing-Lun, J. K. Lau [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2018. – Vol. 16. – P. 1198–210. – doi: 10.1111/jth.14008.

174. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights / D. Pastori, P. Pignatelli, R. Carnevale, F. Violi // *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. – 2015. – Vol. 120. – P. 50–55. – doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.010.

175. Nurden, A. T. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease / A. T. Nurden, P. Nurden // *Blood Rev.* – 2007. – Vol. 21, No. 1. – P. 21–36. – doi: 10.1016/j.blre.2005.12.003.
176. Odonkor, P. N. Patients with ischemic heart disease / P. N. Odonkor, A. M. Grigore // *Med Clin North Am.* – 2013. – Vol. 97, No. 6. – P. 1033–1050. – doi: 10.1016/j.mcna.2013.05.006.
177. Oligomerization of the antimicrobial peptide Protegrin-5 in a membrane-mimicking environment. Structural studies by high-resolution NMR spectroscopy / K. S. Usachev, O. A. Kolosova, E. A. Klochkova [et al.] // *European Biophysics Journal.* – 2017. – Vol. 46, No. 3. – P. 293–300. – doi: 10.1007/s00249-016-1167-5.
178. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin / M. Nakanishi-Matsui, Y. W. Zheng, D. J. Sulciner [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 404, No. 6778. – P. 609–613. – doi: 10.1038/35007085.
179. Paris-Trousseau syndrome platelets in a child with Jacobsen's syndrome / L. Krishnamurti, J. P. Neglia, R. Nagarajan [et al.] // *Am J Hematol.* – 2001. – Vol. 66, No. 4. – P. 295–299. – doi: 10.1002/ajh.1061.
180. Platelet activation is associated with hypoadiponectinemia and carotid atherosclerosis / T. Shoji, H. Koyama, S. Fukumoto [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2006. – Vol. 188, No. 1. – P. 190–195. – doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.034.
181. Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications / K. Koltai, G. Kesmarky, G. Feher [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18, No. 8. – P. 1803. – doi: 10.3390/ijms18081803.
182. Platelet factor 4 (PF-4)-induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4-mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase / B. Kasper, E. Brandt, S. Bulfone-Paus, F. Petersen // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, No. 5. – P. 1602–1610. – doi: 10.1182/blood-2003-08-2802.
183. Platelet function in preeclampsia – a systematic review and meta-analysis / C. Jakobsen, J. B. Larsen, J. Fuglsang, A. M. Hvas // *Platelets.* – 2019. – Vol. 30, No. 5. – P. 549–562. – doi: 10.1080/09537104.2019.1595561.

184. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage / B. Ho-Tin-Noé, T. Goerge, S. M. Cifuni [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, No. 16. – P. 6851–6858. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0718.

185. Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction / A. B. Hartopo, I. Puspitawati, P. P. R. Gharini, B. Y. Setianto // *Arch Med Sci AMS.* – 2016. – Vol. 12, No. 3. – P. 529–537. – doi: 10.5114/aoms.2016.59926.

186. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium / S. F. Mause, P. von Hundelshausen, A. Zerneck [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – Vol. 25, No. 7. – P. 1512–1518. – doi: 10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37.

187. Platelet microvesicles in health and disease / I. Melki, N. Tessandier, A. Zufferey, E. Boilard // *Platelets.* – 2017. – Vol. 28, No. 3. – P. 214–221. – doi: 10.1080/09537104.2016.1265924.

188. Platelet P2Y₁₂ receptors enhance signalling towards procoagulant activity and thrombin generation. A study with healthy subjects and patients at thrombotic risk / P. E. van der Meijden, M. A. Feijge, P. L. Giesen [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2005. – Vol. 93, No. 6. – P. 1128–1136. – doi: 10.1160/TH04-09-0597.

189. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo / F. Müller, N. J. Mutch, W. A. Schenk [et al.] // *Cell.* – 2009. – Vol. 139, No. 6. – P. 1143–1156. – doi: 10.1016/j.cell.2009.11.001.

190. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression / O. Gidlöf, M. van der Brug, J. Ohman [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 121, No. 19. – P. 3908–3917. – doi: 10.1182/blood-2012-10-461798.

191. Platelets and cancer / G. F. Nash, L. F. Turner, M. F. Scully, A. K. Kakkar // *Lancet Oncol.* – 2002. – Vol. 3, No. 7. – P. 425–430. – doi: 10.1016/S1470-2045(02)00789-1.

192. Platelets at work in primary hemostasis / K. Broos, H. B. Feys, F.D. Meyer [et al.] // *Blood Rev.* – 2011. – Vol. 25, No. 4. – P.155–167. – doi: 10.1016/j.blre.2011.03.002.
193. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus / K. Echtler, K. Stark, M. Lorenz [et al.] // *Nat Med.* – 2010. – Vol. 16, No. 1. – P. 75–82. – doi: 10.1038/nm.2060.
194. Platelets, inflammation and atherosclerosis / S. Lindemann, B. Krämer, P. Seizer, M. Gawaz // *J Thromb Haemost.* – 2007. – Vol. 5, Suppl. 1. – P. 203–211. – doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02517.x.
195. Pollitt, A. Y. GPVI and CLEC-2 / A. Y. Pollitt, C. E. Hughes, S. P. Watson // In: *Platelets* ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press. – 2013. – P. 215–231.
196. Preeclampsia: maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors / T. Tomimatsu, K. Mimura, S. Matsuzaki [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, No. 17. – P. 4246. – doi: 10.3390/ijms20174246.
197. Preventing platelet-derived microparticle formation- and possible side effects-with prestorage leukofiltration of whole blood / A. Sugawara, K. E. Nollet, K. Yajima [et al.] // *Arch Pathol Lab Med.* – 2010. – Vol. 134. – P. 771–775.
198. Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia / M. T. Álvarez-Román, I. Fernández-Bello, V. Jiménez-Yuste [et al.] // *Br J Haematol.* – 2016. – Vol. 175, No. 5. – doi:10.1111/bjh.14412.
199. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry / D. M. Maynard, H. F. Heijnen, M. K. Horne [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2007. – Vol. 5, No. 9. – P. 1945–1955. – doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02690.x.
200. Raposo, G. Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialization / G. Raposo, M. S. Marks, D. F. Cutler // *Curr Opin Cell Biol.* – 2007. – Vol. 19, No. 4. – P. 394–401. – doi: 10.1016/j.ceb.2007.05.001.

201. Reaction of β -pinene and thiols in the presence of Lewis acids / L. E. Nikitina, V. A. Startseva, S. A. Dieva [et al.] // Chemistry of Natural Compounds. – 2006. – Vol. 42, No. 2. – P. 178–181. – doi: 10.1007/s10600-006-0072-z.
202. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system / G. M. J. Barca, C. Bertoni, L. Carrington [et al.] // Chem. Phys. – 2020. – Vol. 152. – P. 154102. – doi: 10.1063/5.0005188.
203. Reciprocal cross-talk between P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors at the level of calcium signaling in human platelets / A. R. Hardy, M. L. Jones, S. J. Mundell, A. W. Poole // Blood. – 2004. – Vol. 104, No. 6. – P. 1745–1752. – doi: 10.1182/blood-2004-02-0534.
204. Reddy, E. C. Procoagulant Phosphatidylserine-Exposing Platelets in vitro and in vivo / E. C. Reddy, M. L. Rand // Front Cardiovasc Med. – 2020. – Vol. 7. – P. 15. – doi: 10.3389/fcvm.2020.00015.
205. Rhee, M.-J. Laser-induced europium (III) luminescence as a probe of the metal ion mediated association of human prothrombin with phospholipids / M.-J. Rhee, W. Horrocks, D. P. Kosow // Biochemistry. – 1982. – Vol. 21, No. 19. – P. 4524–4528.
206. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation / M. R. Patel, K. W. Mahaffey, J. Garg [et al.] // N Engl J Med. – 2011. – Vol. 365, No. 10. – P. 883–891. – doi: 10.1056/NEJMoA1009638.
207. Rucker, D. Physiology, Thromboxane A2 / D. Rucker, A. S. Dhamoon // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2021.
208. Semple, J. W. Platelets and the immune continuum / J. W. Semple, J. E. Italiano, J. Freedman // Nat Rev Immunol. – 2011. – Vol. 11, No. 4. – P. 264–274. – doi: 10.1038/nri2956.
209. Sepúlveda, C. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis / C. Sepúlveda, I. Palomo, E. Fuentes // Mech Ageing Dev. – 2017. – Vol. 164. – P. 91–99. – doi: 10.1016/j.mad.2017.04.011.
210. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome / P. Nurden, M. Jandrot-Perrus, R. Combrié [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 104, No. 1. – P. 107–114. – doi: 10.1182/blood-2003-11-3842.

