

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДІДКІВСЬКИЙ ВАЛЕНТИН АНТОНОВИЧ

УДК 577.112.083; 577.151.45

ДИСЕРТАЦІЯ

**ДОСЛІДЖЕННЯ СПОЛУК КАЛІКС[4]АРЕНОВОГО РЯДУ ЯК
АНТИТРОМБОТИЧНИХ ТА ПРОАНГІОГЕННИХ АГЕНТІВ**

091 – Біологія та біохімія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ / В.А. ДІДКІВСЬКИЙ /

Науковий керівник: Чернишенко Володимир Олександрович, доктор біологічних наук, старший дослідник

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Дідківський В.А. Дослідження сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних та проангіогенних агентів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Внутрішньосудинне тромбоутворення є одною з головних причин смертності осіб працездатного віку у світі. Воно полягає у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу, який перекриває просвіт судини, перешкоджаючи кровопостачанню тканин та органів, та викликає такі тяжкі патології як інфаркт міокарда, тромботичний інсульт головного мозку, тромбоемболія легеневої артерії тощо.

Отже, пошук шляхів ефективного запобігання утворенню тромбу в судині є важливим питанням сучасної медицини та біохімії. Для швидкого та керованого інгібування активації системи зсідання крові застосовують антитромботичні препарати. За напрямком їхньої дії розрізняють антикоагулянти, які інгібують зсідання крові на різних етапах, та фібринолітики, спрямовані на прискорення руйнування фібринового тромбу (t-РА, стрептокіназа, урокіназа). Найпоширенішими серед антикоагулянтів є такі, що діють безпосередньо на тромбін (дабігатран), фактор Ха (рivarаксабан), фактори VIIIa та V (дротрекогін), блокуючи каскад зсідання крові на етапі активації фактора X, на етапі активації протромбіну або на етапі перетворення фібриногену на фібрин. Окремим класом сполук, які блокують формування фібриново-тромбоцитарного тромбу, є інгібітори агрегації тромбоцитів.

На сьогодні відсутні антитромботичні препарати, які діяли б спрямовано на заключний етап тромбоутворення – полімеризацію фібрину. Як прямий інгібітор полімеризації фібрину пропонують використовувати наночастинки срібла або ж

пептиди-інгібітори (зокрема GPRP), кон'юговані з альбуміном. Жоден такий засіб не пройшов доклінічні випробування.

У відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було охарактеризовано нову сполуку калікс[4]аренового ряду, створену в Інституті органічної хімії НАН України, – калікс[4]арен С-145, що безпосередньо взаємодіє з центром полімеризації фібрину «А» завдяки своїй гідрофобній частині. Тому калікс[4]арен С-145 безпосередньо інгібує формування протофібрил фібрину ($IC_{50} = 2,5 \times 10^{-6}$), запобігаючи утворенню полімерного фібрину. Було показано його ефективність як *in vitro*, так і *in vivo*.

Відповідно, представлену дисертаційну роботу було присвячено дослідженню сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних агентів, підбору умов для їх застосування *in vivo*, а також їхнім доклінічним дослідженням.

Для цього з використанням тесту АЧТЧ (активованій частковий тромбoplastиновий час) було проведено скринінг сполук калікс[4]аренового ряду *in vitro* з метою виявлення серед них інгібіторів полімеризації фібрину. Було показано, що натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145) та натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145S) ефективно подовжують час зсідання плазми крові, що може бути пов'язано з інгібуванням самоскладання фібрину.

Турбідиметричні дослідження обраних сполук показали, що С-145S є ефективнішим інгібітором полімеризації фібрину порівняно з С-145, який раніше було запропоновано для створення антитромботичного агента. Однак, С-145S також стимулював проліферацію ендотелійних клітин свині (РАЕ) та інгібував агрегацію тромбоцитів та гідроліз фібринового згустку. Ці додаткові ефекти, які у випадку С-145 були значно менш виражені, можна розглядати як побічну дію, яка ускладнює застосування препарату *in vivo*.

Тому надалі ми розглядали саме С-145 як прототип антитромботичного препарату. Насамперед, було необхідно підібрати дозування С-145 для введення *in vivo*. Було визначено напівлетальну дозу (LD_{50}), яка складала 1420 мг/кг.

Відповідно до проведених досліджень, С-145 належить до малотоксичних сполук за умови перорального введення. Для терапевтичного застосування було використано дозування у 100 разів менше за напівлетальну дозу та показано, що введення такої кількості С-145 (12 мг/кг) призводило до інгібування полімеризації фібрину в лабораторних тварин.

Було досліджено час настання та тривалість антитромботичного ефекту лікарської сполуки калікс[4]арену С-145 після внутрішньовенного або перорального введення щурам (12 мг/кг). Показано, що максимальна антитромботична дія С-145 спостерігається одразу після внутрішньовенного та через 4 години після перорального введення субстанції. Відновлення показників спостерігали через 24 години після введення.

Аналогічний експеримент було проведено на лабораторних кролях, що дозволило оцінювати динаміку зміни стану системи гемостазу окремих тварин у ході експерименту. Показано загальну тенденцію до досягнення максимального антитромботичного ефекту за 4-6 годин після введення препарату.

Підібрані умови для застосування С-145 як антитромботичного агенту *in vivo* дозволили провести дослідження за умов експериментального передтромботичного стану. Для цього використовували спонтанно гіпертензивних щурів лінії SHR. Тварин утримували на холестерольній дієті (корм з 3 % холестеролу) протягом 2 місяців, щоденно вводячи 12 мг/кг С-145 *per os*, або на дієті з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) протягом 6 місяців, вводячи щоденно 12 мг/кг С-145 *per os* останні два місяці. Показано підвищення прокоагулянтного потенціалу плазми крові у щурів обох експериментальних груп та достовірну нормалізацію показників системи зсідання крові при застосуванні С-145. Зокрема, введення С-145 нормалізувало вміст протеїну С, фібриногену та час зсідання плазми крові в коагуляційних тестах. Відмічено також достовірне зменшення товщини стінки аорти та зменшення відсотку переродженої тканини в стінці аорти у експериментальних щурів.

У щурів лінії SHR, які отримували дієту з високим вмістом жиру (30 %), було виявлено гіалінову дистрофію та загибель кардіоміоцитів, порушення структури міокарда, розвиток набряку, лімфоцитарної інфільтрації, витоншення чи набряк судин. Застосування С-145 дозволило уникнути гіалінової дистрофії так само, як і розшарування інтими судин серця. Виявлена протекторна дія С-145 на тканини серця може бути додатковим важливим ефектом лікарської субстанції.

Ефект С-145 на тканину серцевого м'язу досліджували за умов експериментального ізопротренол-індукованого інфаркту міокарда. Для цього щурам лінії Wistar одноразово вводили ізопротренол у дозі 100 мг/кг та вводили їм С-145 щоденно *per os* до виведення з експерименту протягом 14 діб. Показано, що С-145 не впливає на обсяг фібробластного переродження тканини серця, однак чинить судинопротекторну дію. З використанням тесту на розчинні фібрин-мономерні комплекси показано відсутність генералізованої активації системи зсідання крові у щурів.

Таким чином, в результаті виконання дисертаційної роботи було вперше запропоновано низькомолекулярну антитромботичну сполуку – натрієву сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (С-145) як лікарську субстанцію для створення антитромботичного препарату з безпосередньою дією на полімеризацію фібрину. Було доведено її ефективність в умовах *in vitro* та *in vivo*, а також здатність знижувати прокоагулянтний потенціал плазми крові лабораторних тварин з передтромботичним станом. Виявлений протекторний ефект С-145 на тканини серцевого м'язу є вагомим додатковою характеристикою сполуки.

Розпочато доклінічну фазу досліджень лікарської субстанції С-145 відповідно до вимог GLP: в тесті на гостру токсичність показано, що С-145 належить до низькотоксичних сполук; проведено сенсibiliзаційний тест (OECD 406); на штамах бактерій *Salmonella typhimurium* TA-98 і TA-100 в умовах з метаболічною активацією і без неї в широкому діапазоні концентрацій (тест Еймса) показано низьку мутагенну активність С-145.

Проведені дослідження є вагомим кроком на шляху до впровадження нового препарату «Антитромботичний засіб Калікс[4]арен С-145», що дозволить перейти до клінічної фази випробувань.

Ключові слова: гемостаз, фібриноген, фібрин/фібриноген, коагуляція і антикоагуляція, наноконплекс, *in vitro*, плазміноген/плазмін, калікс[4]арени, кальцій, антикоагулянти прямої дії, токсичність, щури, тромбоцити, плазма крові.

ANNOTATION

Didkivskiy V.A. The study of calix[4]arene series compounds as antithrombotic and proangiogenic agents. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 “Biology” – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

Intravascular thrombosis is one of the main causes of mortality in the working-age population worldwide. It consists in the formation of a fibrin-platelet thrombus which blocks the lumen of the vessel, preventing blood supply to tissues and organs and causing severe pathologies such as myocardial infarction, thrombotic brain stroke, pulmonary embolism, etc.

Therefore, efficient prevention of thrombus formation in the vessel is an important issue of modern medicine and biochemistry. Antithrombotic drugs are used for rapid and controlled inhibition of activation of the blood coagulation system. According to the direction of action, they can be either anticoagulants which inhibit blood clotting at different stages or fibrinolytics which accelerate the fibrin clot's destruction (t-PA, streptokinase, urokinase). The most common anticoagulants act directly on thrombin (dabigatran), factor Xa (rivaroxaban), factors VIIIa and V (drotrekogin), blocking the blood coagulation cascade at activation of factor X, activation of prothrombin or conversion of fibrinogen to fibrin. A separate class of compounds that block the formation of fibrin-platelet thrombus is platelet aggregation inhibitors.

As of today, there are no antithrombotic drugs that act on the final stage of thrombosis, i.e. on fibrin polymerization. To directly inhibit fibrin polymerization, silver nanoparticles or inhibitor peptides (such as GPRP) conjugated with albumin have been proposed. No such agents have passed preclinical trials.

Calix[4]arene C-145, a new compound of the calix[4]arene series, was created in the Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine. It

directly interacts with the fibrin polymerization site 'A-knob' due to its hydrophobic cup. The compound was characterized in the Department of protein structure and function of the Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine. Calix[4]arene C-145 directly inhibits the formation of fibrin protofibrils ($IS_{50} = 2.5 \times 10^{-6}$), preventing the formation of polymeric fibrin. It was shown to work efficiently *in vitro* and *in vivo*.

Therefore, the thesis was devoted to the study of compounds of the calix[4]arene series as antithrombotic agents, selection of conditions for their use *in vivo*, and preclinical studies.

For this purpose, calix[4]arene compounds were screened *in vitro* using the APTT (activated partial thromboplastin time) test to identify inhibitors of fibrin polymerization. The sodium salt of calyx[4]aren-tetramethylene bisphosphonic acid (calix[4]aren C-145) and the sodium salt of calyx[thia-4]aren-tetramethylene bisphosphonic acid (calix[4]aren C-145S) effectively prolonged the plasma clotting time, perhaps in relation to the inhibition of fibrin polymerization.

Turbidimetric studies of the selected compounds showed that C-145S was a more effective inhibitor of fibrin polymerization compared to C-145 that was previously proposed as a basis for an antithrombotic agent. However, C-145S also stimulated porcine aortic endothelial cell (PAE) proliferation, inhibited platelet aggregation and fibrin clot hydrolysis. These additional effects, much less pronounced in the case of C-145, can be considered a side effect that complicates *in vivo* application.

Therefore, we considered C-145 as a prototype for antithrombotic drug. First of all, it was necessary to select the dosage of C-145 for *in vivo* administration. The semi-lethal dose (LD₅₀) was determined to be 1420 mg/kg. According to the research, C-145 belongs to low-toxic compounds under oral administration. For therapeutic use, a dosage of 100 times less than the semi-lethal dose was used (12 mg/kg); it inhibited fibrin polymerization in laboratory animals.

The time of onset and duration of the antithrombotic effect of calix[4]arene C-145 under intravenous or oral administration (12 mg/kg) was studied in rats. The maximum antithrombotic effect of C-145 was observed immediately after intravenous and 4 h after

oral administration. Recovery of the parameters was observed 24 hours after administration.

A similar experiment was performed on laboratory rabbits, making it possible to evaluate the dynamics of hemostasis in individual animals during the experiment. The maximum antithrombotic effect tended to be observed 4-6 hours after administration.

The C-145 was tested as an antithrombotic agent *in vivo* under experimental pre-thrombotic conditions using spontaneously hypertensive SHR rats. Animals were kept on a cholesterol diet (3% cholesterol) for 2 months with 12 mg/kg C-145 daily, or on a high visceral fat diet (30%) for 6 months, with 12 mg/kg C-145 fed daily for the last two months. We found an increase in the procoagulating potential of blood plasma in rats of both experimental groups and reliable normalization of the coagulation system indices under these conditions. In particular, administration of C-145 normalized the content of protein C, fibrinogen and plasma clotting time in coagulation tests. There was also noted a significant reduction in the thickness of the aortic wall and a decrease in the percentage of congested tissue in the aortic wall.

In spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet (30%), hyaline dystrophy and cardiomyocyte death, myocardial structure disorders, development of edema, lymphocytic infiltration, and thinning or edema of vessels were detected. Application of C-145 allowed to avoid hyaline dystrophy as well as intimal splitting of cardiac vessels. The protective action of C-145 on cardiac tissue may be an additional important effect.

The effect of C-145 on cardiac muscle tissue was studied in experimental isoprotrenol-induced myocardial infarction. For this purpose, Wistar rats were injected once with isoprotrenol at 100 mg/kg and fed C-145 daily until withdrawal from the experiment for 14 days. C-145 had no effect on the amount of fibroblast remodeling of cardiac tissue in isoprotrenol-induced myocardial infarction, but it normalized cardiac vascular function and prevented perivascular edema. The test for soluble fibrin monomer complexes showed the absence of generalized activation of the blood coagulation system.

Thus, a low molecular weight antithrombotic compound (sodium salt of calix[4]arene-tetramethylene bisphosphonic acid (C-145) was proposed as a drug substance for creating an antithrombotic drug with a direct effect on fibrin polymerization. It was proved effective *in vitro* and *in vivo* and able to reduce the procoagulant potential of the plasma of laboratory animals in a pre-thrombotic state. The protective effect of C-145 on cardiac muscle tissue is a weighty additional characteristic.

The preclinical phase of research in accordance with GLP requirements was started: C-145 was shown to be a low-toxic compound in the acute toxicity test; sensitization test (OECD 406) was conducted; low mutagenic activity of C-145 was shown on strains of *Salmonella typhimurium* TA-98 and TA-100 with and without metabolic activation in a wide concentration range (Ames test).

The studies are a significant step towards introducing the new drug ‘Antithrombotic drug Calix[4]arene C-145’ which will allow us to proceed to the clinical phase of trials.

Keywords: hemostasis, fibrinogen, fibrin/fibrinogen, coagulation and anticoagulation, nanocomplex, *in vitro*, plasminogen/plasmin, calix[4]arenes, calcium, direct-acting anticoagulants, toxicity, rats, platelets, blood plasma.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Chernyshenko V., Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., **Didkivskiy V.**, Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E., Komisarenko S. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. *Ukr. Biochem. J.* 2018. 90(6): 21-30. <https://doi.org/10.15407/ubj90.06.021> – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Chernyshenko V. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Savchuk O. – проектування та виконання дослідження;

Cherenok S. – проектування та виконання дослідження;

Silenko O. – збір даних, інтерпретація результатів;

Negelia A. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Kasatkina L. – методологія, ресурси;

Pirogova L. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Didkivskiy V. – проведення агрегатометрії, проведення клотингових тестів, визначення динаміки росту клітин у культурі;

Yusova O. – візуалізація, ресурси, вичитка рукопису;

Kalchenko V. – методологія, ресурси;

Garmanchuk L. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Grinenko T. – методологія, ресурси;

Lugovskoy E. – адміністрування проєкту, дослідження, концептуалізація, підготовка чернетки рукопису, написання огляду та редагування;

Komisarenko S. – методологія, ресурси, інтерпретація результатів.

2. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Chernyshenko T.M., Platonova T.M. Protective action of N-stearoylethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet. *Ukr. Biochem. J.* 2020. 92(2): 60-70. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.060> – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Tkachenko O.– адміністрування проєкту, написання оригінальної чернетки;

Hudz Ie.– проєктування та виконання дослідження;

Kosiakova H.– виконання дослідження, візуалізація;

Klymenko P. –інтерпретація результатів;

Stohnii Y.– концептуалізація, рецензування та редагування;

Didkivskiy V.– створення моделі атеросклерозу;

Chernyshenko T.M.– ресурси, методологія;

Platonova T.M – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

3. **Didkivskiy V.**, Pavlenko A. Approbation of calix[4]arene C-145 as antithrombotic agent in vivo. *Biotechnologia acta*. 2022. 15(5): 41-46.

<https://doi.org/10.15407/biotech15.05.041>

Didkivskiy V.– проведення експерименту на тваринах і написання тексту статті;

Pavlenko A. – проєктування та виконання дослідження, концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису, візуалізація, вчитка рукопису.

4. **Didkivskiy V.A.**, Pavlenko A.O., Marunych R. Y., Selikhova A.O., Cherenok S. O., Todosiuk T.P., Shevchenko S.M. HPLC detection of antithrombotic calix[4]arene in blood plasma of animals. *Biotechnologia Acta*. 2022. 15(2): 51-52.

<https://doi.org/10.15407/biotech15.02.051>

Didkivskiy V.A. – проведення in vivo досліджень, введення каліксарену щурам, забір крові, визначення активованого часткового тромбoplastинового часу та протромбінового часу;

Pavlenko A.O. – проєктування та виконання дослідження;

Marunych R. Y.– проєктування та виконання дослідження;

Selikhova A.O. – збір даних, інтерпретація результатів;

Cherenok S. O. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Todosiuk T.P. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Shevchenko S.M. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

5. Chernyshenko V., Pirogova L., **Didkivskiy V.**, Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Kalchenko V., Makogonenko E., Lugovskoy E. Effects of calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma in vitro and in vivo. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2016. 10(3): 146-151.

Chernyshenko V. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Pirogova L. – проектування та виконання дослідження;

Didkivskiy V. – введення каліксарену щурам, забір крові, визначення загального гемостатичного потенціалу у плазмі крові щурів за умов введення каліксарену in vivo та in vitro;

Cherenok S. – збір даних, інтерпретація результатів;

Dosenko V. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Pashevin D. – методологія, ресурси;

Kalchenko V. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Makogonenko E. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису;

Lugovskoy E. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

6. Chernyshenko V., **Didkivskiy V.**, Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E. Head-to-head comparison of calix[4]arene bis-phosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analog as hemostasis effectors. *FEBS3+ Meeting - XIth Parnas Conference - Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”*. *Ukr. Biochem. J. Volume 90, Special Issue*, 2018.37.

7. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Platonova T. The impact of anti-inflammatory action of N-stearolyethanolamine on the development of atherosclerosis in spontaneously hypertensive rats taking cholesterol rich diet. *10th RECOOP Annual Project Review Meeting, Wroclaw, October 11-12, 2019:77*.

8. **Didkivskiy V.**, Chernyshenko V., Pirogova L., Kalchenko V., Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Nikolaenko T., Harmanchuk L. Calix[4]arene-based

antithrombotic medication: from *in silico* to *in vivo*. XII Український біохімічний конгрес (м. Тернопіль, 30 вересня - 4 жовтня 2019 р.), Тернопіль: Медична та клінічна хімія. 2019 Т. 21 №3 (додаток): 27.

9. **Didkivskiy V.**, Hrabovskiy O., Humenyuk A., Selikhova A., Banya M., Cherenok S., Chernyshenko V. Binding of calix[4]arene to the A-knob of fibrin: *in silico* proves *in vitro*. Clusters and nanostructured materials (CNM-6). Uzhhorod, October 5-9, 2020. 48-49.

10. Kucheriavyy Y., **Didkivskiy V.**, Selikhova A., Tokmakova Y., Cherenok S., Zhminko P., Chernyshenko V. Antithrombotic action of sodium salt of 5,11,17,23-bis (dihydroxyphosphoryl) methylcalix[4]arene *in vivo*. RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference. April 16, 2021, P 53.

