

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ N,N'-ЗАМЕЩЕННЫХ ПИПЕРАЗИНОВ НА ТРОМБИН-ИНДУЦИРОВАННУЮ АКТИВАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

О. С. Веселкина¹, Н. Н. Петрищев², Л. В. Васина², М. Е. Боровитов¹,
А. В. Селютин³, С. В. Чепанов³, С. А. Сельков³

Исследовано влияние новых соединений N,N'-замещенных пиперазинов с различной природой линкера, соединяющего пиперазиновый и ароматический циклы — карбонильная группа (VR-0411) и сульфонильная группа (VR-0511), на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, мобилизацию цитоплазматического Ca²⁺ в тромбоцитах и экспозицию P-селектина на плазматической мембране тромбоцитов. По выраженности ингибирующего действия на агрегацию тромбоцитов VR-0511 превосходит как соединение сравнения аспирин, так и VR-0411 на 35 и 42 % соответственно ($p \leq 0,01$). Результаты исследования влияния соединений на мобилизацию цитоплазматического Ca²⁺ в тромбоцитах и экспозицию P-селектина свидетельствуют, что VR-0411 и VR-0511 ингибируют активность тромбоцитов на 28 и 61 % ($p \leq 0,01$), на 34 и 58 % ($p \leq 0,01$) соответственно. Возможными мишенями для соединений VR-0411 и VR-0511 являются тромбоксановый (тромбоксансинтаза) и полифосфоинозитидный (образование IP₃) пути передачи сигнала активации.

Ключевые слова: N,N'-замещенные пиперазины; агрегация тромбоцитов; цитоплазматический Ca²⁺; P-селектин.

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с участием в тромбообразовании, тромбоциты играют важную роль в патогенезе воспаления, ишемии, метастазирования опухолей, ремоделирования сосудов, в развитии стеноза и рестеноза после проведения реваскуляризационных вмешательств и т.д. [11]. Участие тромбоцитов в этих патологических процессах связано, в частности, с их активацией, экспозицией P-селектина и образованием тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов [12, 15]. P-селектин содержится в альфа-гранулах тромбоцитов и экспонируется на поверхности клеточной мембраны при ее стимуляции АДФ, адреналином, коллагеном, тромбином, окисленными ЛПНП, провоспалительными цитокинами, свободными радикалами, гистамином, компонентами комплемента, эндотоксинами и другими факторами [8].

Известно, что некоторые антиагрегантные препараты (клопидогрель, тиклопидин и др.) ингибируют экспози-

цию P-селектина на мембране тромбоцитов, что повышает их эффективность в профилактике тромбоза [5].

Целью данной работы явилось изучение влияния новых соединений — N,N'-замещенных пиперазинов — на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, мобилизацию цитоплазматического Ca²⁺ в тромбоцитах и экспозицию P-селектина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы N,N'-замещенные пиперазины VR-0411 и VR-0511 в виде их солей с фумаровой кислотой, отличающиеся количеством метоксильных заместителей в ароматическом цикле и природой линкера, соединяющего пиперазиновый и ароматический циклы — карбонильной группы (VR-0411) и сульфонильной группы (VR-0511) [7].

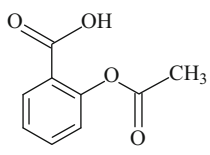
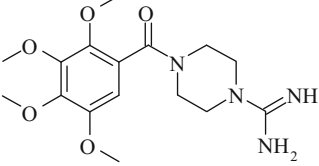
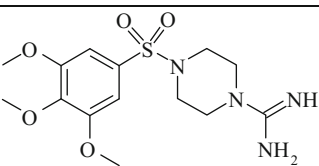
Расчет значений lgP, lgD и pKa проводили по программе, приведенной на сервере chemicolize.org (chemAxon).

Фумараты VR-0411 и VR-0511 представляли собой гидрофильные соединения, незначительно различающиеся по рассчитанным значениям lgD, характеризующего гидрофобность соединения в ионизованном состоянии, и по величине pKa соединения, являющимся основными. Отличие заключалось в большей гидрофобности соединения VR-0511 в неионизованном состоянии (lgP для VR-0511 на 40 % превышает lgP для VR-0411).