211. Sheldrake, H. M. Function and antagonism of beta3 integrins in the development of cancer therapy / H. M. Sheldrake, L. H. Patterson // *Curr Cancer Drug Targets*. – 2009. – Vol. 9, No. 4. – P. 519–540. – doi: 10.2174/156800909788486713.

212. Slungaard, A. Platelet factor 4: a chemokine enigma / A. Slungaard // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2005. – Vol. 37, No. 6. – P. 1162–1167. – doi: 10.1016/j.biocel.2004.12.003

213. Spatial structure, thermodynamics and kinetics of formation of hydrazones derived from pyridoxal 5'-phosphate and 2-furoic, thiophene-2-carboxylic hydrazides in solution / G. A. Gamov, M. N. Zavalishin, T. R. Usacheva [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – Vol. 283. – P. 825–833. – doi: 10.1016/j.molliq.2019.03.125.

214. Statland, B. E. Uptake of calcium by platelet relaxing factor / B. E. Statland, B. M. Heagan, J. G. White // *Nature*. – 1969. – Vol. 223, No. 5205. – P. 521–522. – doi: 10.1038/223521a0.

215. Structural details on the interaction of biologically active sulfur-containing monoterpenoids with lipid membranes / L. E. Nikitina, V. A. Startseva, S. V. Kiselev [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2020. – Vol. 301. – P. 112366. – doi: 10.1016/j.molliq.2019.112366.

216. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces / J. Zhu, B. H. Luo, T. Xiao [et al.] // *Mol Cell*. – 2008. – Vol. 32, No. 6. – P. 849–861. – doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.018.

217. Sulfur-containing derivatives of mono- and bicyclic natural monoterpenoids / G. Y. Ishmurov, M. P. Yakovleva, A. G. Tolstikov [et al.] // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2014. – Vol. 50, No. 1. – P. 23–47. – doi: 10.1007/s10600-014-0862-7.

218. 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, V. A. Startseva [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 116. – doi: 10.3389/fphar.2018.00116.