11. Комісаренко С., Чернишенко В., **Дідківський В.** Створення прототипу лікарського препарату “Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145” та його доклінічні дослідження. Національна академія наук України у 2021 році / Видавець та виготовлювач Видавничий дім «Академперіодика» НАН України Київ : с 19.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1. Характеристика факторів системи зсідання крові	23
1.2. Характеристика механізмів активації факторів зсідання крові	33
1.3. Характеристика процесу полімеризації фібрину	34
1.4. Роль тромбоцитів у системі зсідання крові	36
1.5. Характеристика структури та функцій калікс[4]аренів	39
1.5.1. Структура калікс[4]аренів	39
1.5.2. Функції калікс[4]аренів	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	44
2.1 Характеристика об'єкту дослідження	44
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання	44
2.2.1. Реактиви	44
2.2.2. Витратні матеріали	45
2.2.3. Калікс[4]арен С-145	45
2.2.4. Розчини	46
2.2.5. Обладнання	46
2.3. Характеристика піддослідних тварин	47
2.4. Отримання плазми крові з крові щурів	47
2.4.1. Забір крові у щурів	47
2.4.2. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові	48
2.4.3. Отримання плазми крові	48
2.5. Методи, використані для дослідження властивостей калікс[4]арену С-145 in vitro	48
2.5.1. Активованій частковий тромбопластиновий час	48
2.5.2. Турбідиметричний аналіз плазми крові	49

2.5.3. Дослідження процесу агрегації тромбоцитів	49
2.5.4. Статистична обробка даних	50
2.5.5. МТТ-тест	50
2.6. Моделювання передтромботичного стану	50
2.7. Гістологія стінок аорти щурів	51
РОЗДІЛ 3. СКРИНІНГ СПОЛУК КАЛІКС[4]АРЕНОВОГО РЯДУ ЯК ІНГІБІТОРІВ ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ ФІБРИНУ IN VITRO	52
РОЗДІЛ 4. ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ С-145 ТА С-145S НА КОМПОНЕНТИ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ IN VITRO.....	56
РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ LD50 ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ЗАСІБ КАЛІКС[4]АРЕН С-145»	62
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОДИНАМІКИ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-145 ЗА ПЕРОРАЛЬНОГО ТА ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ.....	69
6.1. Динаміка появи та виведення з кровотоку калікс[4]арену С-145 у кровотоці щурів	69
6.2. Динаміка появи та виведення з кровотоку кролів калікс[4]арену С-145..	72
6.3. Побудова калібрувального графіка залежності часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ від концентрації калікс[4]арену С-145	74
РОЗДІЛ 7. АПРОБАЦІЯ ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ЗАСІБ КАЛІКС[4]АРЕН С-145» ЗА УМОВ ПЕРЕДТРОМБОТИЧНОГО СТАНУ	80
7.1. Дія С-145 на компоненти системи гемостазу за умов дієти з високим вмістом холестеролу	80
7.2. Дія С-145 на компоненти системи гемостазу за умов високожирової дієти.....	91
7.3. Дія С-145 на тканину серця спонтанно гіпертензивних щурів за умов високожирової дієти.....	101

РОЗДІЛ 8. АПРОБАЦІЯ ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ЗАСІБ КАЛІКС[4]АРЕН С-145» ЗА УМОВ ІЗОПРОТРЕНОЛОВОГО ІНФАРКТУ МІОКАРДУ.....	107
8.1. Вироблення моделі та електрокардіографічні дослідження.....	107
8.2. Гістологічні дослідження.....	110
8.3. Рівень розчинного фібрину як маркер активації системи зсідання крові	114
РОЗДІЛ 9. ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «КАЛІКС[4]АРЕН С-145».....	116
9.1. Тест на сенсibiliзацію шкіри.....	116
9.2. Тест на мутагенність	117
РОЗДІЛ 10. СТВОРЕННЯ ПРОТОТИПУ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ ...	120
РОЗДІЛ 11. ЗАКЛЮЧЕННЯ	124
ВИСНОВКИ.....	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128
Додаток 1.....	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АЧТЧ – активований частковий тромбопластиновий час;
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
- ВМК – високомолекулярний кініноген;
- ЗТПК – збагачена тромбоцитами плазма крові;
- ЕДТА – етилендіамінтетраацетат;
- ПЧ – протромбіновий час;
- СЗК – система зсідання крові;
- ТАП – тканинний активатор плазміногену;
- ADP – аденозиндифосфат;
- C-145 – 5,11,17,23-тетракіс[біс(дигідроксифосфорил)метил] калікс[4]арен;
- C-192 – 5,11,17,23-тетракіс[біс(дигідроксифосфорил)метил] калікс[4]арен;
- EGF – епідермальний фактор росту;
- GLP – належна лабораторна практика;
- LD50 – смертельна доза 50 %;
- OECD – Організація економічного співробітництва та розвитку;
- PAI-1 – інгібітор активатора плазміногену 1;
- SHR – спонтанно-гіпертензивні щурі;
- TBS – Трис-буферний сольовий розчин
- TF – тканинний фактор.

ВСТУП

Актуальність теми. Основною функцією системи гемостазу є підтримка цілісності системи кровообігу і організму в цілому, яка реалізується в умовах динамічної рівноваги і взаємодії між її прокоагулянтною, фібринолітичною та антикоагулянтною ланками. Порушення балансу в системі гемостазу може бути причиною внутрішньосудинного тромбоутворення або кровотеч і призводити до тяжких наслідків, зокрема, до розвитку тромбозів, які, за даними ВООЗ, є головною причиною смертності та інвалідизації осіб працездатного віку.

З огляду на це, пошук нових підходів для попередження внутрішньосудинного тромбоутворення є актуальним питанням біохімії та клінічної медицини. На сьогодні активно досліджується можливість створення антитромботичних препаратів, які б спрямовано діяли на заключний етап тромбоутворення – полімеризацію фібрину.

Раніше було показано, що натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145) ефективно інгібує полімеризацію фібрину завдяки своїй здатності прямо блокувати центр «А» полімеризації фібрину. Як низькомолекулярну неімуногенну сполуку, С-145 можна розглядати як потенційну основу для створення прототипу антитромботичного препарату нового типу.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи був вибір сполуки калікс[4]аренового ряду з антитромботичними властивостями, підбір умов для її застосування *in vivo*, а також проведення доклінічних досліджень.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання.

1. Провести скринінг сполук калікс[4]аренового ряду *in vitro* з метою виявлення серед них інгібіторів полімеризації фібрину.

2. На основі турбідиметричних досліджень та аналізу дії на агрегацію тромбоцитів та проліферацію ендотеліоцитів, обрати сполуку з антитромботичними властивостями.

3. Визначити напівлетальну дозу (LD50) обраної сполуки калікс[4]аренового ряду.

4. Дослідити час настання та тривалість антитромботичного ефекту обраної сполуки калікс[4]аренового ряду після внутрішньовенного або перорального введення щурам та кролям.

5. Дослідити антитромботичний ефект обраної сполуки калікс[4]аренового ряду за умов експериментального передтромботичного стану у спонтанно гіпертензивних щурів лінії SHR, які отримували дієту з високим вмістом жиру (30 %) або холестеролу (3 %).

6. Дослідити ефект обраної сполуки калікс[4]аренового ряду на тканину серцевого м'язу та ключові параметри зсідання крові за умов експериментального ізопротренол-індукованого інфаркту міокарду щурів.

7. Провести тест обраної сполуки калікс[4]аренового ряду на індукцію генних мутацій у *Salmonella typhimurium* (тест Еймса), згідно з OECD 471 і вимогами GLP.

Об'єкт дослідження. Натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145).

Предмет дослідження. Антиполімеризаційний ефект натрієвої солі калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145).

Методи дослідження. Дію на полімеризацію фібрину вивчали методом турбідиметрії та за часом зсідання плазми крові в тесті активованій частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ). Визначали базові параметри системи зсідання крові за умов введення калікс[4]арену С-145 лабораторним тваринам, зокрема розчинні фібрин-мономерні комплекси, фібриноген, протеїн С, час зсідання плазми крові в тестах протромбіновий час (ПЧ) та АЧТЧ. Гістологічні дослідження стінки аорти та серцевого м'язу лабораторних тварин за умов введення калікс[4]арену С-145 проводили за допомогою профарбовування гематоксиліном та еозином. Кількісний аналіз мікрофотографій виконували у програмі ImageJ. Доклінічні дослідження калікс[4]арену С-145, зокрема тест на

здатність індукувати генні мутації у *Salmonella typhimurium* (тест Еймса) та тест на гостру токсичність проводили згідно з OECD 471 та OECD 425 відповідно.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше доведено ефективність калікс[4]арену С-145 як прямого інгібітора полімеризації фібрину *in vivo* для зниження прокоагулянтного потенціалу зсідання крові.

Практичне значення одержаних результатів. У ході роботи визначено значний антиполімеризаційний ефект калікс[4]арену С-145 та проведено його апробацію *in vivo* для зниження прокоагулянтного потенціалу. Зокрема, обрано ефективну дозу, визначено час появи у кровотоці за умов внутрішньовенного та перорального введення лабораторним тваринам. Показано ефективну антитромботичну дію за умов експериментального інфаркту міокарду, високожирової та холестерольної дієти у щурів. Розпочато проведення доклінічних досліджень, зокрема, визначено гостру токсичність та показано відсутність мутагенного ефекту. Представлені в дисертації результати свідчать, що калікс[4]арен С-145 як низькомолекулярна та потенційно неімуногенна сполука видається перспективним антитромботичним агентом.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено аналіз даних літератури за темою дисертації, основний обсяг експериментальних досліджень, статистичний аналіз одержаних результатів. Здобувач самостійно проводив дослідження *in vivo*, визначав ключові параметри системи зсідання крові, аналізував гістологічні зміни у стінці аорти та у серцевому м'язі дослідних тварин. Мету, завдання і план роботи здобувачем сформульовано разом з науковим керівником (2018-2019рр.), чл.-кор. НАН України Е. В. Луговським. Інтерпретовано результати разом із науковим керівником – д.б.н. В. О. Чернишенком.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 0121U110361 «Створення прототипу лікарського препарату «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» та його доклінічні дослідження», 2021; 0119U000660 «Розробка прототипу лікарського препарату з антитромботичною та

проангіогенною дією на основі калікс[4]арену С-145», 2019; 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих антифібринолітичних та антитромботичних агентів», 2015-2019; 0123U100894 «Створення сучасних каліксаренових регуляторів біохімічних процесів для медицини та біотехнології», 2023-2024 рр.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були повідомлені та обговорені на вітчизняних та міжнародних конференціях: FEBS3+ Meeting-XIth Parnas Conference-Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (3-5 вересня 2018, Київ, Україна); 10th RECOOP Annual Project Review Meeting, (October 11-12 2019, Wroclaw, Poland); XII Український біохімічний конгрес (30 вересня - 4 жовтня 2019 р м. Тернопіль, Україна); Clusters and nanostructured materials (CNM-6) (October 5-9 2020, Uzhhorod, Ukraine); RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference (April 16, 2021).

Публікації. Всього за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей, 6 тез.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 106 посилань, та додатків. Дисертаційна робота викладена на 143 сторінках, містить 59 рисунків та 9 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика факторів системи зсідання крові

Система зсідання крові ссавців, у тому числі і людини, – це каскад ензиматичних реакцій за участі серинових протеїназ, результатом дії якого є утворення і полімеризація фібрину та активація тромбоцитів, що призводить до формування фібриново-тромбоцитарного згустку. Так реалізується захисний механізм, який запобігає надмірній втраті крові після травми і забезпечує нормальний гемостаз.

Варто відмітити, що окрім основної задачі – зупинки кровотечі – каскад зсідання крові приймає участь в захисті організму від різноманітних внутрішніх пошкоджень та крововиливів, мікротравм, які постійно виникають при м'язових навантаженнях, загоюванні ран, імунній відповіді, формуванню судинної системи при ангіогенезі.

Важливою особливістю зсідання крові є те, що всі основні реакції відбуваються не у самій плазмі крові, а на фосфоліпідних мембранах різних клітин, а також мікровезикул, які ці клітини вивільняють [1].

Важлива роль у реалізації процесів гемостазу належить плазменим факторам системи зсідання крові (Табл. 1.1) та тромбоцитарним факторам, які беруть участь в утворенні фібринового згустку [2].

Таблиця 1.1

Фактори зсідання крові та інгібітори [3]

Компонент	Молекулярна маса, kDa	Концентрація в плазмі крові		Термін напівжиття, год.
		нМ	мг/л	
Фактор I (фібриноген)	340	7600	2600	90-120
Фактор II (протромбін)	72	1400	100	60
Фактор III (тканинний тромбoplastин)	37			
Іони кальцію Ca^{2+} (фактор IV)				
Фактор V (проакселерин)	330	20-30	6,6-10	12-20
Фактор VI	Видалений із класифікації, оскільки є активною формою фактора V (Фактор Va)			
Фактор VII (проконвертин)	50	10	0,5-1	5-6
Фактор VIII (анти-гемофільний A)	330	0,7	0,1-0,2	7-12
Фактор IX (фактор Крістмаса)	57	90	3-5	20-30
Фактор X (фактор Стюарта-Прауера)	56	170	10-12	20-40
Фактор XI	160	30	4,8-6	65
Фактор XII (фактор Хагемана)	80	375	30-40	60
Фактор XIII (фібринстабілізуючий)	340-320	70-90	20-30	100-150

Фібриноген (фактор I) – це мультидоменний глікопротеїн масою 340 kDa, який синтезується в печінці. За своїми властивостями фібриноген класифікується як еуглобулін, адже він розчинний тільки в слабких сольових розчинах, випадає в осад при зниженні іонної сили розчину та висолюється при її підвищенні. У системі зсідання крові фібриноген займає особливе місце, оскільки є єдиним протеїном, який під дією тромбіну перетворюється на фібрин з подальшим утворенням полімерного фібрину, що створює основу згустку, що запобігає

крововтраті. Отже, весь каскад системи зсідання крові спрямований на активацію протромбіну до тромбіну та перетворення фібриногену на фібрин.

Молекула фібриногену складається з двох однакових субодиниць, симетрично з'єднаних трьома дисульфідними зв'язками. Кожна субодиниця містить три поліпептидні ланцюги – $A\alpha$, $B\beta$ та γ . Загальна структура молекули може бути позначена як $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$. Шість поліпептидних ланцюгів формують три вузли – компактно відособлені області, іменовані доменами. Центральний домен E містить N-кінцеві залишки трьох пар поліпептидних ланцюгів. Два симетричних периферичних домена D містять C-кінцеві залишки $B\beta$ - і γ -ланцюгів і C-кінцеві відгалуження α -ланцюгів, або αC -регіони. У центральному домені знаходяться по два фібринопептиди A і B. Довжина молекули фібриногену складає 45 нм ($475 \pm 25 \text{ \AA}$).

У плазмі людини вміст фібриногену становить 2,0-3,0 г/л, при патологічних станах – 1,0-10 г/л. Біологічний період напівжиття фібриногену людини становить 3-5 днів [4, 5].

Однією з основних функцій фібриногену є його здатність під дією тромбіну перетворюватися на мономерний фібрин, який спонтанно полімеризується і створює волокнисту мережу фібрину, що служить основою згустку, що попереджує крововтрату.

Під дією тромбіну, на фібриноген від кожної пари $A\alpha$ -ланцюгів відщеплюються фібринопептиди A і B. Фібриноген, представлений як $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$, перетворюється на фібрин – $(\alpha, \beta, \gamma)_2$. При цьому в домені E утворюється дві пари активних центрів полімеризації, що взаємодіють з комплементарними до них центрами в домені D. Молекули фібрину агрегують у протофібрили, що ростуть у різних напрямках, створюючи фібриновий гель.

Фібриногену притаманні важливі функції у фізіологічних та патологічних процесах: репаративних, запальних, метастазуванні. Його концентрація корелює з в'язкістю крові, визначає процес агрегації тромбоцитів та еритроцитів та впливає на адгезію лейкоцитів. Фібриноген прискорює активацію фактору XIII системи

зсідання крові та взаємодіє з низкою білків: фібронектином, тромбоспондином, колагеном (тип IV), фактором фон Віллебранда, альфа₂-антиплазміном.

Протромбін (фактор II) – вітамін К-залежний одноланцюговий глікопротеїн, що складається із 579 амінокислотних залишків. Він має молекулярну масу 72 kDa. Циркулює у плазмі у вигляді проферменту в концентрації 100 мкг/мл (1400 нМ). Рівень протромбіну істотно змінюється при захворюваннях печінки, К-гіповітамінозах, при інфекційних процесах та інших патологічних станах. Як і фібриноген, протромбін синтезується в печінці, де піддається γ -карбоксилюванню. Ці γ -карбоксиглутамінові залишки модифікують Gla-домен, розташований у фрагменті 1 молекули протромбіну. Gla-домен є важливим для кальцій-залежного зв'язування фосфоліпідів з протромбіном, що необхідно для перетворення протромбіну на активний α -тромбін. Протромбін фізіологічно активується протромбіназним комплексом, який включає фактор Ха, фактор Va, фосфоліпиди та кальцій. Після того, як негативно заряджені фосфоліпиди зв'язуються з протромбіном, протромбіназний комплекс перетворює протромбін на тромбін, що слугує запуском перетворення фібриногену на фібрин. Більше того, на поверхні ендотелійних клітин тромбін утворює комплекс з тромбомодуліном, активуючи протеїн С, який проявляє антикоагулянтну активність інгібуванням фактора Va (проакселерин), позбавляючи цим протромбіназний комплекс його найважливішого кофактора. Такий шлях негативного зворотного зв'язку дозволяє протромбіну бути «непрямим» антикоагулянтом [6].

Тромбопластин (фактор III) – трансмембранний глікопротеїн з молекулярною масою 37 kDa, який міститься в мембранах ендотелійних та гладком'язових клітин, моноцитів та макрофагів. Протеїн складається з 263 амінокислотних залишків, що утворюють три домени. Тромбопластин (тканинний фактор) є на поверхні практично усіх клітин, окрім ендотеліоцитів, та сприяє згортанню крові за рахунок запуску внутрішнього шляху зсідання, який завершується перетворенням протромбіну в тромбін [7]. Тканинний фактор є

інтегральним мембранним рецептором для факторів VII та VIIa і належить до сімейства інтерферон/цитокінових рецепторів [8]. У нормі тканинний фактор не експресований на поверхні клітин, що контактують з кров'ю, зокрема, на ендотелійних клітинах або лейкоцитах периферичної крові, проте тканинний фактор експресований на фібробластах і перицитах під ендотелійною поверхнею судин і вступає у взаємодію з кров'ю при пошкодженні ендотелію. При пошкодженні стінок судин або активації ендотелію субендотелійний тканинний фактор експонується/експресується у кровотік.

Тканинний фактор спільно з FVII становить зовнішній шлях зсідання, «відповідальний» за активацію факторів IX та X, з утворенням невеликої кількості активованих форм. У той же час, активація зовнішнього шляху стає критичною в умовах грамнегативного сепсису і веде до коагулопатії.

Тканинний фактор утворює Ca^{2+} -залежний мембранно-пов'язаний 1:1 комплекс із факторами VII/VIIa, який активує фактори IX та X. TF пов'язується з фактором VII або VIIa з високою авідністю. Зв'язуючись з фактором VII, TF підвищує рівень його активації різними ензимами. У цьому випадку TF виступає у ролі алостеричного регулятора, підвищуючи каталітичну активність ензимів як щодо невеликих пептидів, так і макромолекулярних субстратів [9].

Іони кальцію (IV фактор) виступають каталізатором перетворення неактивних форм інших плазмених факторів на активні та беруть безпосередню участь у зсіданні крові на різних етапах [10].

Проакселерин (фактор V) – протеїн масою 330 kDa, неактивна форма фактора VI (акселерину). На відміну від більшості інших факторів зсідання, не є ензиматично активним, але функціонує як кофактор [11].

Акселерин (фактор VI) – глобулін плазми крові, активна форма фактора V. Утворюється в печінці, не є проензимом. Молекула акселерину є каталізатором перетворення протромбіну на тромбін шляхом протеолітичного розщеплення за участі фактора Ха (фактор Стюарта-Прауера) [12].

Проконвертин (фактор VII) – одноланцюговий вітамін К-залежний глікопротеїн молекулярною масою 50 kDa, який синтезується в печінці. Циркулює в кровотоці в концентрації 10 нМ як зимоген, що складається з 416 амінокислот. Фактор VII перетворюється на активну форму VIIa під дією тромбіну, факторів IXa, Xa, VIIa, XIIa, калікреїну та плазміну шляхом розщеплення пептидного зв'язку Arg152-Ile153. Активована форма фактору – VIIa – у еквімолярному співвідношенні зв'язується з тканинним фактором, утворюючи комплекс, що активує фактори IX та X, тим самим беручи участь у зовнішньому шляху зсідання крові [13].

Антигемофільний глобулін А (фактор VIII) – глікопротеїн з молекулярною масою 330 kDa, що циркулює у плазмі крові людини у вигляді нековалентного комплексу з фактором фон Віллебранда, який виконує роль білкового носія, що захищає фактор VIII *in vivo* від протеолітичної деградації. Це неактивний одноланцюговий протеїн з 2332 амінокислот, який містить три типи доменів А, В і С, розташованих у наступній послідовності від NH₂-кінця: А1-А2-В-А3-С1-С2. Основним місцем синтезу фактора VIII є гепатоцити. Концентрація фактора VIII у плазмі становить 0,1 мкг/мл (0,7 нМ). Час напівжиття фактора VIII, що знаходиться в комплексі з фактором vWF, становить 10-12 годин і зменшується за його відсутності. Вроджений ізольований дефіцит фактора VIII є причиною гемофілії А, яка успадковується зчеплено з Х-хромосомою та проявляється кровотечами; її захворюваність становить 2-3 чоловіки на 10 тисяч.