¹ ЗАО «ВЕРТЕКС», 199106, Санкт-Петербург, 24-я линия В. О., 27А.

² ФГБУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2;

³ ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

Структурная формула	lgD	lgP	MM	pKa
 АСК	300,26	1,2	-1,8	3,4
 VR-0411	410,43	-0,5	-2,77	11,55
 VR-0511	474,49	-0,3	-2,53	11,51

В качестве препарата сравнения использовали аспирин (АСК), механизм действия которого хорошо изучен [4, 10]. АСК представляет собой более гидрофобное соединение как в неионизованном, так и в ионизованном состоянии, а также, в отличие от VR-0411 и VR-0511, является кислотой.

Для приготовления растворов соединений VR-0411, VR-0511 и аспирина с концентрацией 12,5 мкмоль/мл использовали 0,05 М раствор Трис-НСl, рН 7,4. Растворы с более низкой концентрацией соединений готовили путем разведения концентрированных растворов тем же раствором Трис-НСl. Хранили раствор с концентрацией 12,5 мкмоль/мл при температуре 4 – 8° С не более 24 ч, более разбавленные растворы использовали свежеприготовленными.

Кровь для исследования брали у доноров ($n = 5$), лиц обоего пола в возрасте 20 – 35 лет, не получавших в течение 7 – 10 сут препаратов, влияющих на функцию тромбоцитов.

Для предотвращения активации тромбоцитов кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве стабилизатора цитрат натрия (0,129 М).

Тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали импедансным 4-канальным агрегометром, модель 590 (WholeBloodAggregometer, Chrono-Logcorporation, USA). Температура в ячейках пробоподготовки агрегометра — + 37 °С, термостатируемой исследуемой ячейки — + 37 °С, скорость вращения магнитной мешалки — 1200 об/мин.

В качестве индуктора агрегации использовали тромбин (Chrono-par Thrombin reagent, Chrono-Logcorporation, USA). Лиофилизированный тромбин растворяли в 1 мл стерильного физиологического раствора

до концентрации 10,0 Unit/ml. Агрегацию тромбоцитов оценивали по реакции на добавление к 1 мл цельной крови 100 мкл раствора тромбина (конечная концентрация — 0,9 Unit/ml).

Для цитометрических исследований использовали вакуумные пробирки с консервантом АСD-A (Greiner Bio-one, Австрия) в соотношении АСD/кровь 1/9. Стабилизированную кровь центрифугировали со скоростью 1000 об/мин (140 – 160 g) в течение 5 – 7 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы.

Уровень тромбин-индуцированной экспрессии Р-селектина на тромбоцитах определяли методом проточной цитометрии, используя моноклональные антитела к антигену дифференцировки CD62P, меченные аллофикоцианином (APC) (Becton Dickenson, США). Цитометрический анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (США). При данном анализе количество тромбоцитов, содержащихся в образце, определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния [16].

Окрашивание тромбоцитов осуществляли путем внесения в суспензию клеток (20 мкл богатой тромбоцитами плазмы в 980 мкл HEPES буфера) 4 мкл моноклональных антител к антигену дифференцировки CD62P, меченных APC, после чего инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Определяли количество CD62P⁺-тромбоцитов до и после активации тромбином.

Для оценки влияния аспирина, VR-0411 и VR-0511 на уровень тромбин-индуцированной экспрессии Р-селектина к суспензии тромбоцитов (900 мкл) добавляли 4 мкл моноклональных антител, 100 мкл исследуемой субстанции и 10 мкл тромбина (конечная концентра-

ция 0,09 Unit/ml). Суспензию инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, после чего анализировали на проточном цитометре количество CD62P⁻ и CD62P⁺-тромбоцитов. В контроле к суспензии тромбоцитов добавляли 100 мкл 0,05 М раствор Трис-НСl, рН 7,4.