219. Synthesis and antifungal activity of monoterpenoids of the carane series / L. E. Nikitina, V. A. Startseva, N. P. Artemova [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2012. – Vol. 45, No. 11. – P. 664–667. – doi: 10.1007/s11094-012-0699-y.
220. Synthesis and anti-inflammatory and antipyretic activity of 2-(1'-hydroxy-4'-isopropenyl-1'-methylcyclohexyl-2'-thio)-methylethanoate / L. E. Nikitina, I. V. Akulina, R. S. Garaev [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2012. – Vol. 46, No. 1. – P. 20–22. – doi: 10.1007/s11094-012-0727-y.
221. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion / R. Flaumenhaft, J. R. Dilks, N. Rozenvayn [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, No. 10. – P. 3879–3887. – doi: 10.1182/blood-2004-04-1392.
222. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation / E. Brandt, F. Petersen, A. Ludwig [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2000. – Vol. 67, No. 4. – P. 471–478. – doi: 10.1002/jlb.67.4.471.
223. The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β -AMP-activated protein kinase- α 1 pathway regulates phosphorylation of cytoskeletal targets in thrombin-stimulated human platelets / M. B. Onselaer, C. Oury, R. Hunter [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 12, No. 6. – P. 973–986. – doi: 10.1111/jth.12568.
224. The coagulation factors fibrinogen, thrombin, and factor XII in inflammatory disorders – a systematic review / K. Göbel, S. Eichler, H. Wiendl [et al.] // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 26, No. 9. – P. 1731. – doi: 10.3389/fimmu.2018.01731.
225. The effect of exposure to long working hours on ischaemic heart disease: A systematic review and meta-analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury / J. Li, F. Pega, Y. Ujita [et al.] // *Environ Int*. – 2020. – Vol. 142. – P. 105739. – doi: 10.1016/j.envint.2020.105739.
226. The interaction of sorafenib and regorafenib with membranes is modulated by their lipid composition/ I. Haralampiev, H. A. Scheidt, T. Abel, M. Luckner [et al.] //

Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1858, No. 11. – P. 2871–2881. – doi: 10.1016/J.BBAMEM.2016.08.014.

227. The platelet ATP and ADP receptors / C. Oury, E. Toth-Zsamboki, J. Vermeylen, M. F. Hoylaerts // Curr Pharm Des. – 2006. – Vol. 12, No. 7. – P. 859–875. – doi: 10.2174/138161206776056029.

228. The tail of integrins, talin, and kindlins / M. Moser, K. R. Legate, R. Zent, R. Fassler // Science. – 2009. – Vol. 324. – P. 895–859. – doi: 10.1126/science.1163865.

229. The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis / Y. A. Senis, M. G. Tomlinson, S. Ellison [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113, No. 20. – P. 4942–4954. – doi: 10.1182/blood-2008-08-174318.

230. The use of dodecylphosphocholine micelles in solution NMR / D. A. Kallick, M. R. Tessmer, C. R. Watts, C. Y. Li // J. Magn. Reson. Ser. B. – 1995. – Vol. 109, No. 1. – P. 60–66. – doi: 10.1006/JMRB.1995.1146.

231. Thibeault, P. E. Biased signaling in platelet G-protein coupled receptors / P. E. Thibeault, R. Ramachandran // Can J Physiol Pharmacol. – 2021. – Vol. 99, No. 3. – P. 255–269. – doi: 10.1139/cjpp-2020-0149.

232. Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19 / J. E. Gómez-Mesa, S. Galindo-Coral, M. C. Montes, A. J. Muñoz Martin // Curr Probl Cardiol. – 2021. – Vol. 46, No. 3. – P. 100742. – doi: 10.1016/j.cpcardiol.2020.100742.

233. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor / K. Jurk, K. J. Clemetson, P. G. de Groot [et al.] // FASEB J. – 2003. – Vol. 17, No. 11. – P. 1490–1492. – doi: 10.1096/fj.02-0830fje.

234. Tissue-factor bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation / I. Del Conde, C. N. Shrimpton, P. Thiagarajan, J. A. López // Blood. – 2005. – Vol. 106, No. 5. – P. 1604–1611. – doi: 10.1182/blood-2004-03-1095.

235. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets / T. Fujii, A. Sakata, S. Nishimura [et al.] // *Proc Natl Acad Sci.* – 2015. – Vol. 112, No. 41. – P. 12800–12805. – doi: 10.1073/pnas.1516594112.

236. Toward correlating structure and mechanics of platelets / S. Sorrentino, J. D. Studt, M. B. Horev [et al.] // *Cell Adh Migr.* – 2016. – Vol. 10, No. 5. – P. 568–575. – doi: 10.1080/19336918.2016.1173803.