Фактор VIII прискорює перетворення фактора X у фактор Xa у присутності фактора IXa, кальцію та фосфоліпідів. Для своєї дії фактор VIII повинен зазнавати незначного протеолізу тромбіном або іншими протеїназами. Інгібітори антигемофільного глобуліну А – найбільш поширені патогенні антитіла, спрямовані проти факторів зсідання крові.

Крістмас-фактор, або антигемофільний глобулін В (фактор IX) є вітамін К-залежний глікопротеїн масою 57 kDa, що складається з 415 амінокислот. Синтезується в печінці. Є пунктом конвергенції двох шляхів коагуляції та

активується, відповідно, обома шляхами – зовнішнім та внутрішнім. В середньому концентрація фактора IX у плазмі становить 5 мкг/мл; активність фактора IX та рівень його антигену зростають з віком. Вроджений дефіцит фактора IX є причиною гемофілії В – одного з найпоширеніших вроджених захворювань, що проявляються кровотечею. Час напівжиття фактора IX – 18-24 год.

Фізіологічна активація фактора IX відбувається у присутності фактору VIIa (конвертину) у комплексі з тканинним активатором та фосфоліпідами та/або фактора XIa (фактор Розенталя) у присутності Ca^{2+} . В результаті активації у двох місцях розщеплюється поліпептидний ланцюг, що супроводжується утворенням дволанцюжкової молекули фактора IXa (молекулярна маса 45 kDa) та активаційного пептиду з молекулярною масою 11 kDa. Після відщеплення активаційного пептиду відбувається конформаційна перебудова та формування активного центру, що дає можливість взаємодіяти з фактором X. Активація фактора X у його активну форму – фактор Xa є основною функцією фактора IX.

Фактор Стюарта-Прауера (фактор X) – вітамін К-залежний глікопротеїн молекулярною масою 59 kDa, що циркулює у плазмі крові як проензим у концентрації 170 нМ. Активована форма фактора X – фактор Xa у комплексі з фактором Va та фосфоліпідною мембраною активує протромбін. Синтезується у печінці.

Фактор X активується як зовнішнім, так і внутрішнім шляхами. В обох випадках реакція каталізується Ca^{2+} -залежним мембранно-зв'язаним макромолекулярним комплексом, що складається з факторів IXa та VIIa (внутрішня теназа) та/або з факторів VIa та TF (зовнішня теназа). Фактор X зв'язується з мембраною до взаємодії з обома активуючими комплексами.

Фактор Xa активує протромбін у реакції, подібної до активації фактора X фактором IXa. Фактор Xa у присутності Ca^{2+} та аніонних фосфоліпідів утворює 1:1 стехіометричний комплекс із фактором Va. Утворений протромбіназний

комплекс активує протромбін майже в 105 разів швидше, ніж фактор Ха сам по собі.

Фактор Розенталя (фактор XI) – глікопротеїн молекулярною масою 165 kDa, що циркулює у плазмі крові у концентрації 30 нМ. Активована форма фактора XIa бере участь не в ініціації, а у підтримці процесу зсідання крові. Синтезується у печінці та циркулює у кровотоці у вигляді комплексу з високомолекулярним кініногеном (ВМК). Фактор XIa складається з двох ідентичних субодиниць, що складаються з важкого (Mr 50 kDa) та легкого (Mr 30 kDa) поліпептидних ланцюгів. Субодиниці з'єднані одним дисульфідним зв'язком, а важкий і легкий ланцюги – трьома дисульфідними зв'язками. На відміну від інших факторів системи зсідання крові, фактор XIa містить два активні центри. Подібно до інших факторів систем зсідання крові та фібринолізу, важкий ланцюг фактора виконує регуляторну роль у прояві ферментативної активності, визначає субстратну специфічність та впливає на каталітичну ефективність фактора XIa при взаємодії з субстратом, фактором IX та кофактором – ВМК. Функція фактора XIa полягає у активації фактора IX шляхом обмеженого протеолізу.

Фактор Хагемана (фактор XII) – глікопротеїн з молекулярною масою 80 kDa, що циркулює у плазмі крові у концентрації 375 нМ у вигляді проферменту активної протеїнази фактора XIIa. Синтезується гепатоцитами. Концентрація FXII у плазмі становить 29-40 мкг/мл; дослідження *in vitro* свідчать про підвищення концентрації FXII під дією естрогену.

Складається з важкого ланцюга (353 амінокислотні залишки) і легкого ланцюга (243 залишки), що утримуються разом дисульфідним зв'язком. Фактор Хагемана має кілька доменів, а саме лідерний пептид, домен фібронектину II типу, домен, подібний до епідермального фактору росту (EGF), домен фібронектину I типу, другий домен, подібний до EGF, крингл-домен, багатий на пролін регіон та каталітичний домен.

Фактор XII є одним із ключових компонентів інтеграції основних захисних властивостей систем крові, що включає фібриноліз, систему комплементу та

запалення. Фактор XII також називається фактором контакту, оскільки відіграє важливу роль в ініціації коагуляції при контакті крові або плазми зі склом або каоліном. Хоча фактор XII не є критичним в ініціації коагуляції *in vivo*, яку роль він грає в гемостазі, остаточно досі не зрозуміло. Протеолітичне розщеплення перетворює зимоген XII фактору на активований XIIa фактор. *In vitro* фактор XII може бути активований плазміном, тоді як механізм активації *in vivo* ще досліджується.

Множинні дослідження показали, що активація FXII сприяє активації системи комплементу та фібринолізу, звільненню нейтрофілів і IL-6, а також розвитку незворотної гіпотензії; проте цей механізм не відповідає за активацію внутрішньосудинного зсідання крові: у цьому сенсі «відповідальність» несе тканинний фактор. Активність фактора XIIa регулюється інгібітором протеїназ плазми крові – C1-інгібітором естерази [14].

За патологічних станів фактор Хагемана бере участь у формуванні тромбів та тромбоемболічних розладах, таких як ішемічний інсульт [15].

Фібрин-стабілізуючий фактор (фактор XIII) – глікопротеїн молекулярною масою 320 kDa, який належить до родини трансглютаміназ. Він синтезується у печінці та у тромбоцитах. У плазмі крові більшість неактивного фактора XIII пов'язана з фібриногеном [16]. Активація фактора XIII відбувається за допомогою тромбіну способом обмеженого протеолізу з неактивного попередника. У кровотоці він циркулює як проензим, який складається з двох каталітичних субодиниць А та двох некаталітичних субодиниць В. Субодиниці А синтезуються в мегакаріоцитах, моноцитах/макрофагах і плаценті, тоді як В – в печінці. За присутності фібрину тромбін активує фактор XIII у фактор XIIIa, який каталізує утворення міжмолекулярних зв'язків не тільки між мономерами фібрину, але і серед інгібіторів α 2-плазміну, фібронектину та колагену. Ці міжмолекулярні реакції зшивання сприяють гемостазу та загоєнню ран [17].

Як і більшість інших ензимів, фактор XIII виконує в гемостазі кілька функцій:

- стабілізує фібриновий згусток шляхом утворення ковалентних зв'язків між γ -ланцюгами мономерів фібрину,
- прикріплює фібриновий згусток до фібронектину позаклітинного матриксу,
- бере участь у зв'язуванні $\alpha 2$ -антиплазміну з фібрином, що сприяє запобіганню передчасному лізису фібринового згустку,
- необхідний тромбоцитам для полімеризації актину, міозину та інших білків цитоскелета, які використовуються при ретракції фібринового згустку.

Серед тромбоцитарних факторів системи зсідання крові найважливішими є фактор Фон Віллебранда, фактор тромбоцитів 4 та тромбоксан А2 (ТХА2). Фактор Фон Віллебранда – адгезивний глікопротеїн, який циркулює в плазмі у вигляді мультимерів [18]. Синтезується ендотелійними клітинами та мегакаріоцитами. Він вивільняється із ендотелійних тілець Вейбел-Палада та α -гранул тромбоцитів. Фактор Фон Віллебранда відіграє центральну роль при первинному гемостазі, оскільки він опосередковує адгезію тромбоцитів до субендотелію в місцях ураження судин. Більше того, він є носієм і стабілізатором циркулюючого фактора VIII [19]. Фактор тромбоцитів 4 – це білок α -гранул, що виділяється тромбоцитами. ФТ4 зазвичай зв'язується з протеогліканом-носієм масою 53 kDa. Він зв'язує гепарин і нейтралізує його, а також є потужним антиангіогенним фактором *in vivo*, що може пригнічувати або посилювати виживання гематопоетичних клітин-попередників. Також 4 тромбоцитарний фактор активізує базофіли та тучні клітини для вивільнення гістаміну, стимулює приєднання нейтрофілів до ендотелію і сприяє виживанню моноцитів [20]. Тромбоксан А2 є нестабільним проміжним продуктом між ендопероксидами простагландину та тромбоксаном В2. З'єднання має біциклічну структуру оксанооксетану. Тромбоксан А2 виробляється активованими тромбоцитами і має протромботичні властивості: він стимулює активацію нових тромбоцитів, а також збільшує агрегацію тромбоцитів [21].

1.2. Характеристика механізмів активації факторів зсідання крові

До процесу зсідання крові залучені два механізми: внутрішній і зовнішній. Перший «вмикається» при порушенні судинної стінки. Коли кров контактує з пошкодженою поверхнею судини, активуються фактори контактної фази зсідання крові, що, в свою чергу, діє на фактор XI, тим самим активуючи його. Це початок першої фази внутрішнього механізму зсідання крові. Активований фактор XIa активує IX, перетворюючи його в IXa. Він в свою чергу активує VIIIa, XIa і VIIIa які, в присутності іонів кальцію, активують фактор X, котрий з плазменним фактором V і фосфоліпідним фактором 3 тромбоцитів в присутності іонів кальцію утворюють активну речовину – тромбокіназу. Під дією тромбокінази протромбін перетворюється в тромбін, що є початком другої фази внутрішнього механізму. Тромбін діє на фібриноген, перетворюючи його на фібрин. Невелика його кількість активує фактор XIII (фібрин-стабілізуючий), який робить фібрин нерозчинним. Цим закінчується третя фаза зсідання крові. Внутрішній механізм протікає повільно – 5-10 хвилин. Більшість часу йде на першу фазу, друга і третя триває всього 20-30 секунд. За цим механізмом проходить зсідання крові і в пробірці [22].

Зовнішній механізм «вмикається» при порушенні цілісності тканин. З них в кров поступає тканинний тромбопластин (фактор III), що взаємодіє з фактор VIII плазми і в присутності іонів кальцію активує фактор X. Активований XIa разом з фактором V в присутності іонів кальцію діє, як тромбокіназа, тобто перетворює протромбін в тромбін. Зовнішній механізм триває 20 секунд, і саме він є пусковим для внутрішнього. Зв'язок між двома механізмами зсідання крові відбувається за допомогою калікреїн-кінінової системи. Вона стимулюється XIIa фактором і прискорює активацію факторів XI і VII, тобто компонентів внутрішнього та зовнішнього механізмів. В процесі зсідання утворюється згусток, ретракція (стискання) якого починається через 15-20 хвилин.

1.3. Характеристика процесу полімеризації фібрину

Молекула фібриногену являє собою гомодимерний глікопротеїн масою 340 kDa, що складається з поліпептидних ланцюгів $2A\alpha$, $2B\beta$ та 2γ , з'єднаних 29 дисульфідними містками. Синтез фібриногену відбувається в основному в гепатоцитах. Збірка шести ланцюгів відбувається поетапно, коли одиночні ланцюги збираються спочатку в комплекси $A\alpha$ - γ та $B\beta$ - γ , потім у півмолекули $A\alpha/B\beta/\gamma$ і, нарешті, у два гексамерні комплекси ($A\alpha/B\beta/\gamma$). Всі шість фібриногенних ланцюгів поєднані своїми N-кінцями, розташованими в центральному "E-регіоні", і простягаються назовні у вигляді згорнутої котушки – суперспіральної (шарнірної) ділянки. Ланцюги $B\beta$ і γ закінчуються в глобулярних областях, відомих як βC та γC модулі відповідно. Ці регіони у сукупності складають так званий «D-регіон». Ланцюги $A\alpha$ – найдовші; в кінці області згорнутої котушки кожен ланцюг проходить різку серію повторів, за якою розташований кулеподібний αC -регіон [23]. Протеолітичне розщеплення молекули фібриногену в межах суперспіральної ділянки призводить до утворення одного фрагменту E і двох фрагментів D, що відповідають регіонам E і D відповідно. Кожен D-регіон містить 2 модулі, утворені C-кінцями γ -ланцюга (γ -модуль) та $B\beta$ -ланцюга (β -модуля). γ -модуль містить порожнину (центр полімеризації «а»), який відіграє важливу роль у полімеризації фібрину. B -модуль також має порожнину, 5 β -ланцюговий отвір або b-hole (центр полімеризації «b»), який також може брати участь у полімеризації фібрину [24].

Полімеризацію фібрину ініціює тромбін, що спочатку розщеплює зв'язок Аргінін16-Гліцин17 в $A\alpha$ -ланцюгах фібриногену людини, вивільняючи фібринопептид А (FrA, молекулярна маса близько 2000 Да). Розщеплення призводить до вивільнення N-кінцевої послідовності Гліцин17-Пролін18-Аргінін19 у фібринових α -ланцюгах (тобто фібриногенових $A\alpha$ -ланцюгах без FrA), що називається A-кноб (центр полімеризації «A»). A-центри «входять» в загибини центрів полімеризації «а», розташовані в γ -модулях іншої молекули фібрину, і їх взаємодія називається A:a-зв'язуванням. Розщеплення FrA та

зв'язування А:а з утворенням полімеру desA-фібрину, є необхідними та достатніми для утворення згустків фібрину. Існують також В-центри, які стають відкритими після того, як тромбін розщеплює зв'язок Аргінін¹⁴-Гліцин¹⁵ у Вβ-ланцюзі, після чого відбувається вивільнення фібринопептиду В (FpВ, молекулярна маса близько 2500 Da) [25]. FpА відщеплюється швидше, ніж FpВ, але далі, в процесі полімеризації, швидкість вивільнення FpВ збільшується, оскільки він переважно вивільняється з полімерів. Відповідно до цього, пептид Гліцин-Гістидин-Аргінін-Пролін, міметик В-центру, не перешкоджає утворенню фібринового згустку, оскільки, швидше за все, взаємодії, опосередковані В-центром, не потрібні для утворення протофібрил або для їх латеральної асоціації. Агрегація мономерів фібрину (самозбирання фібринових волокон) включає перехід молекули із стану глобули в стан волокна. В утворенні агрегату фібрину беруть участь водневі і електростатичні зв'язки і сили гідрофобної взаємодії. На стадії А:а-зв'язування агрегат фібрину зазнає зміни, обумовлені ферментативною дією фібрин-стабілізуючого фактора XIIIа (або фібринолігази). Під дією цього фактора утворюються міцні ковалентні зв'язки між поліпептидними ланцюжками молекул агрегату фібрину, внаслідок чого він стабілізується у полімер фібрину, нерозчинний в концентрованих розчинах сечовини [26].

У здорових людей фібриноген циркулює в плазмі крові у високих концентраціях (2-5 мг/мл), однак під час гострого запалення рівень фібриногену в плазмі може перевищувати 7 мг/мл [27]. Фібриновий полімер є кінцевим продуктом ферментативного каскаду зсідання крові. Формування полімерної фібринової сітки *in vivo*, разом з адгезією та агрегацією тромбоцитів, є ключовими подіями в процесі зупинки кровотечі в місці пошкодження (гемостазі), а також при патологічній закупорці судин (тромбозі). Полімеризація фібрину включає ряд послідовних реакцій, кожна з яких впливає на остаточну структуру та властивості фібринового каркаса. Ці властивості визначають розвиток та протікання різних захворювань, таких як інфаркт, ішемічний інсульт, рак, травма, хірургічні та акушерські ускладнення, спадкові та набуті коагулопатії, тромбоцитопатії [28].

1.4. Роль тромбоцитів у системі зсідання крові

Тромбоцити – це невеликі ануклеарні клітинні утворення діаметром 1-2 мкм, що утворюються з мегакаріоцитів у кістковому мозку. У цитоплазмі тромбоцитів містяться α та щільні гранули, які вивільняють специфічні медіатори, необхідні для ефективного гемостазу, а зовнішня частина тромбоцитів покрита рецепторами, чутливими до протеїнів, які активують каскад реакцій первинного гемостазу. Середня тривалість життя тромбоцитів у кров'яному руслі людини становить 8-10 днів [29]. У кровообігу тромбоцити можуть швидко адгезуватись і накопичуватись в місцях ураження судин, утворюючи тромбоцитарну пробку (тобто першу хвилю гемостазу). Активовані тромбоцити також можуть забезпечувати негативно заряджену мембрану, збагачену фосфатидилсерином, що посилює генерацію тромбіну на основі клітин і полегшує зсідання крові (друга хвиля гемостазу). Отже, тромбоцити відіграють центральну роль при гемостазі. Однак процес гемостазу може також викликати тромбоз та закупорку судин, що є найпоширенішими механізмами, які призводять до інфаркту та інсульту після розривів атеросклеротичних уражень [30].

Агрегацію тромбоцитів визначають як процес взаємозв'язку між двома або більше тромбоцитами. Після адгезії їхня дископодібна форма змінюється на сферичну, а з гранул вивільняються агоністи, які активують тромбоцити (ADP, серотонін, тромбоксан A₂, адреналін, тромбін та ін.). В результаті вивільнення цих речовин у потік крові здійснюється механізм позитивного зворотного зв'язку, що проявляється в посиленні першочергової агрегації тромбоцитів з одночасним залученням сусідніх неактивованих клітин. При пошкодженні ендотелію тромбоцити вступають в контакт з протеїнами субендотелію – колагеном, фактором фон Вілебранда, тромбоспондином, фібронектином та ін. [31]. Цитоплазматична мембрана ендотелійних клітин синтезує тромбомодулін, який зв'язує тромбін, завдяки чому останній втрачає здатність до зсідання, але зберігає

активуючий вплив на систему двох найважливіших антикоагулянтів – протеїнів С і Z. Ендотелійні клітини, в свою чергу, продукують тканинний активатор плазміногену (ТАП), фіксують на своїй поверхні антикоагулянтний комплекс антитромбін III + гепарин, секретують фактор фон Вілебранда та фібронектин, який зв'язується з рецепторами елементів крові і ендотелійних клітин, а також з фібрином, що сприяє зміцненню тромбу.

Виділяють первинну і вторинну фази агрегації. Первинна – оборотна агрегація, тромбоцити скупчуються, утворюють пухкий тромбоцитарний корок, проникний для плазми крові, і з'єднуються один з одним фібриногеновими містками. Вторинна фаза – необоротна агрегація. В цьому випадку утворений раніше тромбін діє на рецептори тромбоцитів і призводить до їх руйнації з подальшим злиттям в суцільну масу. Новоутворений тромбоцитарний корок є непроникним для плазми крові. Для нормальної агрегації тромбоцитів необхідні три умови: підвищена вірогідність контакту між двома тромбоцитами за рахунок вивільнення тромбоцитарних агоністів, наявність іонів кальцію і наявність фібриногену. У випадку порушення однієї з умов, агрегація тромбоцитів не відбувається. Нормальна плазма крові містить достатню для агрегації кількість кальцію та фібриногену, які частково можуть вивільнитися з гранул тромбоцитів і ставати частиною тромбоцитарного корку [32].

Під час переродження судини процес агрегації тромбоцитів відіграє ключову роль у формуванні тромбоцитарного бар'єру і утворенні патологічного тромбу біля місця розриву атеросклерозної бляшки. До початкового контакту тромбоцитів з пошкодженою стінкою судини (адгезія) залучено декілька адгезивних субстратів (фактор фон Вілебранда, колаген) і тромбоцитарних рецепторів (GPIb-V-IX, GPIIb/IIIa або α IIb β 3, α 2 β 1). Взаємодія між зв'язаним з матриксом фактором фон Вілебранда і GPIIb/IIIa в першу чергу слугує для скупчення тромбоцитів на площі пошкодження і, частково, передумовою для утримання інтегрин-опосередкованої агрегації клітин [33]. Адгезивно-агрегаційна функція тромбоцитів у значній мірі залежить від транспорту іонів кальцію в цих клітинах,

а також від утворення із мембранних фосфоліпідів арахідонової кислоти і циклічних похідних простагландинів. При цьому у власне тромбоцитах утворюється потужний стимулятор агрегації і спазму судин – тромбоксин A₂, а в ендотелійних клітинах – антиагрегант простациклін. При пошкодженні ендотелію починає переважати утворення тромбоксану. Цей дисбаланс між тромбоксаном і простацикліном різко підсилює агрегацію [34]. Важливу роль в агрегації тромбоцитів також відіграє глікопротеїн ІІb/ІІІa. Коли тромбоцит у стані спокою, фібриноген плазми крові не зв'язується з його поверхнею. Центри зв'язування фібриногену з рецепторами експонуються тільки після активації тромбоцитів; процес зв'язування залежить від наявності іонів кальція і не спостерігається при відсутності двухвалентних катіонів.