Регистрацию изменения концентрации внутриклеточного кальция в тромбоцитах человека проводили с использованием флуоресцентного зонда Fluo-3 AM (пентаацетоксиметилловый эфир [2-амино-5-(2,7-дихлор-6-гидрокси-3-оксо-9-ксантенил)фенокси]-2-(2-амино-5-метилфенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (Sigma, США). Fluo-3 эффективно возбуждается длиной волны 488 нм аргонового лазера.

Реактив Fluo-3 AM в порошкообразной форме растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (DMSO) до концентрации 10,0 мМ. Перед экспериментом раствор Fluo-3 в DMSO нагревали до комнатной температуры. Суспензию тромбоцитов (смешивали 20 мкл богатой тромбоцитами плазмы и 980 мкл среды Хенкса) нагружали флуоресцентным кальциевым индикатором в процессе инкубации тромбоцитов с 8,0 мкл Fluo-3 AM в течение 30 мин при температуре + 37 °С.

Далее клетки дважды отмывали в среде Хенкса: суспензию тромбоцитов разводили средой Хенкса без Ca²⁺ в соотношении 1:1 по объему, после чего центрифугировали 10 мин при 250 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали, к тромбоцитарной бляшке добавляли 2 мл среды Хенкса и снова центрифугировали. Процедуру отмывки повторяли дважды. Затем осадок ресуспендировали в 1 мл среды Хенкса и снова инкубировали в течение 15 мин при температуре + 37 °С для протекания процесса деэфиризации. После деэфиризации клетки снова однократно отмывали и инкубировали без красителя 10 – 20 мин, измеряли интенсивность флуоресценции (FL1) Fluo-3-окрашенных тромбоцитов до и после активации тромбином.

Влияние аспирина, VR-0411 и VR-0511 на уровень цитоплазматического Ca²⁺ в тромбоцитах человека определяли, смешивая 900 мкл суспензии окрашенных тромбоцитов и 100 мкл раствора исследуемого соединения (конечная концентрация соединений была 0,125, 0,5 и 1,25 мкмоль/мл). В контроле к суспензии тромбоцитов добавляли 100 мкл 0,05 М раствора Трис-НСl, рН 7,4. Смесь инкубировали в течение 2 мин при + 37 °С, после чего вносили 10 мкл раствора тромбина (конечная концентрация 0,09 Unit/ml), и на проточном цитометре определяли интенсивность флуоресценции стимулированных тромбоцитов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA/w6.0 фирмы StatSoft, Inc. (США) с использованием критерия Манна-Уитни. Вычисление EC₅₀ проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (США) по уравнению зависимости величины эффекта от концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании антиагрегантные свойства аспирина, VR-0411 и VR-0511 оценивали по их влиянию на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов в цельной крови *in vitro* (табл. 1).

Как видно из представленных данных, аспирин статистически значимо по сравнению с контролем ингибировал тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов лишь при концентрации 1,25 мкмоль/мл; активность соединения VR-0411 в диапазоне концентраций 0,125 – 1,25 мкмоль/мл статистически значимо не отличается от активности аспирина. EC₅₀ для VR-0411 и аспирина, определенные по линии аппроксимации зависимости доза — эффект, составляют 1,6 и 2,7 мкмоль/мл соответственно.

Соединение VR-0511 по выраженности ингибирующего действия на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов превосходит как аспирин, так и VR-0411. EC₅₀ VR-0511 равен 0,3 мкмоль/мл.

Известно [9], что активация тромбоцитов приводит к стимуляции переноса молекул Р-селектина из α-гранул на поверхность плазматической мембраны, следствием чего является усиление взаимодействия тромбоцитов с факторами коагуляции. В этой связи нами изучено влияние соединений VR-0411, VR-0511 и аспирина на тромбин-индуцированную экспозицию Р-селектина на мембране тромбоцитов.

Доля тромбоцитов с Р-селектином на поверхности до активации тромбином (отрицательный контроль, К(-)) в крови доноров составила 0,6 ± 0,3 % от общего числа тромбоцитов. После активации тромбином (положительный контроль, К(+)) этот показатель составил 42,5 ± 3,2 % (*p* < 0,001, по отношению к отрицательному контролю).