237. TRACER Investigators. Thrombin receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes / P. Tricoci, Z. Huang, C. Held [et al.] // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 366, No. 1. – P. 20–33. – doi: 10.1056/NEJMoa1109719.

238. Tranzer, J. P. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets / J. P. Tranzer, M. Da Prada, A. Pletscher // *Nature.* – 1966. – Vol. 212, No. 5070. – P. 1574–1575.

239. Tscharre, M. Novel antiplatelet agents in cardiovascular disease / M. Tscharre, A. D. Michelson, T. Gremmel // *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* – 2020. – Vol. 25, No. 3. – P. 191–200. – doi: 10.1177/1074248419899314.

240. Tuktamyshov, R. The method of in vivo evaluation of hemostasis: Spatial thrombodynamics / R. Tuktamyshov, R. Zhdanov // *Hematology.* – 2015. – Vol. 20, No. 10. – P. 584–586. – doi: 10.1179/1607845415Y.0000000022.

241. Use of clopidogrel with or without aspirin in patients taking oral anticoagulant therapy and undergoing percutaneous coronary intervention: an open-label, randomised, controlled trial / W. J. Dewilde, T. Oirbans, F. W. Verheugt [et al.] // *Lancet.* – 2013. – Vol. 381, No. 9872. – P. 1107–1115. – doi: 10.1016/S0140-6736(12)62177-1.

242. van der Meijden P. E. J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives / P. E. J van der Meijden, J. W. M. Heemskerk // *Nat Rev Cardiol.* – 2019. – Vol. 16, No. 3. – P. 166–179. – doi: 10.1038/s41569-018-0110-0.

243. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives / D. J. Angiolillo, A. Fernandez-

Ortiz, E. Bernardo [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. – Vol. 49, No. 14. – P. 1505–1516. – doi: 10.1016/j.jacc.2006.11.044.

244. Vorapaxar in the Secondary Prevention of Atherothrombotic Events for the TRA 2P–TIMI 50 Steering Committee and Investigators / D. A. Morrow, E. Braunwald, M. P. Bonaca [et al.] // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 366, No. 15. – P. 1404–1413. – doi: 10.1056/NEJMoa1200933.

245. Wagner, R. Gradient-selected NOESY—a fourfold reduction of the measurement time for the NOESY experiment / R. Wagner, S. Berger // *J. Magn. Reson. Ser. A.* – 1996. – Vol. 123, No. 1. – P. 119–121. – doi: 10.1006/jmra.1996.0222.

246. Weigend, F. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy / F. Weigend, R. Ahlrichs // *Chem. Phys.* – 2005. – Vol. 7, No. 18. – P. 3297–3305. – doi: 10.1039/b508541a.

247. Weitz, J. I. Blood coagulation and anticoagulant, fibrinolytic, and antiplatelet drugs / J. I. Weitz // *In the pharmacological basis of therapeutics* ; L. L. Brunton (Editor), Goodman & Gilman's. – New York, NY : McGraw-Hill Medical. – 2011. (12th ed., Vol. 211, P. 848–876).

248. White, J. G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation / J. G. White, G. Escolar // *Platelets.* – 1993. – Vol. 4, No. 4. – P. 175–189. – doi: 10.3109/09537109309013215.

249. White, J. G. Electron dense chains and clusters in human platelets / J. G. White // *Platelets.* – 2002. – Vol. 13, No. 5–6. – P. 317–325. – doi: 10.1080/0953770021000007267.

250. White, J. G. Electron-dense chains and clusters in platelets from patients with storage pool-deficiency disorders / J. G. White // *J Thromb Haemost.* – 2003. – Vol. 1, No. 1. – P. 74–79. – doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00032.x.

251. White, J. G. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets / J. G. White, M. Krumwiede // *Blood.* – 1987. – Vol. 69, No. 4. – P. 1196–1203.