Тромбоцити не прилипають і не активуються до неушкодженого, неактивованого ендотелію. Однак запальні явища, що виникають на ранніх стадіях атеросклерозу, призводять до активації ендотелію, що, в свою чергу, може стимулювати адгезію тромбоцитів [35]. Отже, порушення ендотелію не є єдиною умовою, яка спричиняє активацію тромбоцитів і їхню адгезію до артеріальної стінки. Окрім запуску процесів гемостазу, активація тромбоцитів може бути спричинена зменшенням механізмів, пов'язаних із збереженням ендотелійних антитромботичних властивостей, реактивними формами кисню та збільшенням протромботичних та прозапальних медіаторів в кровообігу або їхньої іммобілізації на ендотелії [36]. Приєднання тромбоцитів до інтактного, але активованого чи дисфункціонального ендотелію може бути ініційоване взаємодією з P-селектином, що супроводжується твердою адгезією, опосередкованою інтегриновим зв'язуванням, взаємодією GPIIb/IIIa та αIIbβ3 з ендотелієм та тромбоцитарним фактором фон Вілебранда. Активовані тромбоцити, крім експресії селектину та інтегрину, вивільняють кілька медіаторів, утримуваних у їхніх гранулах, які призводять до адгезії клітин, проліферації, коагуляції та протеолізу, а також синтезують хемокіни та прозапальні цитокіни, які прискорюють та посилюють запальний процес,

сприяючи розвитку атеросклеротичних бляшок – причин розвитку атеросклерозу [37].

1.5. Характеристика структури та функцій калікс[4]аренів

1.5.1. Структура калікс[4]аренів.

Каліксарени – це родина макроциклічних сполук із змінною кількістю фенольних одиниць, пов'язаних метиленовими містками в орто-положенні. Кількість фенольних одиниць може бути від 4 до 20, хоча найчастіше зустрічаються каліксарени з 4-8 (Рис.1.1). Циклічна структура калікс[4]аренів схожа на інші полігідроксильовані макроцикли, і порожнина макроциклу залежить від кількості ароматичних одиниць у системі. Ці сполуки мають тривимірну порожнину, яка може вміщувати молекули господаря під час процесу, який називається комплексом господар-гість. Ці системи мають перевагу як синтетичний рецептор, завдяки різним конформаційним ізомерним формам, що дозволяють використовувати різні способи застосування [38, 39].

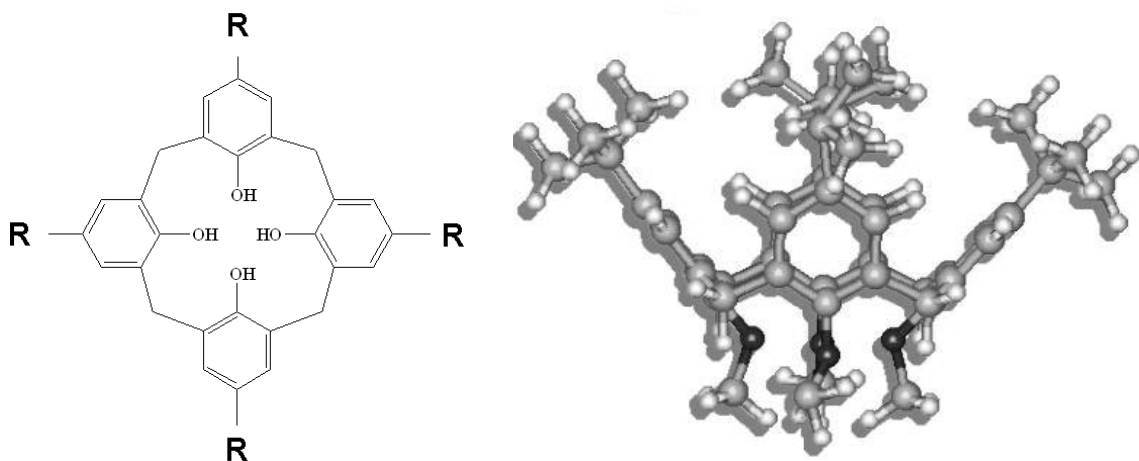


Рис. 1.1. Структурна формула калікс[4]аренів.

Калікс[4]арени можуть набувати таких конформацій як конус, частковий конус, 1,2-альтернативний та 1,3-альтернативний (Рис. 1.2) [40]. У жорсткій

конформації конуса всі фенольні -ОН групи утворюють міцні водневі зв'язки, які стабілізують структуру. У порожнині калікс[4]арена в конусній конформації можна виділити два ребра: нижній край, де метиленові мости, і верхній більший край з протилежного боку [41].

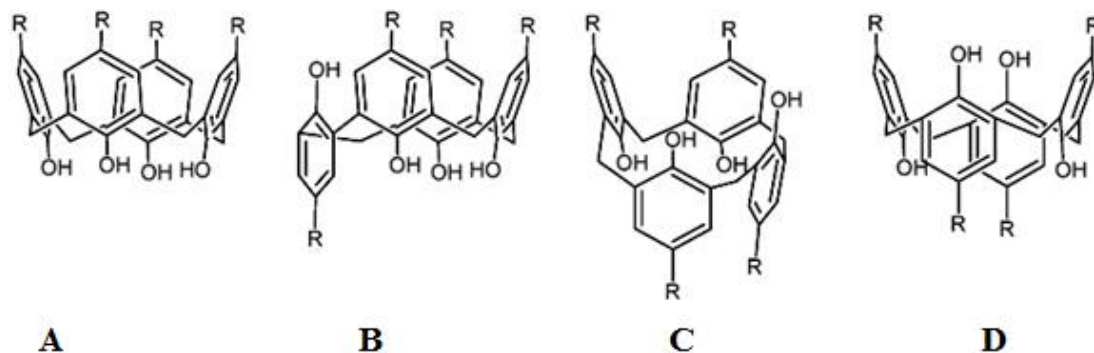


Рис. 1.2. Конформаційні варіації калікс[4]аренів. А – конформація конуса, В – часткового конуса, С – 1,2-альтернативного конуса, D – 1,3-альтернативного конуса.

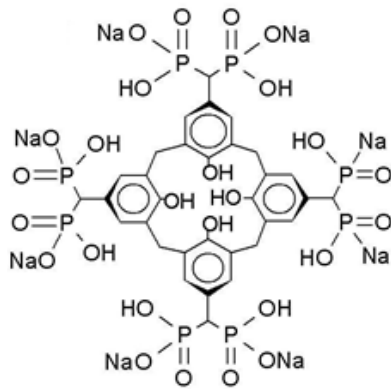
У центрі – кільцева система, де знаходяться ароматичні кільця. Молекулярні розміри порожнин змінюються залежно від кількості ароматичних одиниць [42].

Калікс[4]арени можуть бути функціоналізовані по верхньому або нижньому краю з кількома функціональними групами, такими як амідні, імінові, сірчані, азо-, семікарбазонні та алкільні групи, утворюючи широкий спектр макроциклічних сполук з різними властивостями розпізнавання, селективності, розчинності та ступеня гідрофобності [43]. При введенні полярних груп до каліксаренів можна створити амфіфільні макроцикли з гідрофільною головою та гідрофобним хвостом, які можуть самостійно збиратися у міцели, везикули, ліпосоми та інші агрегати, корисні для транспортування ліків [44]. Варіювання природи групи замісників фенолу полегшує модифікацію на верхньому краю макроциклічної системи, а на нижньому ребрі очевидним місцем хімічної модифікації є гідроксильні групи. Реакційна здатність каліксаренів переважно розташована у двох точках: на гідроксильних групах (нижній ободок) або на положенні гідроксильної групи (верхній ободок) [45].

1.5.2. Функції калікс[4]аренів.

На сьогодні накопичені численні експериментальні дані, які свідчать на користь того, що для калікс[4]аренів є притаманною бактерицидна, антивірусна, антитромботична, протипухлинна активність та інші біологічні властивості [46, 47]. Деякі калікс[4]арени є ефективними інгібіторами ензимів, зокрема Na^+K^+ -АТР-ази (у раніше проведених досліджах із використанням низки калікс[4]аренів (14 сполук), було знайдено, що найефективнішу інгібувальну дію на активність Na^+K^+ -АТР-ази виявив калікс[4]арен с-107 в концентрації 100 мкМ (за цих умов спостерігалось майже повне інгібування ензиматичної активності: до 2-3% відносно контролю). У концентрації 60 нМ С-107 знижував активність Na^+K^+ -АТР-ази на 49 % [48]. На сьогодні також досліджений їх вплив на скорочення гладеньких м'язів. Калікс[4]арени можуть впливати на біохімічні та фізико-хімічні властивості біологічних мембран [49]. Проте потенціал калікс[4]аренів як біологічно активних сполук ще повністю не розкритий [50, 51, 52].

Відомо, що калікс[4]арен С-192, який містить чотири залишки метиленбісфосфонової кислоти, та його натрієва сіль – С-145 (Рис. 1.3), за даними турбідиметричного аналізу, специфічно гальмують полімеризацію фібрину. Для виключення можливої інгібіторної дії калікс[4]арену на тромбін чи на сайт зв'язування тромбіну з фібриногеном, було досліджено вплив калікс[4]арену С-192 на полімеризацію мономерного фібрину desAB. Дослід показав інгібіторну дію калікс[4]арену С-192, яка здійснюється саме за рахунок його взаємодії з фібрином. За допомогою трансмісійного електронного мікроскопу встановлено, що калікс[4]арен С-192 інгібує першу стадію полімеризації фібрину – побудову протофібрил з мономерних молекул [43].



C-145

Рис. 1.3. Структурна формула калікс[4]арену С-145.

Для виявлення можливості використання калікс[4]аренів як антитромботичних препаратів було проаналізовано інгібіторну дію калікс[4]арену С-192 на процес зсідання плазми крові людини. Було показано, що С-192 вдвічі подовжує час зсідання плазми крові в тестах активований частковий тромбопластиновий час та протромбіновий час в нормальній плазмі крові людини при концентрації С-192 7.0×10^{-5} М та 1.7×10^{-5} М відповідно. Дослідження *in vitro* не виявили впливу калікс[4]аренів С-145 та С-192 на клітини крові. Попередні дослідження, проведені на здорових статевозрілих мишах, свідчать, що калікс[4]арен С-192 є сполукою середньої токсичності.

Таким чином, вперше показано, що калікс[4]арен С-192 та його натрієва сіль С-145 є специфічними інгібіторами полімеризації фібрину та зсідання плазми крові [53]. Ці сполуки можуть бути використані як основа для розробки нового класу антитромботичних препаратів.

При дослідженні дії калікс[4]арену С-145 на систему зсідання крові кроля *in vivo*, було показано, що його антиполімеризаційний ефект за умов внутрішньовенного введення відповідає ефектам, які спостерігалися раніше у дослідах *in vitro*. Не виявлено помітного ефекту на загальний вміст протромбіну, фібриногену, активність антикоагуляційної та фібринолітичної систем плазми крові. Механізм дії калікс[4]арену С-145 на клітинну ланку гемостазу лишився нез'ясованим [54].

Загалом, серед відомих макроциклічних сполук, каліксарени, мабуть, є найбільш перспективними для застосування в області розпізнавання токсикологічних молекул господар-гість. Їхня синтетична доступність, низька токсичність та наявність реакційноздатних сторін є характеристиками, які роблять їх актуальними в рамках надмолекулярної хімії. Сьогодні калікс[4]арени розглядають як новітні інструменти для регуляції біологічних процесів. Одним із актуальних напрямків є продовження вивчення дії калікс[4]аренів на систему зсідання крові та полімеризацію фібрину [55].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика об'єкту дослідження

Калікс[4]арен С-145 синтезували алкілуванням ізопропілових естерів тетрагідрокси-калікс[4]арен фосфонових кислот 3-метилсульфідо-пропанолом за реакцією Мітцунобу. Синтез відбувався на базі Інституту органічної хімії НАН України, у Відділі хімії фосфорорганічних сполук. У результаті були отримані калікс[4]арен-фосфонати, що містять одну або дві алкіл-тіольні групи на нижньому обідці макроциклу. Їхня кількість визначається молярним співвідношенням реагентів, що беруть участь у реакції синтезу. Для отримання тетракалікс[4]арен-фосфонових кислот, синтезовані естери піддавали послідовній обробці триметилбромосиланом та метанолом [56, 57, 58].

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

2.2.1. Реактиви

У роботі було використано реактиви: ADP («Merck», Німеччина); тромбoplastин, АЧТЧ-реагент, кальцій хлористий 0.025 М («Sigma», США), трис, NaCl, персульфат амонію, Діметоксид («Лубнифарм», Україна), крижана оцтова кислота (НВП «Альфарус», Україна), аміак («Фармнатур», Україна), 1% водний розчин уранілацетату («Merck», Німеччина), тромбін («Merck», Німеччина); діагностичний набір для вивчення агрегації тромбоцитів («Sigma», США); активатор протеїну С («Sigma», США); AntiPAI-1 rabbit polyclonal IgG; Goat anti-

rabbit IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate («Sigma», США). ADP («Merck», Німеччина); діагностичний набір для вивчення агрегації тромбоцитів («Sigma», США).

2.2.2. Витратні матеріали

Під час роботи було використано діагностичний набір для вивчення агрегації тромбоцитів («Siemens», Німеччина).

2.2.3. Калікс[4]арен C-145

Для синтезу калікс[4]арену C-145 проводили алкілювання за реакцією Мітцунобу ізопропілових естерів тетрагідроксикалікс[4]арен фосфонових кислот 3-метилсульфідо-пропанолом, в залежності від молярного співвідношення реагентів, отримані відповідні каліксарен фосфонати, які містять одну чи дві алкілтіольні групи на нижньому вінці макроциклу. Послідовною обробкою отриманих естерів триметилбромосиланом та метанолом синтезовані відповідні тетракіс-каліксаренфосфонові кислоти (Рис. 2.1).

Щурам дослідної групи щоденно до завершення експерименту вводили *per os* водний розчин C-145 в дозі 10 мг/кг маси тіла.

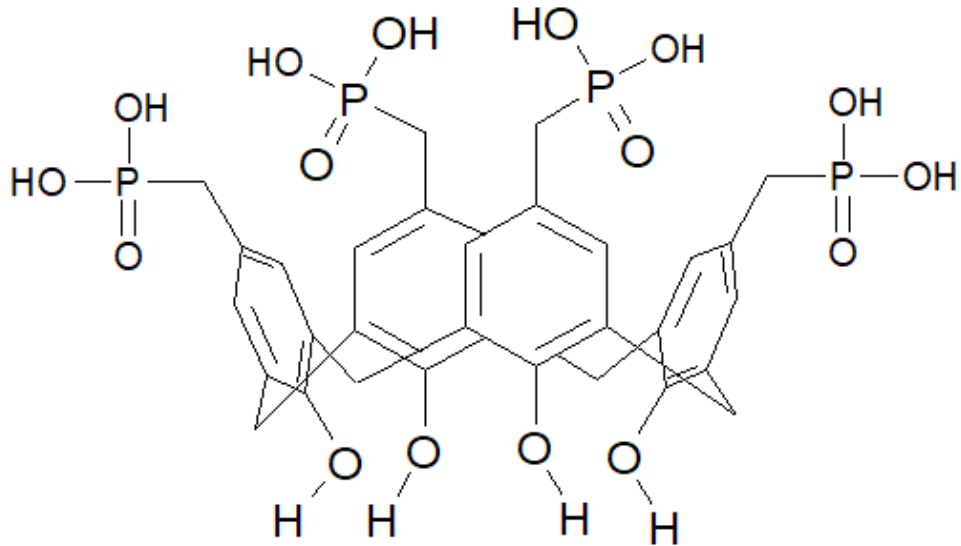


Рис. 2.1. Структурна формула калікс[4]арену С-145.

2.2.4. Розчини

Під час виконання роботи було використано наступні розчини: 0,05 М трис-буферний сольовий розчин (TBS).

2.2.5. Обладнання

У роботі було використано наступні прилади: сэмплери (ВІОНІТ, Німеччина), фотооптичний агрегометр «SOLAR AP2110» («СОЛАР», Білорусь), коагулометр «Солар» (СОЛАР», Білорусь), камера для АЧТЧ тесту (власного виготовлення), фотооптичний Multiskan EX («Thermo Electron Corporation», США), світловий мікроскоп Olympus BX51 («Olympus», Японія), мікротом МПС-2 («ТОЧМЕДПРИБОР», Україна).

2.3. Характеристика піддослідних тварин

Під час роботи було створено три дослідні групи щурів, в кожній з яких було по 10 лінійних спонтанно гіпертензивних щурів-самиць (SH-rats), з масою тіла 200-220 г [59]. Дві дослідні групи протягом двох місяців експерименту годували кормом з 3% вмістом холестеролу. Щури третьої, контрольної групи отримували аналогічний корм, позбавлений холестеролу. Окрім корму з холестеролом, десятьом щурам щоденно протягом двох місяців вводили *per os* водний розчин С-145 дозою 10 мг/кг маси тіла.

2.4. Отримання плазми крові з крові щурів

2.4.1. Забір крові у щурів

Забір крові здійснювали шляхом пункції серця піддослідних щурів з використанням шприца та голки діаметром 19G. Кров відбирали із дотриманням усіх вимог про роботу із лабораторними тваринами, згідно із Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [60, 61, 62].

Перед безпосереднім забором крові у шприц через голку набирали 3,8% розчин цитрату натрію, який виступав антикоагулянтом і змішувався з кров'ю при заборі. Кількість цитрату натрію додавали, виходячи із співвідношення 1:9 до цільної крові. Відібрану кров з цитратом натрію вносили в поліетиленову пробірку і повільними рухами декілька разів перемішували.

2.4.2. Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові.

Збагачену тромбоцитами плазму крові (ЗТПК) отримували центрифугуванням протягом 30 хвилин при 160 g, при кімнатній температурі у відкритих пробірках, щоб не обмежувати доступ кисню до тромбоцитів. Отриманий супернатант (збагачену тромбоцитами плазму крові) переносили в чисту поліетиленову пробірку [63].

2.4.3. Отримання плазми крові

Збіднену на тромбоцити плазму крові отримували повторним центрифугуванням збагаченої тромбоцитами плазми крові при 400 g 20 хвилин при кімнатній температурі. Отриманий супернатант відбирали у поліетиленові пробірки та проводили ряд скринінгових тестів. У разі необхідності отриману плазму крові фасували по 1000 мкл, заморожували та зберігали при -20 °C до 6 місяців.

2.5. Методи, використані для дослідження властивостей калікс[4]арену C-145 *in vitro*

2.5.1. Активованій частковий тромбопластиновий час

АЧТЧ виконували згідно зі стандартними лабораторними методиками. Для цього до 0,1 мл плазми крові додавали АЧТЧ-реагент та інкубували суміш протягом 3 хвилин при 37 °C, після чого ініціювали полімеризацію 0,1 мл

розчином CaCl_2 (0,025 М) («Sigma», США) [64]. Фіксували час утворення згустку за допомогою коагулометра «Солар».

2.5.2. Турбідиметричний аналіз плазми крові

Турбідиметрію виконували на фотооптичному Multiskan EX («Thermo Electron Corporation», США). В лунку планшету («Greiner», КНР) вносили 60 мкл плазми крові, 60 мкл АЧТЧ-реагенту, 120 мкл ТBS-буферу та 3 мкл діметилсульфоксиду. Інкубували *ex tempore* 2 хвилини при температурі 37 °С, після чого ініціювали полімеризацію фібрину 60 мкл розчину CaCl_2 (0,025 М). Результати реєстрували протягом 6 хвилин після ініціації полімеризації, без внесення змін в реакційну суміш [65, 66].

2.5.3. Дослідження процесу агрегації тромбоцитів

Агрегацію тромбоцитів вивчали в ЗТПК людини (200-300 тис. тромбоцитів/мкл). Перед дослідженням проводили скринінгову оцінку агрегації тромбоцитів донорів, і при виявленні гіпоагрегації ЗТПК не використовували. Агрегатометрію виконували в перші три години після забору крові на фотооптичному агрегометрі «SOLAR AP2110» за методом Born [67].