В табл. 2 представлены данные о влиянии соединений VR-0411, VR-0511 и аспирина на тромбин-индуцированную экспозицию Р-селектина на мембране тромбоцитов.

Аспирин статистически значимо, по сравнению с положительным контролем, ингибировал тромбин-индуцированную экспозицию Р-селектина на мембране

Таблица 1. Влияние аспирина, VR-0411 и VR-0511 на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов в цельной крови *in vitro* (Ом, *M* ± *m*, *n* = 5)

Тромбин-индуцированная агрегация тромбоцитов, Ом				
Контроль: 14,5 ± 1,0 Ом				
Соединение	С, мкмоль/мл			EC ₅₀ , мкмоль/мл
	0,125	0,5	1,25	
Аспирин	12,8 ± 1,0	11,8 ± 0,8	10,0 ± 1,0*	2,7
VR-0411	14,3 ± 1,0	12,6 ± 0,8	9,1 ± 1,3*	1,6
VR-0511	10,6 ± 1,0	2,3 ± 1,7	1,7 ± 1,2*	0,3

* — различия статистически значимы по отношению к контролю, *p* < 0,05.

тромбоцитов в концентрации 0,5 мкмоль/мл и более; $EC_{50} = 1,4$ мкмоль/мл. Соединение VR-0411 ингибировало тромбин-индуцированную экспрессию Р-селектина при тех же концентрациях, что и аспирин; $EC_{50} = 2,1$ мкмоль/мл.

По выраженности ингибирующего действия на экспрессию Р-селектина соединение VR-0511 при концентрации 1,25 мкмоль/мл превосходило аспирин и VR-0411. При концентрациях 0,5 и 0,125 мкмоль/мл дозозависимый эффект VR-0511 был незначимым, но резко возрастал при увеличении концентрации. Рассчитанное значение EC_{50} составило 1,1 мкмоль/мл.

Так как экспрессия Р-селектина под действием тромбина происходит в результате выброса Ca^{2+} из плотных гранул, целесообразно исследовать влияние VR-0411, VR-0511 и аспирина на тромбин-индуцированную мобилизацию Ca^{2+} в тромбоцитах.

Установлено, что у доноров интенсивность флуоресценции (FL1) Fluo-3-окрашенных тромбоцитов до активации тромбином (отрицательный контроль, K(-)) составила $263,4 \pm 18,1$ о. е., после активации тромбином (положительный контроль, K(+)) — возрастает до $783,4 \pm 42,4$ о. е., ($p < 0,05$).

Соединения VR-0411, VR-0511 и аспирин оказывали дозозависимое влияние на тромбин-индуцированную мобилизацию цитоплазматического Ca^{2+} в тромбоцитах (табл. 3).

Аспирин оказывал статистически значимое, по сравнению с положительным контролем, ингибирующее влияние на тромбин-индуцированную мобилизацию цитоплазматического Ca^{2+} в тромбоцитах при всех исследованных концентрациях.

Соединение VR-0411 ингибировало тромбин-индуцированную мобилизацию цитоплазматического Ca^{2+} только при концентрациях 0,5 и 1,25 мкмоль/мл. Рассчитанные значения EC_{50} для VR-0411 и аспирина составляют 3,0 и 3,8 мкмоль/мл, соответственно.

По выраженности ингибирующего действия на тромбин-индуцированную мобилизацию цитоплазма-

тического Ca^{2+} в тромбоцитах соединение VR-0511 значительно превосходило аспирин и VR-0411 при всех исследованных концентрациях; $EC_{50} = 0,5$ мкмоль/мл.