252. White, J. G. Golgi complexes in hypogranular platelet syndromes / J. G. White // *Platelets*. – 2005. – Vol. 16, No. 1. – P. 51–60. – doi: 10.1080/0953710042000260173.
253. White, J. G. Medich giant platelet disorder: a unique alpha granule deficiency I. Structural abnormalities / J. G. White // *Platelets*. – 2004. – Vol. 15, No. 6. – P. 345–353. – doi:10.1080/0953710042000236512.
254. White, J. G. Platelet glycosomes / J. G. White // *Platelets*. – 1999. – Vol. 10, No. 4. – P. 242–246. – doi: 10.1080/09537109976095.
255. White, J. G. Platelet structure / J. G. White // In: *Platelets* ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press, 2013. – P. 117–144.
256. White, J. G. Platelets are covercytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system / J. G. White // *Platelets*. – 2005.– Vol. 16, No. 2. – P. 121–131. – doi: 10.1080/09537100400007390.
257. White, J. G. The submembrane filaments of blood platelets / J. G. White // *Am J Pathol*. – 1969. – Vol. 56, No. 2. – P. 267–277.
258. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma / P. Wolf // *Br J Haematol*. – 1967. – Vol. 13, No. 3. – P. 269–288. – doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
259. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae* / I. Petrescu, J. Lamotte-Brasseur, J.-P. Chessa [et al.] // *Extremophiles*. – 2000. – Vol. 4, No. 3. – P. 137–144. – doi: 10.1007/s007920070028.
260. Zhang, P. Protease-activated receptors / P. Zhang, L. Covic, A. Kuliopulos // In: *Platelets* ; editor A. D. Michelson. – ed. 3rd. – San Diego : Elsevier/Academic Press. – 2013. – P. 249–259.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«Утверждаю»
Первый проректор
ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России
д-р полит. наук, профессор Л.М. Мухарямова

« 14 » июня 2021 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс результатов диссертационной работы
**Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и
тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных
тиотерпеноидов», ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России**

Настоящим актом подтверждается, что теоретические разработки, результаты экспериментального и клинического разделов научного исследования диссертационной работы аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных тиотерпеноидов», опубликованные в печати, внедрены в учебный процесс, используются в лекциях и практических занятиях для студентов на кафедре общей и органической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2021 г.

В процессе работы над темой диссертационного исследования аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны выявлена роль гидрофобных взаимодействий тиотерпеноидов с модельными и клеточными мембранами.

Основные результаты, положения и выводы диссертации используются в лекционном курсе «Органическая химия». Аспирантом кафедры общей патологии Азизовой Зульфией Рашидовной проведены 3 семинарских занятия, которые получили положительную оценку и способствовали повышению уровня знаний студентов кафедры общей и органической химии и эффективности педагогического процесса.

Почтовый адрес:

420012, г. Казань ул. Бутлерова, д.49.

федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования

«Казанский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

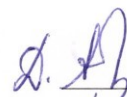
Тел. 8 (843) 236-06-52, e-mail: rector@kazangmu.ru

Заведующий кафедрой
общей и органической химии
д.м.н., профессор

 / Никитина Л.Е.

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор ФГБОУ ВО
Казанский ГМУ

Минздрава России
д.м.н., профессор

 Д.И. Абдулганиева
«14» июля 2021 г.

АКТ

внедрения в научный процесс результатов диссертационной работы
**Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и
тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных
тиотерпеноидов»**, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России

Настоящим актом подтверждается, что теоретические разработки, результаты экспериментального раздела научного исследования диссертационной работы аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных тиотерпеноидов», опубликованные в печати, внедрены в работу федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2021 г.