В кювету для агрегометра вносили 430 мкл ЗТПК і 20 мкл 0,025 М CaCl_2 та інкубували *ex tempore* 5 хвилин при температурі 37 °С. Агрегацію тромбоцитів ініціювали внесенням одного з індукторів агрегації тромбоцитів: ADP (у концентрації 12,5 та 10 мкМ). Процес агрегації реєстрували протягом 10 хвилин в режимі роботи без нормування результатів вимірів за початковим рівнем світлопропускання.

Аналіз даних агрегатометрії виконували за допомогою пакету Солар 2.01. Оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації – швидкість зміни світлопропускання ЗТПК після внесення індуктора агрегації за перші 30 с; час агрегації – час досягнення максимального ступеню агрегації.

2.5.4. Статистична обробка даних

Дані обробляли статистично з використанням критерію Манна-Вітні з застосуванням комп'ютерного сервісу Chi-Square Test Calculator [68, 69]. Social Science Statistics, Jeremy Stangroom (<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/Default2.aspx>). Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм “Microsoft Excel”.

2.5.5. МТТ-тест

Життєздатність клітин вимірювали за допомогою аналізу 3-(4,5-діетілтіазол-2-іл)-2,5-діфенілтетразолійброміда – МТТ (Sigma, США). Клітини поміщали в 96-лункові планшети з різними формами фібрину та інкубували протягом 24 год з 100 мкл культурального середовища IMDM (Sigma, США). Далі в лунки додавали 1 мг/мл МТТ та інкубували при 37 °С протягом 4 год, після чого додавали диметилсульфоксид (Sigma, США). Поглинання при 540 нм вимірювали за допомогою рідера Multiskan EX.

2.6. Моделювання передтромботичного стану

Експериментальну модель передтромботичного стану відтворювали на лінійних спонтанно гіпертензивних щурах-самицях (SHТ-rats) з масою тіла 200-

220 г. Для цього протягом 2 місяців експерименту їм згодовували корм з 3 % вмістом холестеролу. Альтернативно щурам SHТ вигодовували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) протягом 6 місяців. Щурі контрольної групи отримували аналогічний корм, позбавлений холестеролу або вісцерального жиру.

2.7. Гістологія стінок аорти щурів

Гістологічний аналіз стінок аорти щурів проводили на базі Інституту геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України у секторі клінічної геронтології та геріатрії, відділі клінічної фізіології та патології внутрішніх органів. Гістологічні зразки аорти готували для світлової мікроскопії, як описано у [70]. Після декапітації ізолювали фрагменти аорти і фіксували у 10 % нейтральному формаліні протягом доби. Далі дегідрували ці фрагменти у поступово зростаючій концентрації етанолу (70, 80, 90 і 96 %) та заливали фрагменти аорти у парафінові блоки. Зрізи товщиною 5 мкм готували на мікротомі. Забарвлення зразків проводилося гематоксиліном та еозином за методом Ейрліха та Масона-Голднера для подальшої світлової мікроскопії на мікроскопі Olympus BX51 (Olympus, Японія). Товщину стінки аорти та морфометричні дослідження проводили у пакеті програм Image J (National Institutes of Health, Maryland, США) [71, 72].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3. СКРИНІНГ СПОЛУК КАЛІКС[4]АРЕНОВОГО РЯДУ ЯК ІНГІБІТОРІВ ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ ФІБРИНУ *IN VITRO*

З метою вибору сполуки калікс[4]аренового ряду, яку можна розглядати як максимально ефективну основу для створення антитромботичного препарату, визначали їх дію на час зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ). АЧТЧ – базовий коагуляційний тест, який свідчить про здатність плазми крові формувати згусток під дією факторів внутрішнього шляху коагуляції. Не дивлячись на те, що АЧТЧ вважають недостатнім для точної лабораторної діагностики [73], його можна застосовувати для вивчення біологічних моделей як скринінговий тест.

Набір сполук калікс[4]аренового ряду, які відрізнялися за модифікаціями калікс[4]аренової чаші було надано співробітниками Інституту органічної хімії. Всі сполуки були близькі до калікс[4]арену С-145, який раніше було запропоновано як основу для створення антитромботичного препарату (Рис. 3.1).

Усі сполуки аналізували за здатністю до подовження часу зсідання плазми крові, порівнюючи з контрольним зразком, що не містив калікс[4]арену. В результаті було обрано сполуки, які виявилися найбільш ефективними інгібіторами полімеризації фібрину: калікс[4]арен С-145 та його сульфур-вмісне похідне – калікс[4]арен С-145S (Таблиця 3.1.).

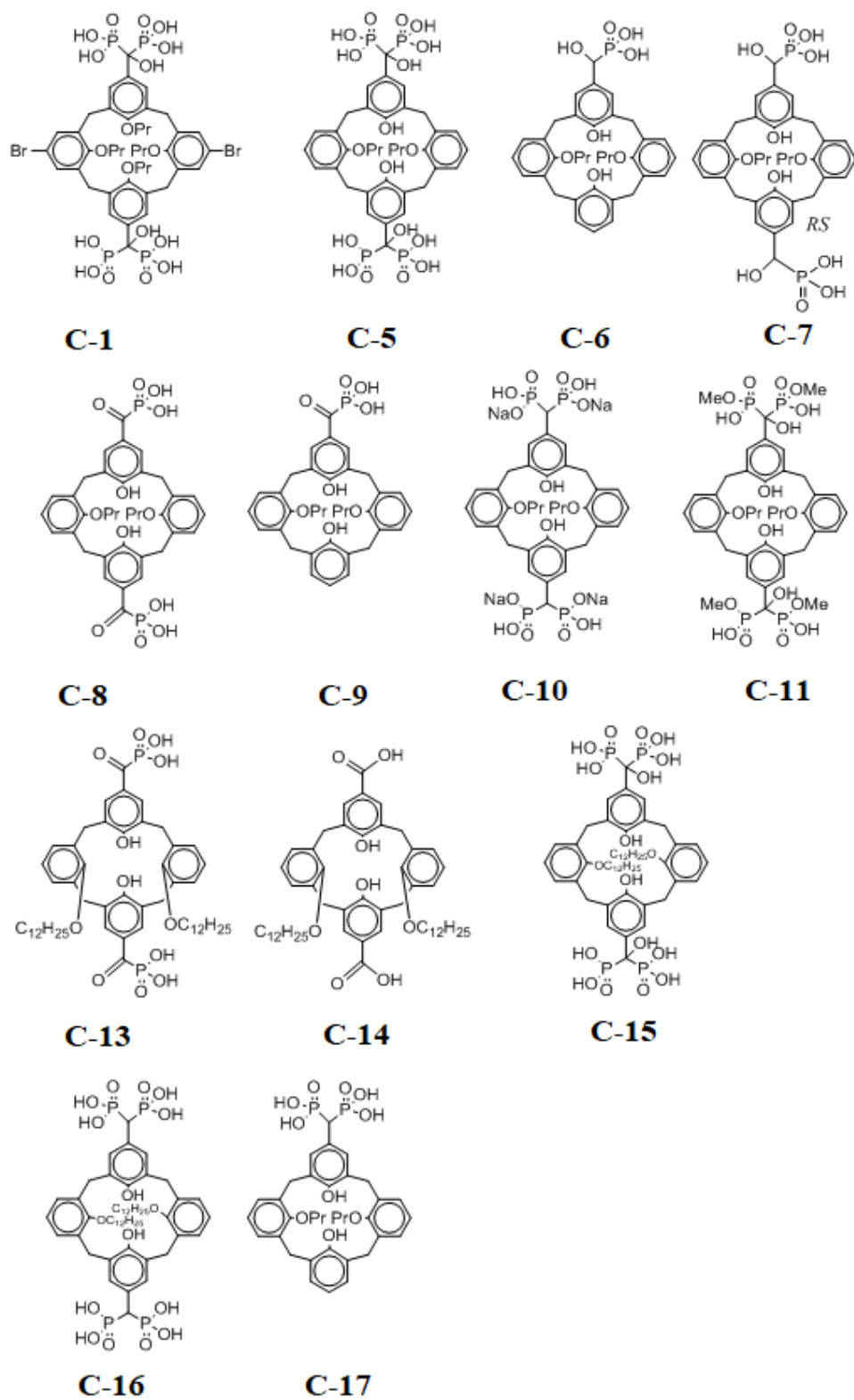


Рис 3.1. Набір сполук калікс[4]аренового ряду.

Таблиця 3.1.

Подовження часу зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ за присутності сполук каліксаренового ряду у різних концентраціях (0,0006-0,03 М).

Коротка назва сполуки	C=0,03 М		C=0,003 М		C=0,0006 М	
	%	(Час, с)	%	(Час, с)	%	(Час, с)
Контроль	0	59	0	36	0	36
C-145	305	>180	305	>180	200	72
C-145S	305	>180	305	>180	247	89
C-1	305	>180	278	100	119	43
C-5	305	>180	144	52	н.в.	н.в.
C-6	305	>180	144	52	н.в.	н.в.
C-7	305	>180	130	47	н.в.	н.в.
C-8	203	120	114	41	н.в.	н.в.
C-9	305	>180	153	55	н.в.	н.в.
C-10	305	>180	367	132	150	54
C-11	305	>180	144	52	н.в.	н.в.
C-13	305	>180	195	70	147	53
C-14	305	>180	147	53	н.в.	н.в.
C-15	153	90	161	58	н.в.	н.в.
C-16	195	115	192	69	158	57
C-17	266	157	125	45	н.в.	н.в.

Примітка: Наведено значення у % від контрольного часу зсідання та час утворення згустку в секундах; н.в. – показник не визначали.

Спостерігали найбільше подовження часу зсідання крові *in vitro* під дією калікс[4]аренів C-145 та C-145S. Інші сполуки, які були ефективні за високих

концентрацій (30 або 3 мМ), виявилися менш придатними за низьких концентрацій.

Тому для подальших досліджень було обрано дві сполуки – С-145 та його сульфур-вмісне похідне С-145S. Їхню дію на фібриноутворення та на інші компоненти системи гемостазу було досліджено окремо.

РОЗДІЛ 4. ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ С-145 ТА С-145S НА КОМПОНЕНТИ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ *IN VITRO*

Раніше було показано, калікс[4]арени блокують А-центри полімеризації фібрину, таким чином запобігаючи формуванню тривимірної сітки фібрину – основи тромбу. Тому сполуки калікс[4]аренового ряду було запропоновано як потенційну основу для створення антитромботичного агенту, який високоселективно гальмуватиме тромбоутворення, не впливаючи на інші компоненти системи гемостазу.

На попередньому етапі досліджень нами було обрано сполуки С-145 та С-145S, які є близькими за структурою та ефективно інгібують полімеризацію фібрину. Молекула С-145S володіє більшою кислотністю та має більшу гідрофобну чашу, порівняно з молекулою С-145. Це дозволило очікувати, що С-145S може мати більшу спорідненість до фібрину та як наслідок виявляти більшу антикоагулянтну активність.

Для вивчення комплексної дії досліджуваних сполук на коагуляційну та фібринолітичну ланки системи гемостазу скористалися методом визначення загального гемостатичного потенціалу за Blombäck [74, 75]. Ми вивчали формування та гідроліз згустку в плазмі крові людини за присутності калікс[4]арену С-145 (натрієвої солі калікс[4]арен-тетраметиленбісфосфонової кислоти) та нової сульфур-модифікованої форми калікс[тіа4]арену С-145S (натрієвої солі калікс[тіа-4]арен-тетраметиленбісфосфонової кислоти). Обидві форми містили залишки ометиленбісфосфонової кислоти у формі натрієвої солі. Дослідження проводили в діапазоні концентрацій від 10 до 50 мкМ. Визначали максимальну мутність та час напівлізису згустку.

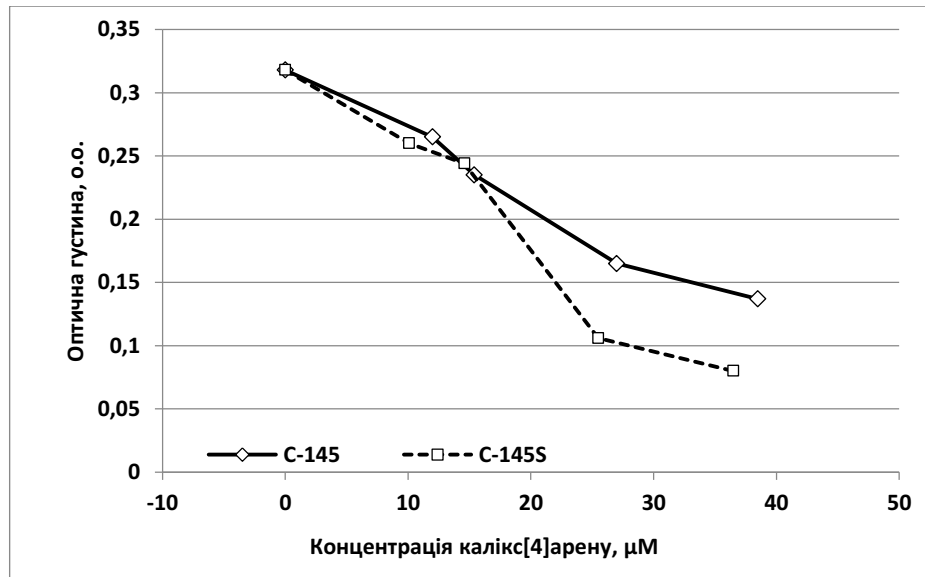


Рис. 4.1. Залежність часу напівлізису фібринового згустку від концентрацій калікс[4]арену С-145 та калікс[тіа-4]арену С-145S. Полімеризацію фібрину ініціювали АЧТЧ-реагентом за присутності tPA.

Було показано, що за концентрації 10 мкМ обидві форми калікс[4]аренів знижують кінцеву мутність згустку в 1,4 рази в порівнянні з контролем. За підвищення концентрації до 40 мкМ калікс[4]арен С-145 знижує кінцеву мутність згустку в 2,3 рази, а калікс[4]арен С-145S – в 4,3 рази (Рис. 4.1).

Показано, за концентрації до 10 мкМ калікс[4]арен С-145 не впливає на час напівлізису згустку, натомість С-145S подовжує час напівлізису згустку в 1,2 рази. За збільшення концентрації цей ефект стає значно більш вираженим. Для калікс[4]арену С-145 за концентрації 30 мкМ час напівлізису згустку подовжується в 1,5 рази. У випадку калікс[4]арену С-145S таке подовження за концентрації понад 30 мкМ є драматичним (Рис. 4.1).

Таким чином, показано, що для С-145 існує діапазон концентрацій (до 10 мкМ), за яких ця сполука інгібує полімеризацію фібрину та не впливає на час напівлізису згустку. Натомість С-145S інгібує однаково ефективно і полімеризацію фібрину, і його гідроліз.

Іншим важливим компонентом системи гемостазу, який приймає участь у тромбоутворенні, є клітинна ланка – тромбоцити та ендотеліоцити [76]. Дію досліджуваних сполук на тромбоцити вивчали методом агрегатометрії у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини.

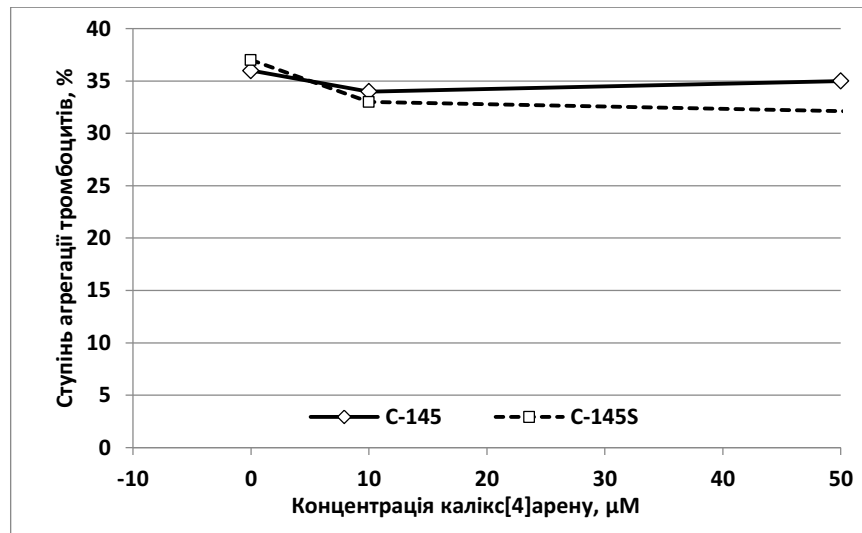


Рис. 4.2. Залежність ступеня агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові від концентрацій калікс[4]арену С-145 та С-145S. Агрегацію тромбоцитів ініціювали 12,5 мкМ ADP.

Було показано, що як С-145, так і С-145S інгібують агрегацію тромбоцитів за концентрації 500 мкМ, однак це інгібування є помірним (до 10 %) та не спостерігається за концентрацій, які ефективно інгібують полімеризацію фібрину. Варто відзначити більш виражену дію на агрегацію тромбоцитів С-145S (Рис. 4.2).

Для вивчення дії досліджуваних сполук на ендотелійні клітини ми використали культуру клітин ендотеліоцитів свині лінії PAE. Калікс[4]арен С-145 та калікс[4]арен С-145S вносили у середовище культивування у діапазоні концентрацій від 2 до 50 мкМ. Порівнювали життєздатність клітин за присутності С-145 та С-145S за допомогою МТТ-тесту [77, 78].

Було виявлено позитивний ефект обох досліджуваних сполук на життєздатність ендотеліоцитів. Зокрема, за концентрації 10 мкМ обидва

калікс[4]арени збільшували відповідь у МТТ-тесті на 10 % (Рис. 4.3). Подальше підвищення концентрації калікс[4]аренів призводило до посилення цього ефекту, яке було більш виражене за присутності С-145S.

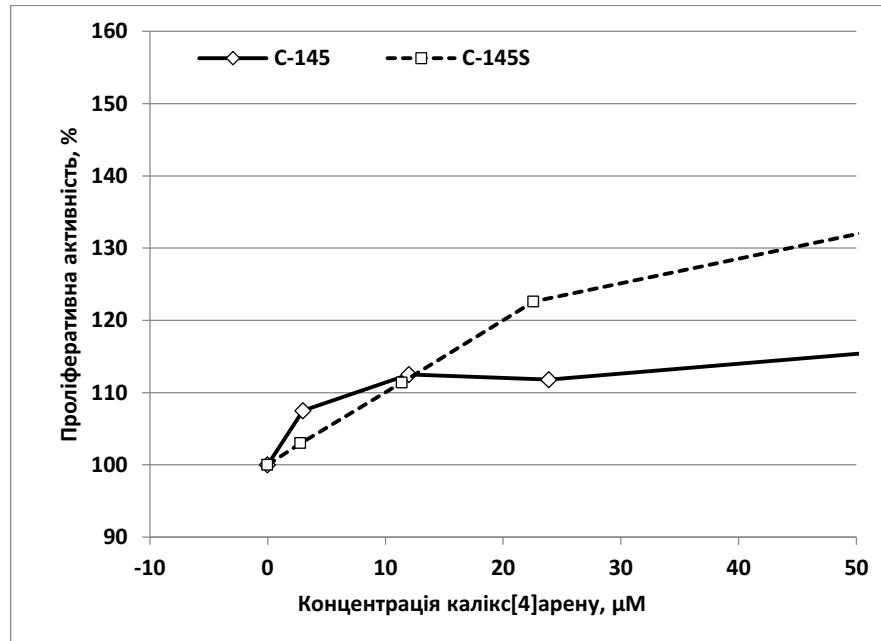


Рис. 4.3. Залежність життєздатності ендотеліальних клітин свині лінії PAE від концентрацій калікс[4]арену С-145 та С-145S відповідно до результатів МТТ-тесту. Результати виражено у відсотках від контрольних значень.

Варто відзначити особливості росту клітин за присутності калікс[4]аренів, зокрема появу капілярподібних структур (Рис. 4.4 В, С). Стимулювання проліферації ендотеліоцитів та можлива дія на капіляроутворення є новим цікавим ефектом сполук калікс[4]аренового ряду, який потребує детального вивчення. Водночас, за концентрацій, які ефективно інгібували фібриноутворення, стимуляція проліферації клітин незначна.

У зв'язку з виявленим ефектом було б цікаво дослідити дію сполук калікс[4]аренового ряду на капіляроутворення та стан судин *in vivo*.