Ранее нами было показано, что фумарат VR-0511, по сравнению с аспирином и фумаратом VR-0411, проявляет меньший антиагрегантный эффект в тесте с арахидоновой кислотой. При этом фумараты VR-0411 и VR-0511, в отличие от аспирина, ингибировали агрегацию, индуцированную эпинефрином [6]. Результаты данного исследования демонстрируют, что VR-0511 в большей степени, чем аспирин и VR-0411, ингибирует тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Как известно, в опытах *in vitro* аспирин либо не влияет на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, либо оказывает ингибирующий эффект при высоких концентрациях, как это имело место и в наших исследованиях [13]. Это свидетельствует о том, что торможение тромбоксан A_2 (TXA₂)-зависимого пути активации тромбоцитов в результате блокады циклооксигеназы-1 в данном случае не является ведущим, и реализуются другие механизмы действия аспирина, в частности, его ингибирующее влияние на развитие доступности рецепторных мест в интегринавом комплексе GPIIb/IIIa [14].

Можно предполагать, что VR-0411 и VR-0511 в тесте тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов реализуют свой эффект таким же образом, как аспирин, но, учитывая, что по своим антиагрегантным свойствам VR-0511 превосходит и аспирин, и VR-0411, для данного соединения возможны и другие мишени. Например, угнетение полифосфоинозитидного пути передачи сигнала активации. Как известно, главную роль во включении данного пути при стимуляции PAR-1 рецепторов тромбином играет фосфолипаза C_{β} , которая опосредованно через мембранные G протеины активируется еще при достаточно низком

Таблица 3. Влияние аспирина, VR-0411 и VR-0511 на тромбин-индуцированное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов (о.е., $M \pm m$, $n = 5$)

Интенсивность флуоресценции FL1 fluo-3-окрашенных тромбоцитов, о. е.				
Положительный контроль, K(+): $783,4 \pm 42,4$ о. е.				
Соединение	С, мкмоль/мл			EC_{50} , мкмоль/мл
	0,125	0,5	1,25	
Аспирин	$713,8 \pm 38,5^*$	$651,8 \pm 36,2^*$	$583,8 \pm 58,8^*$	3,8
VR-0411	$768,5 \pm 33,5$	$652,2 \pm 52,5^*$	$565,7 \pm 65,9^*$	3,0
VR-0511	$479,1 \pm 35,8^{*x}$	$400,8 \pm 24,4^{*x}$	$305,1 \pm 50,5^{*x}$	0,5

Таблица 2. Влияние аспирина, VR-0411 и VR-0511 на тромбин-индуцированное увеличение относительного количества тромбоцитов с Р-селектином на плазматической мембране (% от отрицательного контроля, $M \pm m$, $n = 5$)

Количество тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, (%)				
Положительный контроль, K(+): $42,5 \pm 3,2$ %				
Соединение	С, мкмоль/мл			EC_{50} , мкмоль/мл
	0,125	0,5	1,25	
Аспирин	$39,9 \pm 2,0$	$28,2 \pm 1,7^*$	$22,3 \pm 1,5^*$	1,4
VR-0411	$39,5 \pm 2,2$	$32,9 \pm 1,6^*$	$27,9 \pm 1,6^*$	2,1 ^x
VR-0511	$42,0 \pm 2,4$	$40,9 \pm 3,2$	$17,6 \pm 1,4^{*x}$	1,1

* — различия статистически значимы по отношению к положительному контролю, $p < 0,01$.

^x — различия статистически значимы по отношению к аспирину, $p < 0,01$.

* — различия статистически значимы по отношению к положительному контролю, $p < 0,05$.

^x — различия статистически значимы по отношению к аспирину, $p < 0,05$.

уровне цитоплазматического Ca^{2+} . Фосфолипаза C_β расщепляет мембранный фосфатидилинозитолдифосфат (PIP_2) с образованием активных вторичных мессенджеров: диацилглицерола (DG) и инозитолтрифосфата (IP_3). В физиологических условиях выброс Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума индуцируется IP_3 и повышением концентрации в цитозоле самих ионов Ca^{2+} — так называемым механизмом кальций-индуцированного высвобождения Ca^{2+} (CICR — calcium-induced calcium release). DG принимает участие в стимуляции экспозиции на мембране тромбоцитов комплекса GPIIb/IIIa , активирует протеинкиназу C, плекстрин и протеины сократительной системы, что в конечном итоге способствует высвобождению содержимого гранул из клетки [3].