В ходе проведения работы над темой диссертационного исследования аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны был разработан и внедрен в работу научной лаборатории на кафедре общей и органической химии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России метод оценки гидрофобного взаимодействия тиотерпеноидов с модельными и тромбоцитарными мембранами. Данный метод опубликован в одной статье в ведущем рецензируемом научном журнале, рекомендованном Высшей аттестационной комиссией для защиты кандидатских и докторских диссертаций и 3 статьях в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science категории Q1 и Q3, доложен на научных конференциях и успешно применяется в настоящее время в научно-исследовательской работе кафедры общей и органической химии.

Почтовый адрес:
420012, г. Казань ул. Бутлерова, д.49.
федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Тел. 8 (843) 236-06-52, e-mail: rector@kazangmu.ru

Заведующий кафедрой
общей и органической химии
д.м.н., профессор

 / Никитина Л.Е.

«УТВЕРЖДАЮ»
 Проректор ФГБОУ ВО
 Казанский ГМУ
 Минздрава России
 д.м.н., профессор
 Д.И. Абдулганиева
 «14» июня 2021 г.

АКТ

внедрения в научный процесс результатов диссертационной работы
**Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и
 тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных
 тиотерпеноидов»**, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России

Настоящим актом подтверждается, что теоретические разработки, результаты экспериментального раздела научного исследования диссертационной работы аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных тиотерпеноидов», опубликованные в печати, внедрены в работу федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2021 г.

В ходе проведения работы над темой диссертационного исследования аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны был разработан и внедрен в работу научной лаборатории на кафедре общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России метод оценки гидрофобного взаимодействия с мембранами тромбоцитов в реализации тромбогенных свойств с использованием тиотерпеноидов. Данный метод опубликован в одной статье в ведущем рецензируемом научном журнале, рекомендованном Высшей аттестационной комиссией для защиты кандидатских и докторских диссертаций и 3 статьях в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science категории Q1 и Q3, доложен на научных конференциях и успешно применяется в настоящее время в научно-исследовательской работе кафедры общей патологии.

Почтовый адрес:
 420012, г. Казань ул. Бутлерова, д.49.
 федеральное государственное бюджетное образовательное
 учреждение высшего образования
 «Казанский государственный медицинский университет»
 Министерства здравоохранения Российской Федерации
 Тел. 8 (843) 236-06-52, e-mail: rector@kazangmu.ru

Заведующий кафедрой
 общей патологии
 д.м.н., профессор

Бойчук С.В. Бойчук С.В.

«Утверждаю»
Первый проректор
ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России
д-р полит. наук, профессор Л.М. Мухарьмова

«14» июня 2021 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс результатов диссертационной работы
**Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и
тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных
тиотерпеноидов»**, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России

Настоящим актом подтверждается, что теоретические разработки, результаты экспериментального и клинического разделов научного исследования диссертационной работы аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны «Исследование функциональной активности и тромбогенных свойств тромбоцитов с использованием мембранотропных тиютерпеноидов», опубликованные в печати, внедрены в учебный процесс, используются в лекциях и практических занятиях для студентов на кафедре общей патологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2021 г.

В процессе работы над темой диссертационного исследования аспиранта кафедры общей патологии Азизовой Зульфии Рашидовны выявлена роль гидрофобных взаимодействий агонистов и факторов свертывания с мембраной тромбоцитов в инициации гемостаза.

Основные результаты, положения и выводы диссертации используются в лекционном курсе «Патологическая физиология». Предложение является авторским и внедрено впервые. Аспирантом кафедры общей патологии Азизовой Зульфией Рашидовной прочитано 2 лекции, проведено 4 семинарских занятия, которые получили положительную оценку и способствовали повышению уровня знаний студентов кафедры общей патологии и эффективности педагогического процесса.

Почтовый адрес:
420012, г. Казань ул. Бутлерова, д.49.
федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Тел. 8 (843) 236-06-52, e-mail: rector@kazangmu.ru

Заведующий кафедрой
общей патологии
д.м.н., профессор



/ Бойчук С.В.