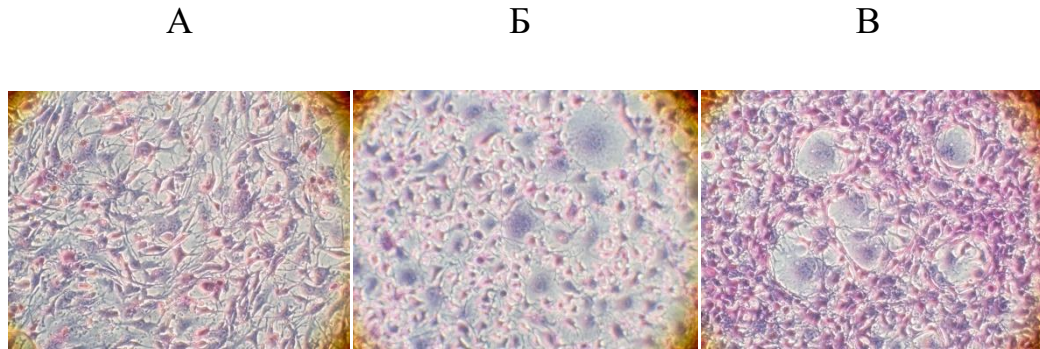


Рис. 4.4. Зовнішній вигляд культури ендотеліоцитів свині PAE за присутності калікс[4]арену С-145 (Б) та С-145S (В) у концентрації 50 мкМ. А – контрольні клітини.

Отже, обидві досліджувані форми калікс[4]арену були ефективними інгібіторами полімеризації фібрину. При цьому С-145S виявився ефективнішим, порівняно з С-145 ($IC_{50} = 20$ мкМ, $IC_{50} = 27$ мкМ відповідно). Тим не менш, цей ефект був порівняно незначним, у діапазоні концентрацій 10-25 мкМ. Концентрації 25-27 мкМ обох сполук достовірно інгібували фібриноутворення в 2 рази, тобто обидві сполуки були ефективними антиполімеризаційними агентами.

Було також оцінено дію калікс[4]арену С-145 та калікс[тіа-4]арену С-145S на період напівлізису згустку під дією tPA у плазмі крові. Виявлено, що С-145S ефективно інгібує гідроліз згустку та повністю унеможлиблює його розщеплення плазміноген-плазміновою системою за концентрації понад 35 мкМ.

В той же час, С-145 виявляв значний інгібіторний ефект на гідроліз фібринового згустку лише за концентрації 38,5 мкМ. Час напівлізису згустку за концентрацій від 10 до 27 мкМ зростав не більш як у 1,5 рази.

Жоден із досліджуваних калікс[4]аренів не інгібував агрегацію тромбоцитів за концентрацій до 50 мкМ. Однак, обидві сполуки були здатні стимулювати проліферацію ендотелійних клітин у культурі. Цей ефект був більш виражений у випадку С-145S.

Потенційний терапевтичний агент повинен мати вузькоспрямовану дію. Порівнявши ефекти C-145S та C-145, ми дійшли висновку щодо можливості обрання концентрації C-145, яка ефективно інгібуватиме полімеризацію фібрину та не впливатиме на агрегацію тромбоцитів, гідроліз фібринового згустку та проліферацію ендотеліоцитів. Тому саме C-145 було обрано для подальших досліджень як потенційний антитромботичний агент *in vivo*, а концентрацію C-145 5-20 мкМ було обрано як робочу.

**РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ LD50 ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ
«АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ЗАСІБ КАЛІКС[4]АРЕН С-145»**

Гостру пероральну токсичність лікарської субстанції «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» вивчали на самицях щурів Wistar Han відповідно до рекомендацій OECD 425 (OECD Guideline for Testing of Chemicals «Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure») спільно з Центром превентивної і регуляторної токсикології ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені Л.І. Медведя МОЗ України» [79, 80].

Таблиця 5.1

Динаміка маси тіла і прирост маси тіла щурів після застосування С-145

№ щура	Вихідна маса тіла (г)	Об'єм введення (мл)	Маса тіла (г)			Приріст маси тіла (г)
			День 3	День 7	День 14	
450 мг/кг						
1	174	0,39	176	182	189	15
800 мг/кг						
2	174	0,70	181	192	196	22
4	174	0,70	186	195	209	35
1420 мг/кг						
3	176	1,25	-	-	-	-
5	178	1,26	191	203	211	33
2000 мг/кг						
6	173	1,73	-	-	-	-

Калікс[4]арен С-145 вводили тваринам однократно. Порядок дозування і припинення його введення визначали з використанням основного тесту OECD 425 [81]. Клінічні прояви інтоксикації реєстрували протягом 14-денного внутрішньошлунковим зондом у вигляді водного розчину в дозах 450, 800, 1420 і 2000 мг/кг періоду спостереження. В динаміці вивчали зміну маси тіла тварин – на 1, 3, 7 і 14 діб після денного періоду спостереження, повнокров'я судин шлунка

і товстого кишечника. У тварин, що вижили, видимих змін внутрішніх органів не виявлено. Порушення приросту маси у тварин, що вижили, не спостерігали (Таблиця 5.1).

Препарат калікс[4]арен С-145 при пероральному шляху введення належить до V класу токсичності відповідно до *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)* [82] і до малотоксичних речовин (IV клас токсичності) відповідно до методичних рекомендацій [83].

LD50 калікс[4]арену С-145 при пероральному введенні для самиць щурів Wistar Han складала 1420 мг/кг (847,5÷5440) (Таблиця 5.2).

Таблиця 5.2

Визначення LD50 за допомогою статистичної програми AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program.

Доза, мг/кг	О	Х	Total
450	1	0	1
800	2	0	2
1420	1	1	2
2000	0	1	1

Примітка: О – тварини вижили, Х – тварини померли.

Макроскопічні дослідження внутрішніх органів (мозок, легені, серце, печінка, селезінка, нирки, наднирники, шлунок, товстий та тонкий кишечник, матка, яєчники, тимус, підшлункова та щитовидна залози) проведено у загиблих тварин негайно, а у тих, що вижили, - через 14 діб.

При пероральному введенні С-145 загибель тварин спостерігали при дозах 1420 і 2000 мг/кг через 24 години та через 5 хвилин відповідно. Симптоми гострої інтоксикації при введенні сполуки в дозі 450 мг/кг і вище - протягом першого дня після введення. Картина інтоксикації характеризувалася порушенням поведінки одразу після введення. Через годину після введення відмічено пік інтоксикації, який характеризувався порушенням ритму дихання, тремором, зниженням загальної активності. Стан тварин, які не гинули, нормалізувався через 24 години. Щодо загиблих тварин, макроскопічні дослідження виявили у них множинні кровотечі, зокрема повнокров'я легенів, печінки та нирок.

Варто відзначити, що загибель тварин після введення С-145 траплялася власне через передозування та надмірний прояв наслідків специфічної дії препарату, а саме – через геморагічний синдром.

5.1. Антитромботичний ефект лікарської субстанції «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145»

Для проведення експериментів на лабораторних тваринах було обрано дозу перорального введення, яка була більш ніж у 100 разів меншою за напівлетальну. Було необхідно з'ясувати, наскільки ефективно та як довго така доза С-145 інгібуватиме фібриноутворення.

Експеримент проводили на мишах, яким вводили 12 мг/кг С-145 *per os*. Детектували ефекти калікс[4]арену за подовженням часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ та за зниженням здатності тромбоцитів до агрегації.

Миші мали масу тіла 20 г. Об'єм одноразового введення складав 0,1 мл. Кров забирали пункцією серця у мишей через 2, 3, 4, 5, 6, 7 та 24 години після перорального введення С-145.

Було виявлено, що через 3 години після перорального введення С-145 час зсідання плазми крові мишей у тесті АЧТЧ подовжується в 3 рази порівняно з контрольним.

З 3 по 6 години з моменту введення С-145 плазма крові мишей не згорталася в тесті АЧТЧ або ж згусток фібрину утворювався через 5 і більше хвилин після внесення реагентів.

З 7-ої години починається поступова нормалізація часу зсідання плазми крові, показники тесту АЧТЧ сягають контрольних значень на 24-ту годину після перорального введення С-145 (Рис. 5.10).

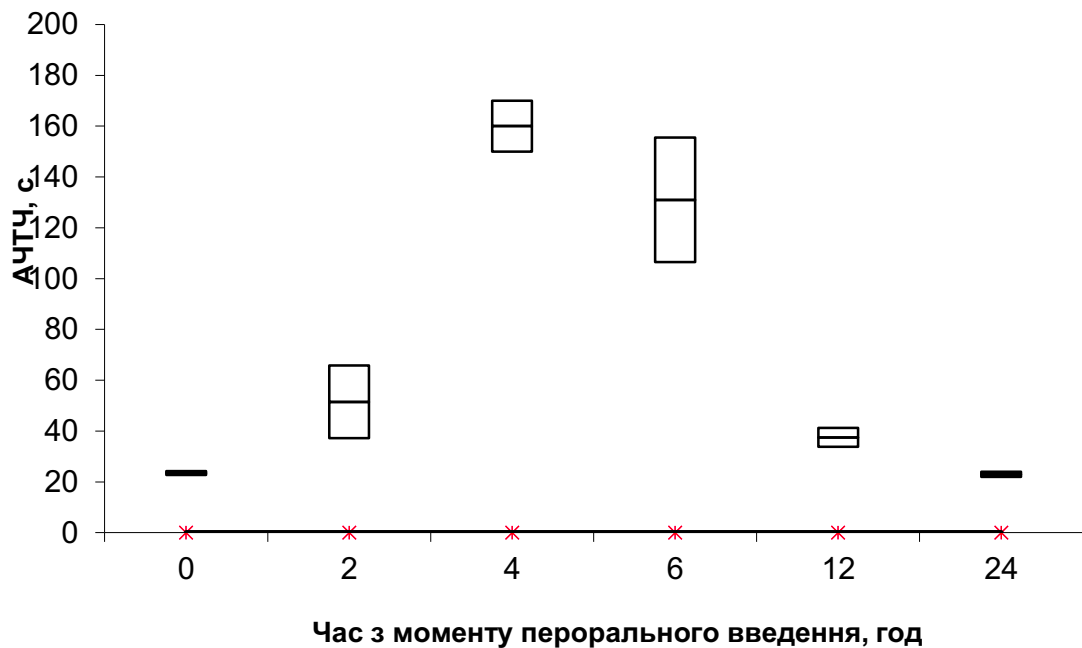


Рис. 5.1. Час зсідання плазми крові мишей у тесті активованій частковий тромбопластиновий час до та після перорального введення калікс[4]арену С-145.

Надзвичайно важливим є те, що хоча полімеризація фібрину не відбувалася, генерація тромбіну у плазмі крові дослідних тварин відбувалася нормально. Для виявлення цього факту ми використали хромогенний субстрат, специфічний до тромбіну - S2238. Внесення у плазму крові реагенту АЧТЧ викликало генерацію тромбіну, який відщеплював від хромогенного субстрату залишок пара-нітроаніліну (Рис. 5.1). Накопичення пара-нітроаніліну фіксували на рідері «Thermo Multiscan EX». Таким чином, С-145 діяв саме на заключному етапі

формування тромбу – інгібував побудову протофібрил фібрину, як і припускалося у наших попередніх роботах [84].

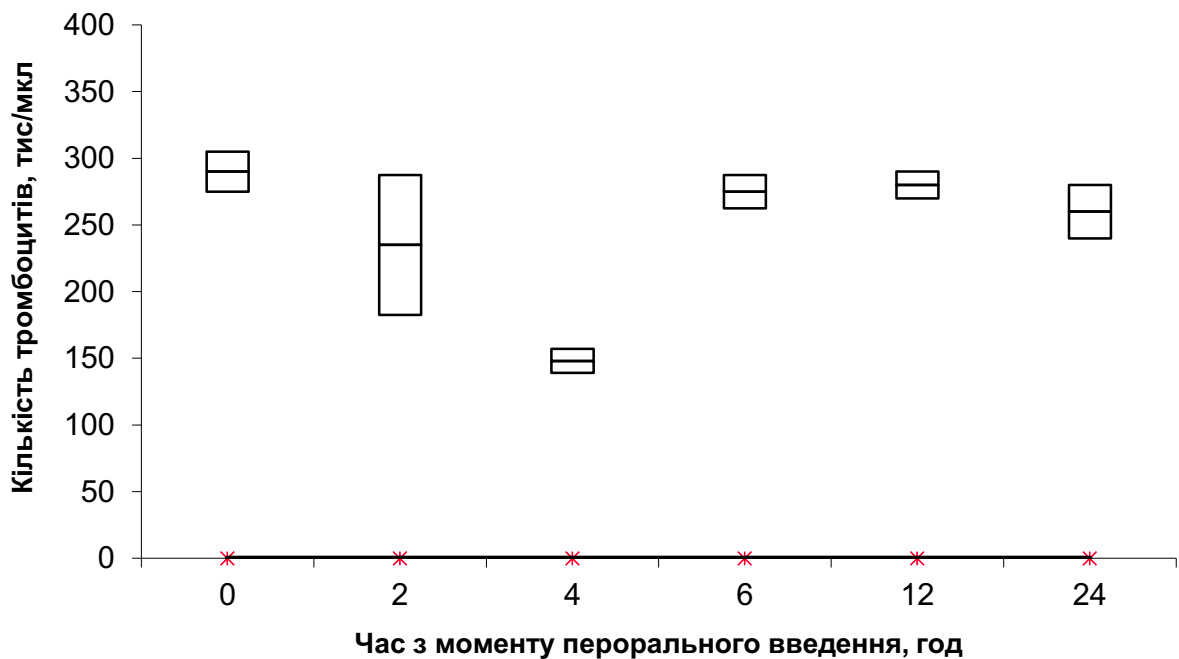


Рис. 5.2. Кількість тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові мишей до та після перорального введення калікс[4]арену С-145.

Попередні дані досліджень *in vitro* показували різке зниження кількості та агрегаційної здатності тромбоцитів під дією калікс[4]арену С-145 за умов його внутрішньовенного введення [85]. Відтак ми перевіряли здатність тромбоцитів миші агрегувати та визначали їхню кількість через різні проміжки часу після перорального введення С-145.

Було показано, що через 3-4 години після перорального введення С-145 кількість тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові мишей знижується вдвічі (Рис. 5.2.).

Вже через 6-7 годин спостерігали нормалізацію кількості тромбоцитів, а через 24 години кількість тромбоцитів знаходилася в межах норми.

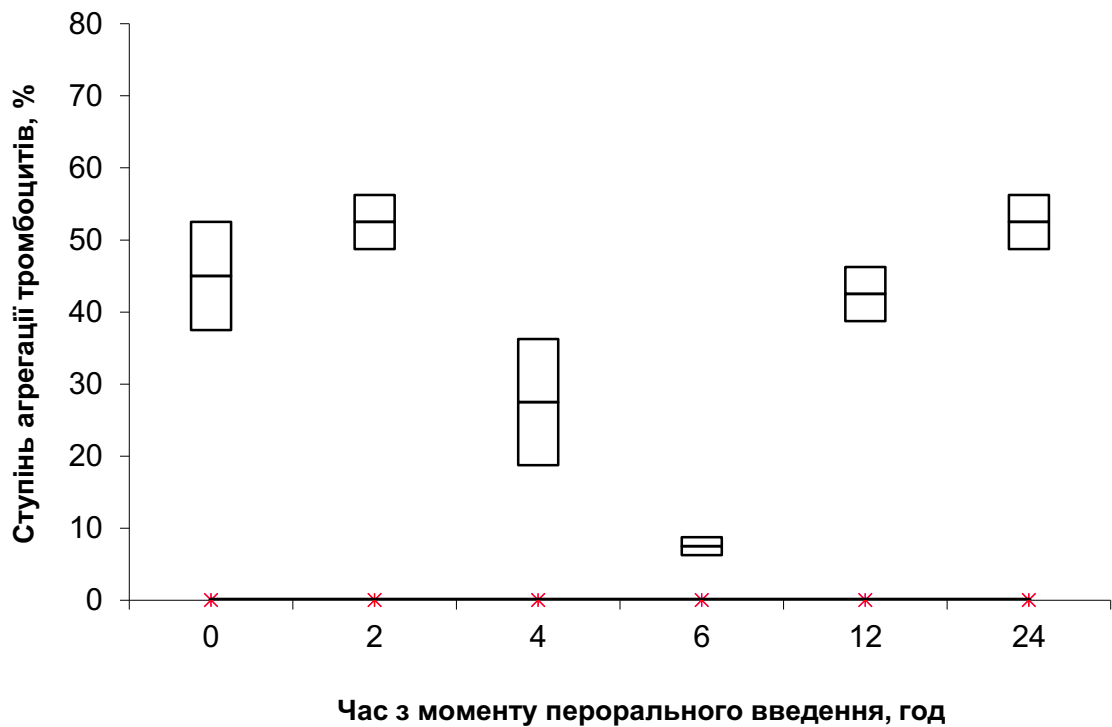


Рис. 5.3. Агрегація тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові мишей до та після перорального введення калікс[4]арену С-145.

Через 4 години після перорального введення С-145 тромбоцити повністю втрачали здатність агрегувати. Агрегаційна здатність тромбоцитів частково відновлювалась через 6-7 годин, а нормалізувалась – через добу після початку експерименту (Рис. 5.3.).

Беручи до уваги отримані дані, щодо ефектів С-145 на транспорт йонів Ca^{2+} , можна припустити, що саме порушення кальцієвого гомеостазу тромбоцитів є причиною різкого зниження ступеня їх агрегації при адміністрації С-145 *in vivo*. Це, однак, не пояснює ефекту зниження кількості тромбоцитів у плазмі крові, яке спостерігається як за внутрішньовенного, так і за перорального введення.

Слід відзначити, що антитромбоцитарний ефект С-145 при пероральному введенні є помітно слабшим ніж показаний раніше антитромбоцитарний ефект при внутрішньовенному введенні С-145.

Даний ефект потребує детально вивчення, а тим часом нам вдалося обрати дозу С-145, яка ефективно знижує прокоагулянтний потенціал системи гемостазу мишей за перорального введення. Споживання *per os* 12 мг/кг С-145 призводить до різкого зниження здатності плазми згортатися, а також здатності тромбоцитів агрегувати. Для ефективної підтримки цього ефекту на сталому рівні варто використати введення С-145 двічі на добу.

РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОДИНАМІКИ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-145 ЗА ПЕРОРАЛЬНОГО ТА ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ

6.1. Динаміка появи та виведення з кровотоку калікс[4]арену С-145 у кровотоці щурів

Аналогічні дослідження з прямого порівняння дії С-145 на час зсідання плазми крові та ступінь агрегації тромбоцитів за умов перорального та внутрішньовенного введення було проведено на щурах. Зокрема визначали час зсідання плазми крові під дією АЧТЧ-реагенту одразу після введення С-145 та через 1-24 години після введення (Рис. 6.1).

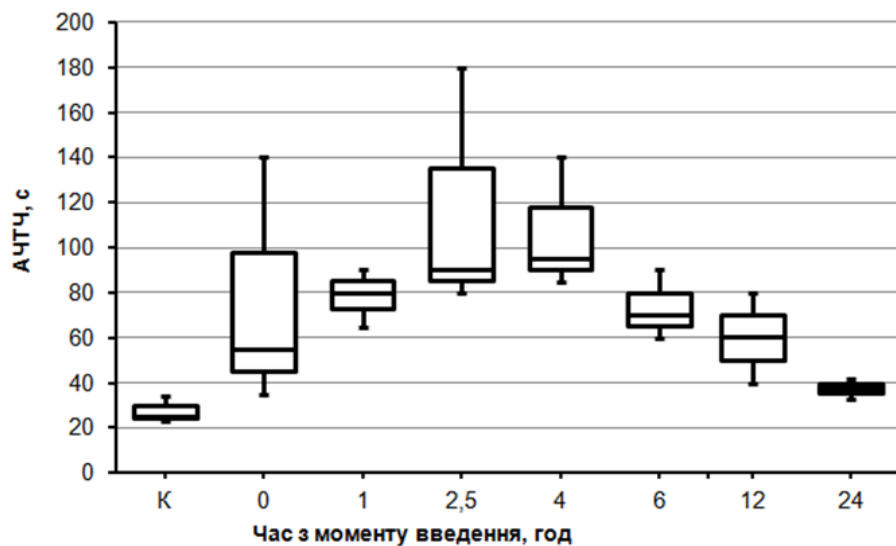


Рис. 6.1. Час зсідання плазми крові щурів у тесті АЧТЧ після внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145 у дозі 12 мг/кг.

К – час зсідання плазми крові контрольної групи щурів.

0-24 – час з моменту введення калікс[4]арену С-145, год.

N = 5.

Показано, що внутрішньовенне введення С-145 суттєво знижувало ступінь агрегації тромбоцитів одразу після введення (Рис. 6.2). Функція тромбоцитів

відновлювалася через добу після введення, однак така різка дія на тромбоцити була би небажаною для антитромботичного препарату.