Низкие, по сравнению с аспирином, концентрации VR-0511, необходимые для проявления антиагрегантного эффекта в отношении тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов, подтверждают, что первичным местом воздействия данного соединения являются PAR рецепторы. Можно предположить, что VR-0511 прерывает активацию полифосфоинозитидного пути на уровне образования IP_3 , предотвращая мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} в цитоплазму.

Как известно, повышение уровня свободного цитоплазматического Ca^{2+} является универсальным механизмом для всех путей активации тромбоцитов (тромбоксанового, полифосфоинозитидного и протеин-тирозинкиназного) при действии на тромбоциты различных индукторов агрегации [2]. Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} под действием тромбина стимулирует активацию фосфолипазы A_2 и образование TXA_2 — агониста тромбина. Активацию системы TXA_2 при этом рассматривают как последствие активации фосфолипазы C_β . Большое значение имеет способность TXA_2 после выделения из тромбоцитов при соединении с его рецепторами на плазмалемме стимулировать фосфолипазу C через сопряженный с PAR-1 G_{α_q} протеин и включать полифосфоинозитидный путь активации.

Отмеченный нами ингибирующий эффект аспирина на тромбин-индуцированную мобилизацию цитоплазматического Ca^{2+} обусловлен его основным циклооксигеназным механизмом, блокирующим генерацию TXA_2 . Поскольку соединение VR-0411 по выраженности ингибирующих свойств в тесте тромбин-индуцированной агрегации статистически значимо не отличалось от аспирина, можно предположить, что VR-0411 реализует свой эффект через TXA_2 -зависимый механизм на уровне тромбоксансинтазы. Ингибирующий эффект VR-0511 может быть обусловлен влиянием на IP_3 -зависимый механизм мобилизации цитоплазматического Ca^{2+} .

Как уже отмечалось, на конечном этапе передачи сигнала активации под влиянием тромбина благодаря сокращению тромбоцитарного актомиозина происходят финальные реакции, наиболее важной из которых

является процесс дегрануляции, теснейшим образом связанный с уровнем Ca^{2+} в цитоплазме.

Учитывая, что исследуемые соединения ингибируют тромбин-индуцированную мобилизацию Ca^{2+} , можно предположить, что именно благодаря этому они снижают транслокацию P-селектина из α -гранул на мембрану тромбоцитов.

В последнее время при рассмотрении механизмов действия антиагрегантных препаратов большое внимание уделяется не только их влиянию на внутриклеточную передачу сигналов активации, но и прямому действию на наружную мембрану тромбоцитов, а также на мембраны внутриклеточных структур [1].

Так как VR-0411, и особенно VR-0511, обладают не только антиагрегантной активностью, но и ингибируют мобилизацию внутриклеточного кальция и экспрессию P-селектина при активации тромбоцитов тромбином, их взаимодействие с компонентами клеточной мембраны требует дальнейшего исследования. Таким образом, N,N'-замещенные пиперазины оказывают ингибирующее влияние на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов, степень выраженности которого зависит от химической структуры соединения.

ВЫВОДЫ

1. N,N'-замещенные пиперазины с различной природой линкера, соединяющего пиперазиновый и ароматический циклы — карбонильная группа (VR-0411) и сульфонильная группа (VR-0511), ингибируют тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов (на 37 и 88 % соответственно, $p \leq 0,01$), мобилизацию цитоплазматического Ca^{2+} в тромбоцитах (на 28 и 61 % соответственно, $p \leq 0,01$) и экспозицию P-селектина (на 34 и 58 %, $p \leq 0,01$).