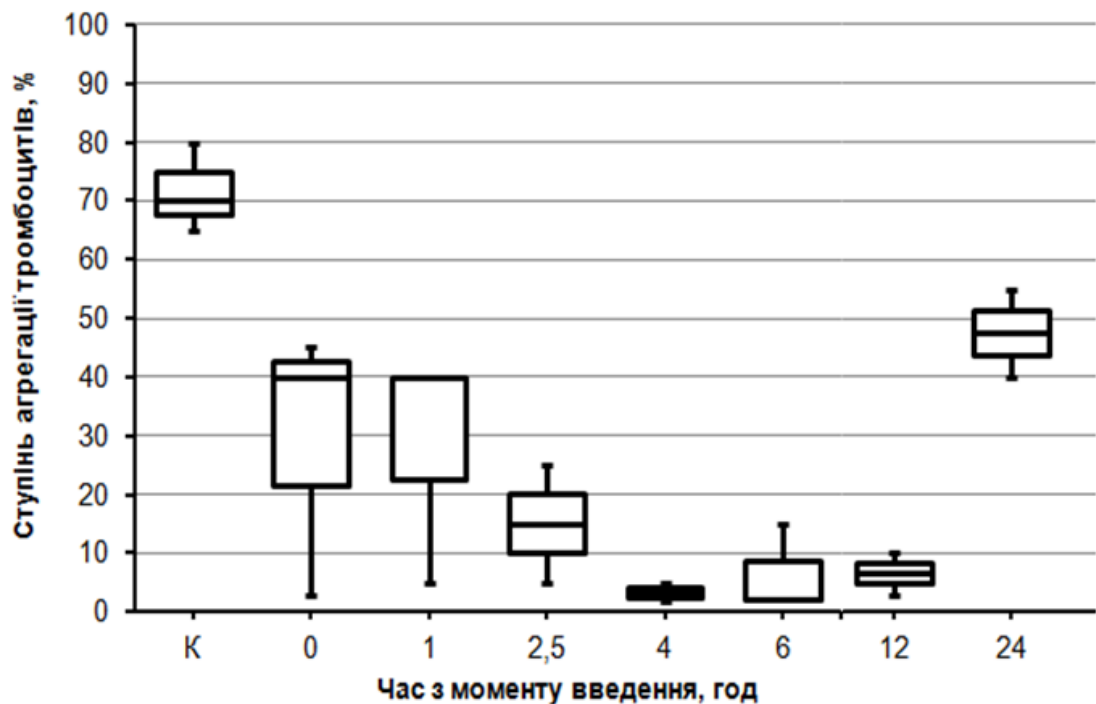


Рис. 6.2. Ступінь агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів після внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145 у дозі 12 мг/кг.

К – ступінь агрегації тромбоцитів контрольної групи щурів.

0-24 – час з моменту введення калікс[4]арену С-145, год.

N = 5.

Було відзначено, що пероральне введення С-145 дозволяє досягнути подібного за ефективністю зниження прокоагулянтного потенціалу плазми крові через 4-6 годин після введення (Рис. 6.3).

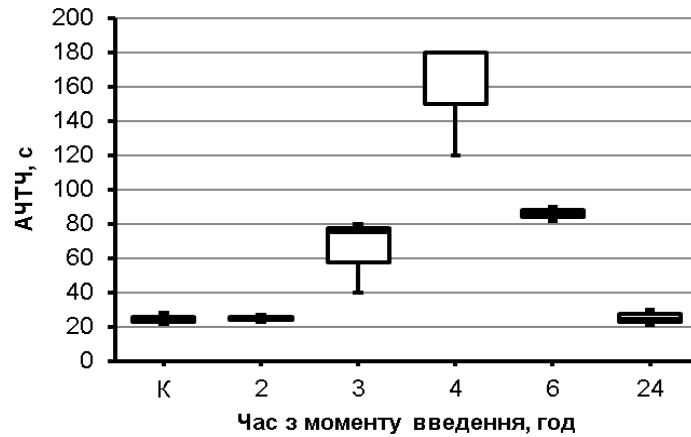


Рис. 6.3. Час зсідання плазми крові щурів у тесті АЧТЧ після перорального введення калікс[4]арену С-145 у дозі 12 мг/кг.

К – час зсідання плазми крові контрольної групи щурів.

0-24 – час з моменту введення калікс[4]арену С-145, год.

N = 5.

Водночас, за умов перорального введення ефект на тромбоцити виявився значно менш вираженим, ніж за умов внутрішньовенного введення (Рис. 6.4).

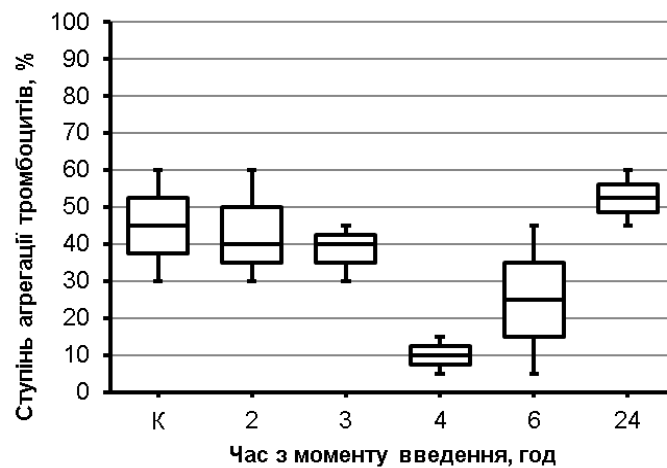


Рис. 6.4. Ступінь агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів після перорального введення калікс[4]арену С-145 у дозі 12 мг/кг.

К – ступінь агрегації тромбоцитів контрольної групи щурів.

0-24 – час з моменту введення калікс[4]арену С-145, год.

N = 5.

Пероральне введення має також значні переваги, оскільки пероральна адміністрація лікарських засобів є простішим та неінвазивним способом доставки діючої речовини у організм хворого [86]. Саме пероральне введення надалі розглядалося нами як основний спосіб застосування С-145.

Варто відзначити індивідуальну реакцію різних щурів на введення препарату. Важливо було дослідити динаміку антитромботичної дії С-145 на одній і тій самій тварині, що у випадку малих тварин (щурів та мишей) було неможливим.

6.2. Динаміка появи та виведення з кровотоку кролів калікс[4]арену С-145.

Застосування у експерименті великих тварин (кролів) дозволило визначати антитромботичний ефект С-145 у однієї й тієї ж тварини – до введення та в процесі появи та зникнення ефекту. Для цього С-145 у дозі 12 мг/кг було введено внутрішньовенно. Забирали зразки плазми крові кожного кроля до та після введення С-145, а також через добу після введення (Рис. 6.5).

Було показано, що через 2 години після введення С-145 час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ подовжувався в 1,5 рази. Максимальний антитромботичний ефект було досягнуто через 6 годин після введення, фібриноутворення було заінгібоване через 12 годин; час зсідання плазми крові нормалізувався через 24 години та лишався стабільним через 72 години.

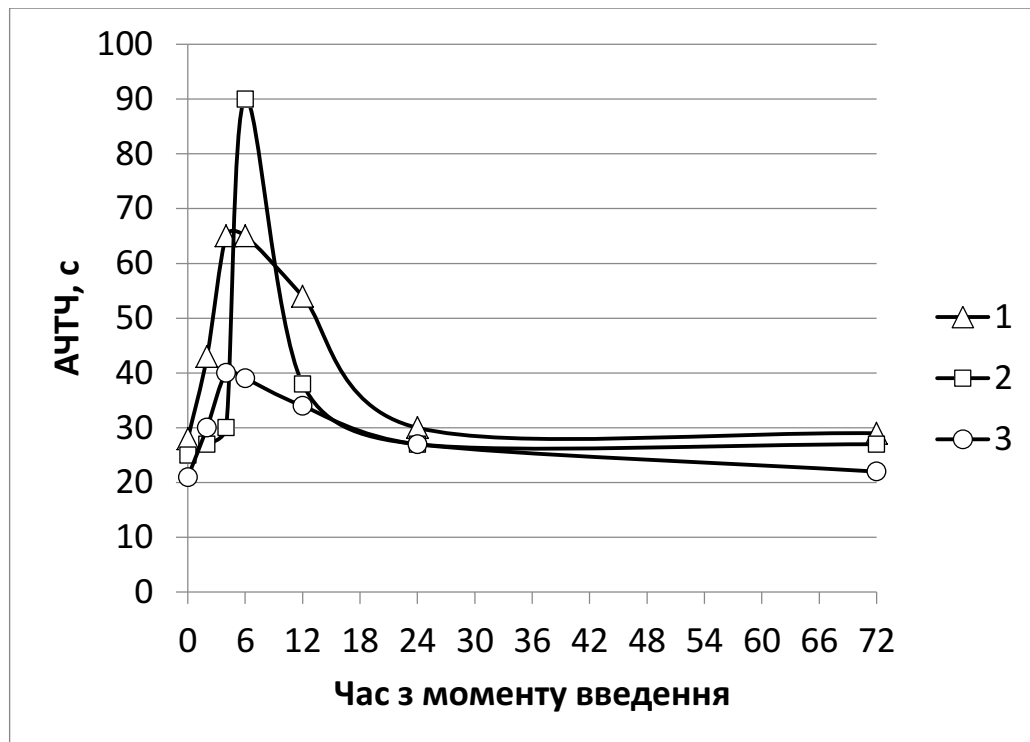


Рис. 6.5. Час зсідання у тесті АЧТЧ плазми крові кролів до та після внутрішньовенного введення С-145 через 2, 4, 6, 12, 24 та 72 години.

n = 3.

Таким чином, з використанням трьох модельних груп тварин (мишей, щурів та кролів), було показано ефективну антиполімеризаційну дію С-145 за умов перорального та внутрішньовенного введення. У випадку внутрішньовенного введення дія С-145 на полімеризацію фібрину супроводжується також зниженням ступеня агрегації тромбоцитів. За перорального введення цей ефект був менш вираженим. Стійкий антитромботичний ефект спостерігали протягом 12 годин після адміністрації С-145, через добу спостерігали відновлення вихідних параметрів.

Ці дослідження дозволили обрати найбільш ефективну дозу (12 мг/кг) та найзручніший спосіб введення (пероральний) для застосування С-145 з метою корекції передтромботичних станів.

6.3. Побудова калібрувального графіка залежності часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ від концентрації калікс[4]арену С-145

Для побудови калібрувальної кривої було приготовлено стоковий розчин калікс[4]арену С-145 з концентрацією 0,6 мг/мл у 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7.4. Розчин калікс[4]арену С-145 вносили в донорську плазму крові у діапазоні концентрацій від 6 до 40 мкг/мл та вивчали час зсідання у тесті активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ).

Для цього до 100 мкл плазми крові вносили від 3 до 20 мкл розчину калікс[4]арену С-145 (0,6 мг/мл), 80 мкл АЧТЧ-реагенту (Siemens, Німеччина) та 0,05 М трис-НСІ буфер рН 7.4 до загального об'єму 200 мкл. Після інкубування протягом 3 хв при 37 °С реакцію зсідання плазми крові ініціювали внесенням 100 мкл розчину СаСl₂ з концентрацією 0,025 М (Siemens, Німеччина). Фіксували час утворення згустку з використанням камери для АЧТЧ тесту (власного виготовлення). У даному досліді перша проба є контролем.

З отриманих даних можна побачити, що у такому діапазоні концентрацій (6-40 мкг/мл) калікс[4]арен С-145 подовжує час утворення фібринового згустку. Для оцінки його антиполімеризаційного ефекту обчислювали відношення часу зсідання дослідної плазми крові, в яку було внесено розчин калікс[4]арену С-145 (АЧТЧд) до часу зсідання контрольної плазми крові, до якої було внесено еквівалентну кількість 0,05 М трис-НСІ буфера з рН 7.4 (АЧТЧк). Результати обрахунків наведено у табл. 6.1.

Отримані результати було використано для побудови калібрувального графіка залежності часу зсідання плазми крові від кількості калікс[4]арену С-145 (Рис. 6.6). Графік надає змогу кількісно визначати вміст калікс[4]арену С-145 в плазмі крові за антиполімеризаційним ефектом за концентрації до 40 мкг/мл. Вищі концентрації калікс[4]арену С-145 призводили до повного інгібування здатності плазми крові формувати згусток.

Таблиця 6.1

Залежність часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ від концентрації калікс[4]арену С-145 *in vitro*

Номер тесту	Загальний об'єм проби, мкл	Об'єм розчину калікс[4]арену С-145, яка була внесена у пробу, мкл	Вміст калікс[4]арену С-145 у пробі, мкг/мл	Час утворення згустка, с	АЧТЧ _д /АЧТЧ _к
1	300	0	0	50	1
2	300	3	6	56	1,12
3	300	6	12	79	1,58
4	300	10	20	153	3,06
5	300	15	30	165,5	3,31
6	300	20	40	253	5,06

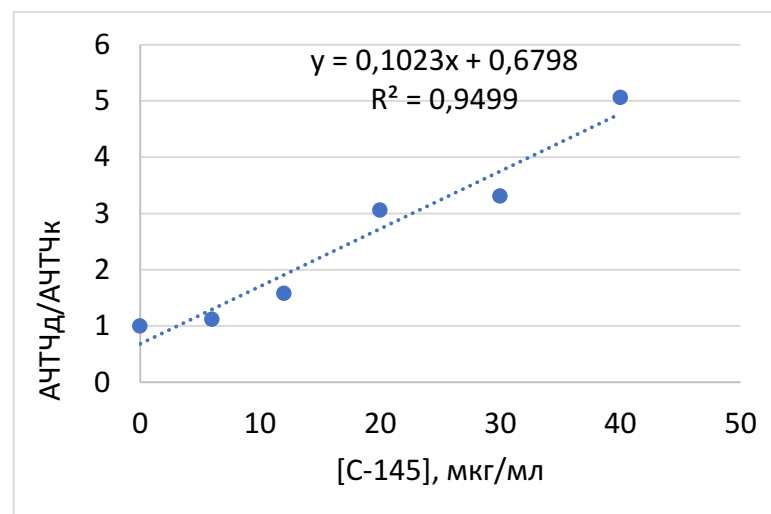


Рис. 6.6. Калібрувальний графік для встановлення концентрації калікс[4]арену С-145 у плазмі крові щурів.

Отриманий графік було використано для оцінки вмісту калікс[4]арену С-145 у плазмі крові лабораторних тварин, зокрема за умов внутрішньовенного введення кролям та перорального введення щурам у дозі 12 мг/кг. Використання

кроля, досить великої тварини, дозволило отримувати зразки плазми крові у однієї й тієї ж особини до та через певні проміжки часу після введення калікс[4]арену С-145.

Таблиця 6.2

Відносне подовження часу зсідання плазми крові кроля в тесті активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) за умов внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145.

Час з моменту внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145, год	Відносне подовження часу зсідання плазми крові, АЧТЧ _д /АЧТЧ _к
0	1
2	1,54
4	2,324
6	2,324
12	1,93
24	1,07
48	1

Примітка: АЧТЧ_д – час зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбопластиновий час тварин *дослідної* групи;

АЧТЧ_к – час зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбопластиновий час тварин *контрольної* групи.

Було виявлено досягнення максимального антиполімеризаційного ефекту калікс[4]арену С-145 через 2-6 годин після введення та його поступове зниження через добу після введення. Через 2 доби після введення антиполімеризаційний ефект сполуки повністю зникав. На піку концентрації вміст калікс[4]арену С-145 знаходився на межі детектуючої можливості запропонованого нами методу й не перевищував 80 мкг/мл (Рис. 6.7.).

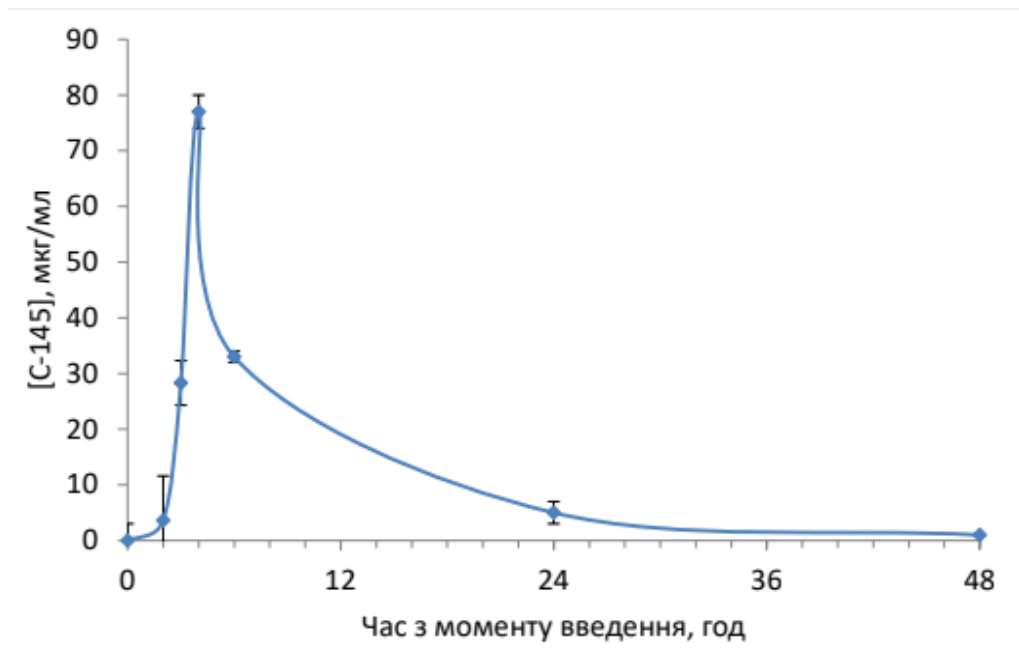


Рис. 6.7. Концентрація калікс[4]арену С-145 у плазмі крові кроля до внутрішньовенного введення та через 3, 4, 6, 12, 24, 48 годин після введення, обчислена за подовженням часу зсідання плазми крові за графіком, наведеним на Рис. 6.6.

Аналогічним чином було досліджено появу та зникнення з кровотоку калікс[4]арену С-145 за подовженням часу зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) за умов перорального введення калікс[4]арену С-145 щурам у дозі 12 мг/кг (Таблиця 6.3).

Застосування створеного нами калібрувального графіка дозволило показати накопичення калікс[4]арену С-145 у плазмі крові через 4 години після перорального введення щурам та досягнення максимальної концентрації (до 40 мкг/мл) через 6 годин (Рис. 6.8). Через добу після вживання розчину калікс[4]арену С-145 його вміст у плазмі крові не перевищував 7 мкг/мл.

Таблиця 6.3

Відносне подовження часу зсідання плазми крові щурів в тесті активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) за умов перорального введення калікс[4]арену С-145 у дозі 12 мг/кг ($n = 3$ у кожній точці).

Час з моменту внутрішньовенного введення калікс[4]арену С-145, год	Відносне подовження часу зсідання плазми крові, АЧТЧ _д /АЧТЧ _к
0	1
2	1,05
3	3,57
4	8,57
6	4,05
24	1,19

Примітка: АЧТЧ_д – час зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбопластиновий час тварини *дослідної* групи;

АЧТЧ_к – час зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбопластиновий час тварини *контрольної* групи.

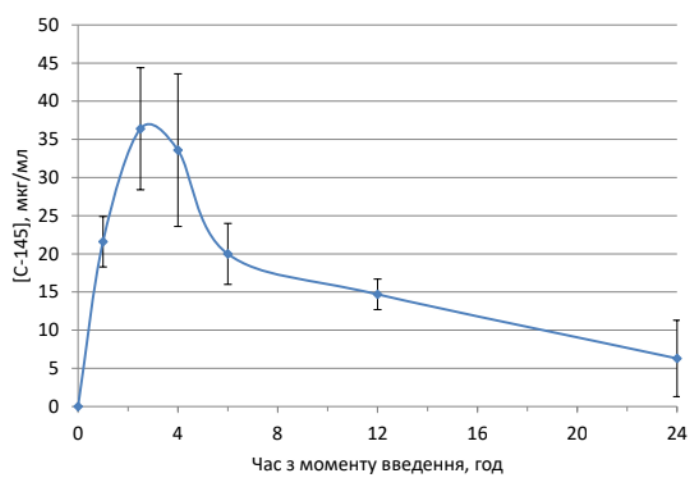


Рис. 6.8. Концентрація калікс[4]арену С-145 у плазмі крові щурів до внутрішньовенного введення та через 2, 3, 2, 6, 24 годин після введення, обчислена за подовженням часу зсідання плазми крові за графіком, наведеним на Рис. 6.6. ($n = 3$ для кожної точки).

Таким чином, використаний нами підхід дозволив кількісно оцінити вміст калікс[4]арену С-145 у плазмі крові лабораторних тварин за антиполімеризаційним ефектом.

РОЗДІЛ 7. АПРОБАЦІЯ ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ЗАСІБ КАЛІКС[4]АРЕН С-145» ЗА УМОВ ПЕРЕДТРОМБОТИЧНОГО СТАНУ

7.1. Дія С-145 на компоненти системи гемостазу за умов дієти з високим вмістом холестеролу

Калікс[4]арен С-145 зарекомендував себе як ефективний засіб інгібування полімеризації фібрину *in vivo*. Ключовим завданням, яке необхідно було виконати, аби оцінити придатність С-145 для зниження прокоагулянтного потенціалу, стало вивчення його антитромботичної дії за умов експериментального передтромботичного стану.