2. Возможными мишенями для соединений VR-0411 и VR-0511 являются тромбоксановый (тромбоксансинтаза) и полифосфоинозитидный (образование IP_3) пути передачи сигнала активации.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Закирова, Ф. С. Зарудий, Б. Н. Гарифуллин, *РФК*, 2, 81 – 84 (2008).
2. А. С. Шитикова, *Тромбоцитарный гемостаз*, СПбГМУ, Санкт-Петербург (2000).
3. В. И. Петров, Н. Г. Чепурина, Н. Л. Шимановский, *Казанский мед. журн.*, 91(4), 472 – 476 (2010).
4. И. Н. Бокарев, Л. В. Попова, *РФК*, 7(4), 492 – 500 (2011).
5. Л. И. Бурячковская, А. Б. Сумароков, И. А. Учитель, Е. М. Гупало, *РФК*, 6(7), 677 – 684 (2011).
6. О. С. Веселкина, Н. Б. Викторов, Н. Н. Петрищев, *Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения*, Украина (2011).
7. О. С. Веселкина, Н. Б. Викторов, Н. Н. Петрищев, Ю. В. Поплавская. Патент RU 2 469 029 (2012).
8. A. Blann, S. Nadar, G. Lip, *Eur. Heart. J.*, 24(24), 2166 – 2179 (2003).
9. A. Zarbock, R. K. Polanowska-Grabowska, K. Ley, *Blood Reviews*, 21(2), 99 – 111 (2007).

10. C. Patrono, B. Rocca, *J. Thromb. Haemost.*, **7**(Suppl.1), 258 – 261 (2009).
11. D. D. Wagner, P. C. Burger, *Arterioscler. Vasc. Biol.*, **23**(12), 2131 – 2137 (2003).
12. E. R. Vandendries, B. C. Furie., B. Furie, *J. Thromb. Haemost.*, **92**(3), 459 – 466 (2004).
13. J. L. Wallace, W. McKnight, P. Del Soldato, et al., *J. Clin. Invest.*, **96**, 2711 – 2718 (1995).
14. M. E. McKenzie, A. I. Malinin, C. R. Bell, et al., *Blood Coagul Fibrinolysis*, **14**(3), 249 – 253 (2003).
15. N. Li., Q. Ji, P. Hjerdahl, *J. Thromb. Haemost.*, **4**(4), 874 – 881 (2006).
16. V. Evangelista, S. Manarini, G. Dell'Elba, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **94**(3), 568 – 577 (2005).

Поступила 02.04.14

INFLUENCE OF NEW N,N'-SUBSTITUTED PIPERAZINES ON THROMBIN-INDUCED PLATELET ACTIVATION

O. S. Veselkina^{1*}, N. N. Petrishchev², L. V. Vasina², M. E. Borovitev¹,
A. V. Selyutin³, S. V. Chepanov³, and S. A. Sel'kov³

¹ VERTEX Closed-Stock Company, 24th Line V. O., 27A, St-Petersburg, 199106 Russia;

² Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Akkuratova 2, St.-Petersburg, 197341 Russia;

³ D. O. Ott Scientific Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, Mendeleevskaya Line V. O., 3, St.-Petersburg, 199034 Russia;

* e-mail: loveselkina@vertex.spb.ru

We have studied the influence of new N,N'-substituted piperazines with variable nature of the linker between piperazine and aromatic cycles (carbonyl group in VR-0411 versus sulfonyl group in VR-0511) on thrombin-induced platelet aggregation, cytoplasmic Ca²⁺ mobilization in platelets, and P-selectin exposure on the platelet plasma membrane. The inhibitory effect of VR-0511 on platelet aggregation exceeds the effects of the reference compound aspirin and VR-0411 by 35 and 42%, respectively ($p \leq 0.01$). The effects of test compounds on the mobilization of cytoplasmic Ca²⁺ in platelets and P-selectin exposure indicate that VR-0411 and VR-0511 inhibit platelet activation in these tests by 28 and 61%, ($p \leq 0.01$) and 34 and 58% ($p \leq 0.01$), respectively. The possible targets for VR-0411 and VR-0511 are thromboxane and inositol triphosphate-dependent (IP₃ formation) pathways of activation signal transfer.

Keywords: N,N'-substituted piperazines; platelet aggregation; cytoplasmic Ca²⁺; P-selectin