Ми розглядаємо С-145 як прототип антитромботичного препарату, який у перспективі буде застосовуватися для корекції стану системи гемостазу. Такий препарат буде призначатися системно або ж курсами лікування за умов появи факторів ризику внутрішньосудинного тромбоутворення. Тому ми застосовували С-145 у обраній дозі 12 мг/кг маси тіла щурам упродовж вироблення моделі передтромботичного стану протягом 2 місяців.

Як модель передтромботичного стану було обрано дієту з високим вмістом холестеролу у спонтанно гіпертензивних щурів. Відомо, що навіть дієта з високим вмістом холестеролу або вісцерального жиру не здатна індукувати передтромботичний стан у лабораторних тварин [87]. Моделі тромбозу, які успішно застосовуються у дослідженнях, спрямовані на локальну індукцію тромбоутворення та непридатні для дослідження генералізованого тромбогенезу або передтромботичного стану [88].

Для моделювання передтромботичного стану нами було запропоновано застосування дієти з високим вмістом холестеролу (3 %) протягом 2 місяців лінійним спонтанно гіпертензивним щурам-самицям (SHR). Спонтанна гіпертензія була додатковим фактором навантаження, який обумовлював появу загрози внутрішньосудинного зсідання крові за умов постійно підвищеного вмісту

холестеролу в крові [89, 90]. По завершенні терміну створення моделі аналізували стан системи гемостазу щурів та вивчали гістологічно морфологію їхніх аорт.

Було створено три експериментальні групи по 10 особин кожна. Група 1 – спонтанно гіпертензивні щури, які отримували стандартний раціон віварію, яким щоденно випоювали 0,5 мл фізіологічного розчину. Група 2 – спонтанно гіпертензивні щури, які отримували корм з 3 % вмістом холестеролу, яким щоденно випоювали 0,5 мл фізіологічного розчину. Група 3 – спонтанно гіпертензивні щури, які отримували корм з 3 % вмістом холестеролу, яким випоювали щоденно 0,5 мл С-145 з розрахунку 12 мг/кг маси тіла.

Показано, що споживання дієти з високим вмістом холестеролу призводить до зростання вмісту в плазмі крові щурів вмісту ліпопротеїнів низької щільності, які є основною транспортною формою холестерину в крові. Корекція С-145 не впливала на цей показник. Вміст ліпопротеїнів високої щільності за умов високожирової дієти зростає, але не значно (Рис. 7.1).

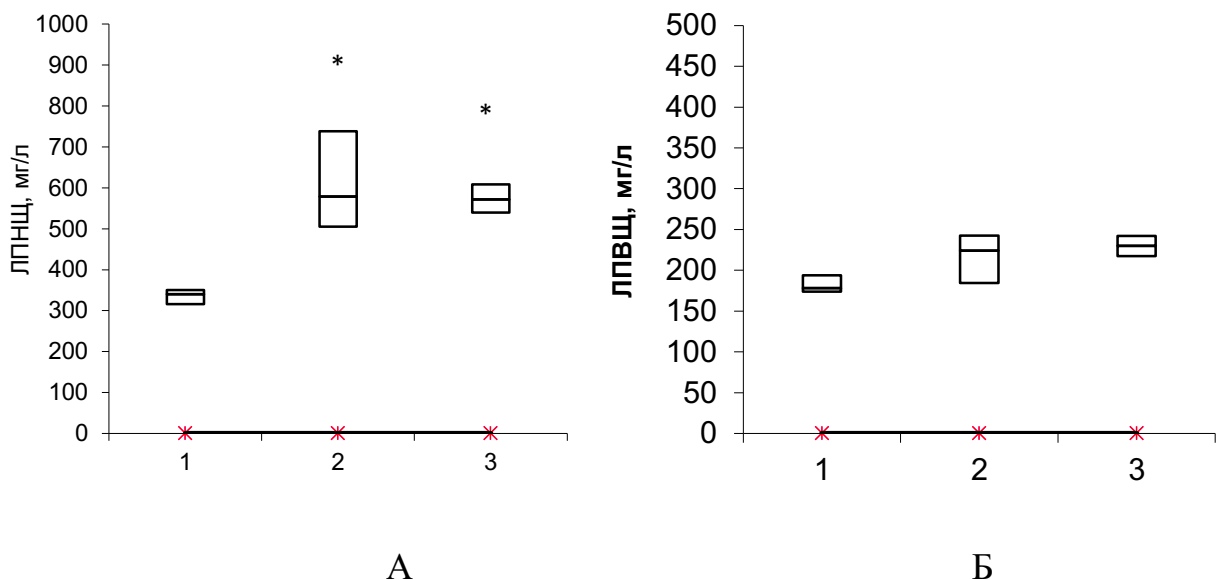


Рис. 7.1. Вміст ліпопротеїнів низької щільності (А, ЛПНЦ) та ліпопротеїнів високої щільності (Б, ЛПВЦ) у спонтанно гіпертензивних щурів (1), у щурів, які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %) (2) та за умов корекції препаратом С-145 (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00262$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Для оцінки загрози розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення у експериментальних тварин визначали час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ (Рис. 7.2). Було показано скорочення часу зсідання плазми крові щурів у тесті АЧТЧ за умов дієти з високим вмістом холестеролу. Це вказує на підвищення прокоагулянтного потенціалу плазми крові.

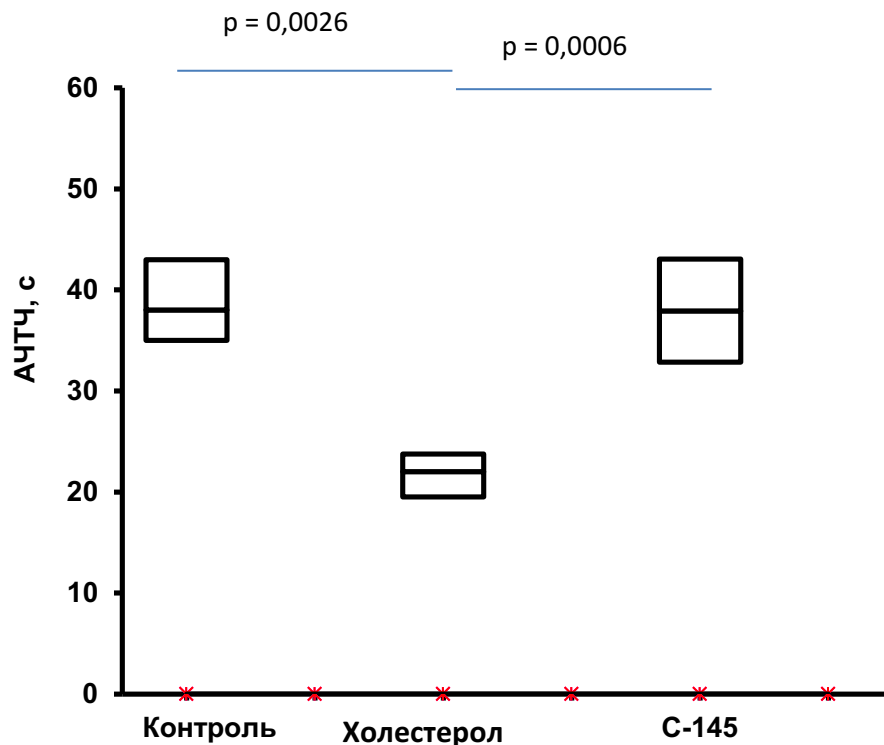


Рис. 7.2. Час зсідання плазми крові щурів у тесті АЧТЧ у спонтанно гіпертензивних щурів (Контроль), у щурів, які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %) (Холестерол) та за умов корекції препаратом (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00262$. Результат достовірний $p < 0,05$.

@ Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0006$. Результат достовірний $p < 0,05$.

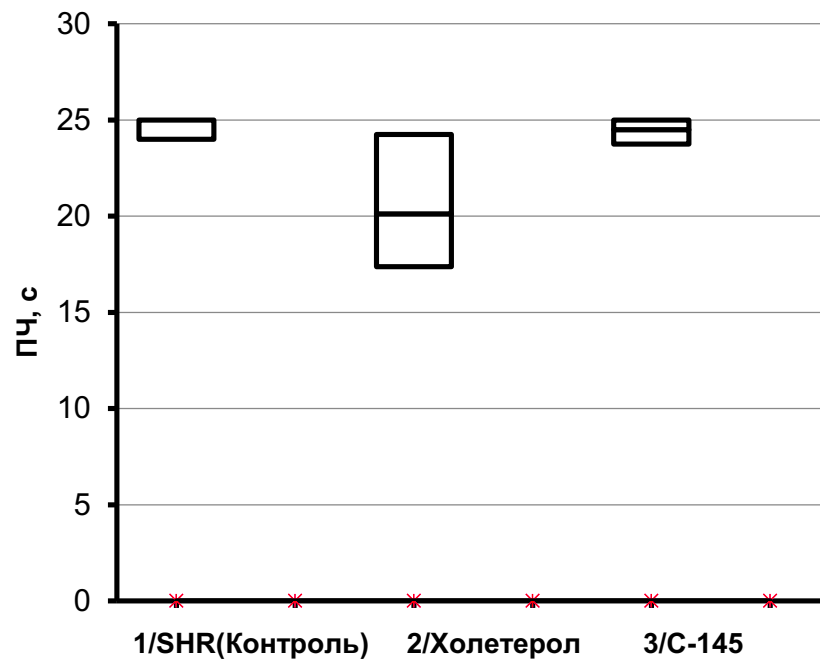


Рис. 7.3. Протромбіновий час зсідання плазми крові спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %) (2) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» (3).

Скорочення часу зсідання плазми крові – досить незвична картина, однак її можна пов'язати з підвищенням прокоагулянтного потенціалу плазми крові [91]; воно також може бути викликане підвищеним рівнем фібриногену [92, 93].

Можна говорити також і про тенденцію до скорочення часу зсідання плазми крові за умов дієти з високим вмістом холестеролу, а також нормалізацію показника в іншому скринінговому тесті – протромбіновий час (Рис. 7.3.). Водночас, достовірної різниці у показниках цього тесту виявлено не було.

Несподівані результати отримано при вивченні вмісту фібриногену у плазмі крові щурів за умов дієти з високим вмістом холестеролу та введення калікс[4]арен С-145 (Рис. 7.4.). Фібриноген – ключовий протеїн системи зсідання крові. Під дією тромбіну він перетворюється на фібрин, здатний до спонтанної полімеризації, формуючи полімерний фібрин – основу тромбу. З іншого боку,

фібриноген є протеїном гострої фази запалення, його вміст зростає за умов розвитку запального процесу [94, 95, 96].

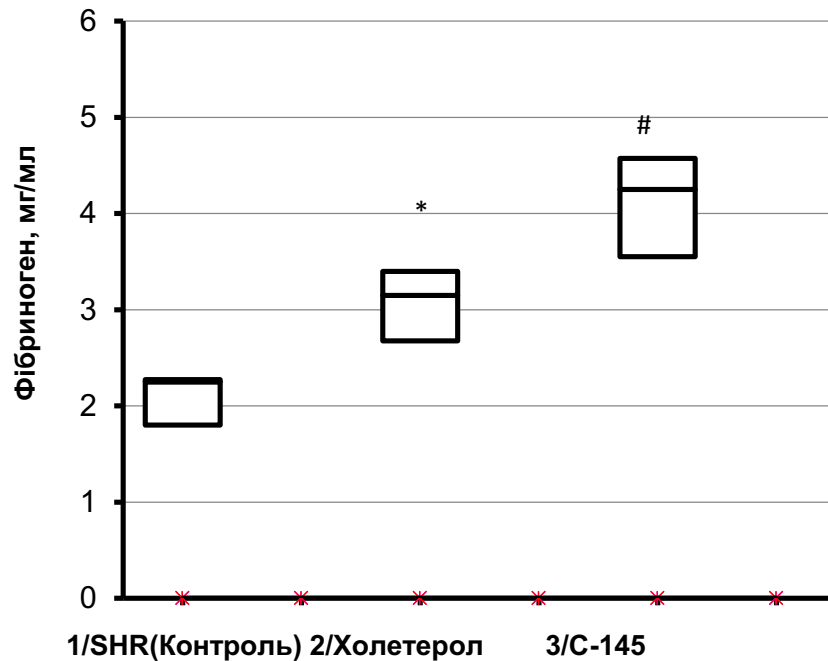


Рис. 7.4. Концентрація фібриногену в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %) (2) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00152$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00108$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Дієта з високим вмістом холестеролу призводила до достовірного підвищення концентрації фібриногену, чого загалом можна було сподіватися. Однак, на тлі введення калікс[4]арен С-145, який зменшує прокоагулянтний потенціал плазми крові, концентрація фібриногену не знижувалась (Рис. 7.4.).

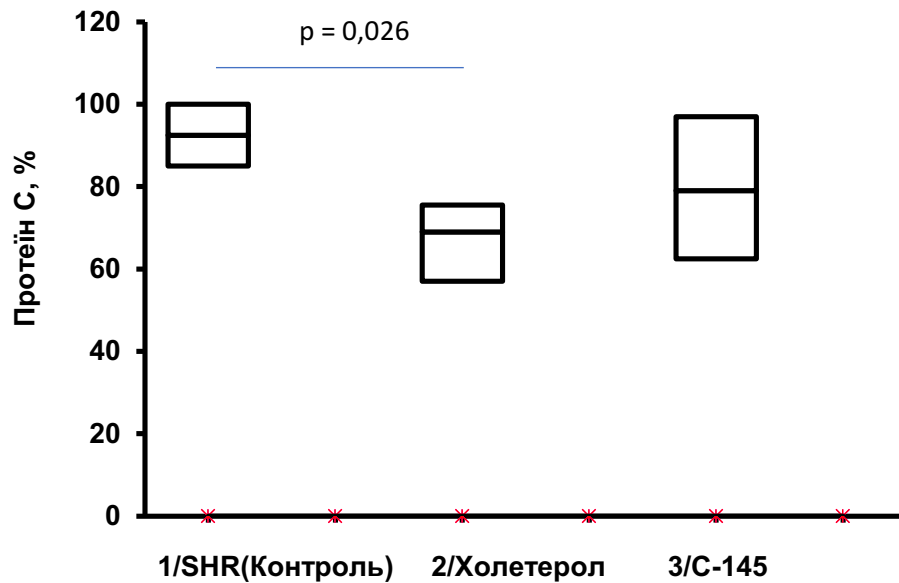


Рис. 7.5. Рівень протеїну С в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів (контроль), які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %) (холестерол) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0026$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Аби з'ясувати, чи може це бути пов'язано з розвитком процесу запалення, ми досліджували вміст протеїну С, який є не лише головним протеїном антикоагулянтної системи, але і протеїном, який приймає участь у протизапальних процесах, діючи на PAR-1 рецептори [97, 98].

За умов дієти з високим вмістом холестеролу виявлено достовірне зниження вмісту протеїну С (Рис. 7.5.). Це може свідчити про розвиток запального процесу на тлі такої дієти, що підтверджується також і результатами вимірювання концентрації фібриногену.

Застосування лікарської субстанції «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» достовірно нормалізувало час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ (Рис. 7.2), а також скорочувало час зсідання в тесті ПЧ (Рис. 7.3). Попри те, що С-145 не знижував концентрацію фібриногену (Рис. 7.4), його застосування нормалізувало

вміст протеїну С (Рис. 7.5), що свідчить про протизапальний ефект. Таким чином, підвищення концентрації фібриногену, яке ми спостерігали у групі щурів на тлі введення калікс[4]арену С-145, не було пов'язано з запальним процесом.

Іншою важливою складовою гемостатичної рівноваги є судинно-тромбоцитарна ланка [99]. Для її характеристики оцінювали агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів. У групі спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з 3 % холестеролу, спостерігали значне достовірне зростання ступеня та швидкості агрегації тромбоцитів (Рис. 7.6, 7.7).

Таке різке підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів безумовно свідчить про загрозу внутрішньосудинного тромбоутворення. Важливо, що введення С-145 упродовж вироблення моделі достовірно нормалізувало ступінь та суттєво знижувало швидкість агрегації тромбоцитів (Рис. 7.6, 7.7).

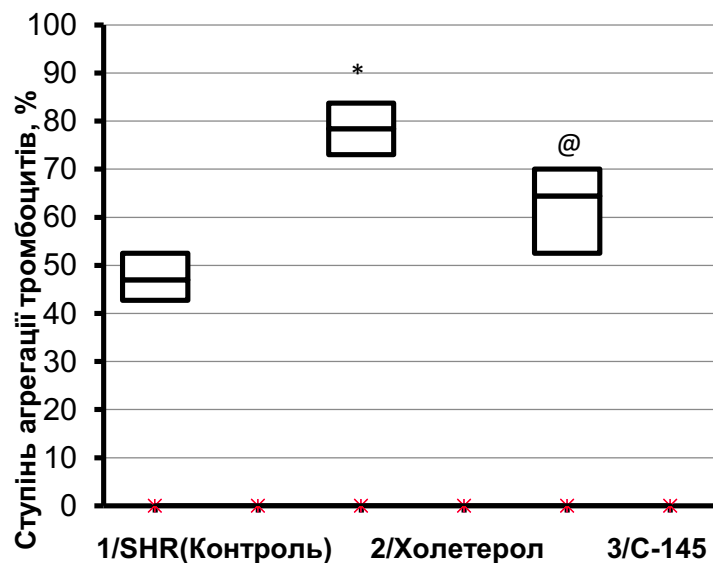


Рис. 7.6. Ступінь агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %) (2) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00054$. Результат достовірний $p < 0,05$.

@ Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00096$. Результат достовірний $p < 0,05$ (порівняно з групою «2»).

Ми вважаємо, що цей ефект пояснюється прямим інгібуванням побудови тривимірної сітки фібрину – каркасу фібриново-тромбоцитарного тромбу.

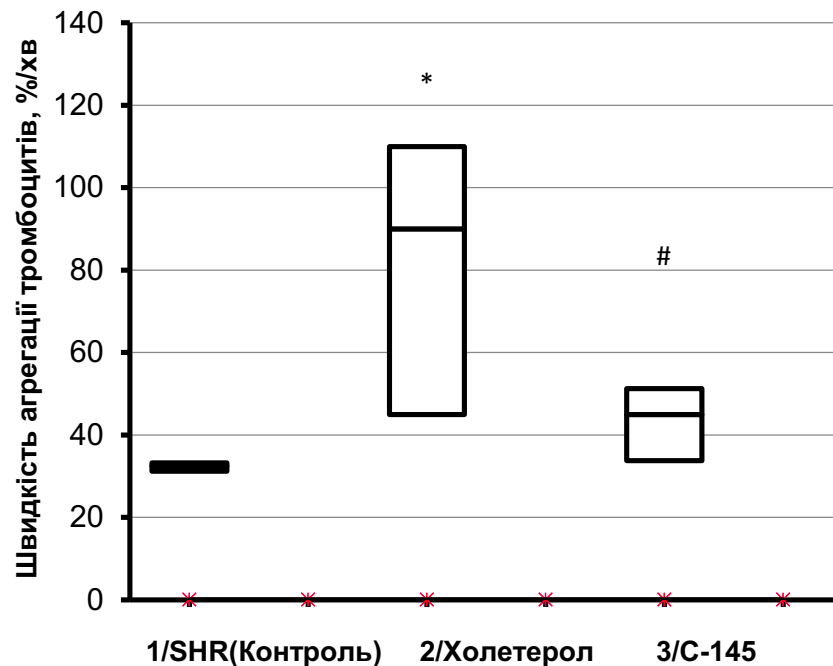


Рис. 7.7. Швидкість агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %), (2) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,01208$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,04036$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Розвиток передтромботичного стану, як правило, пов'язаний з внутрішньосудинною генерацією тромбіну. У використаній нами моделі поява функціонально активного тромбіну підтверджена скороченням часу зсідання плазми крові у коагуляційних тестах та зниженням вмісту протеїну С. Водночас активний тромбін здатен активувати ендотеліоцити, а утворені під його дією фібринові депозити призводять до локального запалення та порушення цілісності ендотелію. Тому важливо

було дослідити стан стінки судини, зокрема аорти, у спонтанно гіпертензивних щурів за дієти з високим вмістом холестеролу у тому числі на тлі застосування С-145.

Гістологічний аналіз стінки аорти щурів показав, що дієта з високим вмістом холестеролу призводить до зміни архітектури стінки аорти (Рис. 7.7). Зокрема, у більшості досліджених щурів, які щоденно отримували таку дієту, спостерігали видиме потовщення стінки аорти, порівняно з контрольною групою.

Водночас, у медіа стінки аорти щурів на тлі дієти з високим вмістом холестеролу спостерігали видозмінену тканину – на фотографіях це білі ділянки, які не профарбувалася, а отже містять елементи сполучної тканини або ліпіди. Ці ділянки вкриті зовні тонким шаром ендотелію (Рис. 7.7 Б).

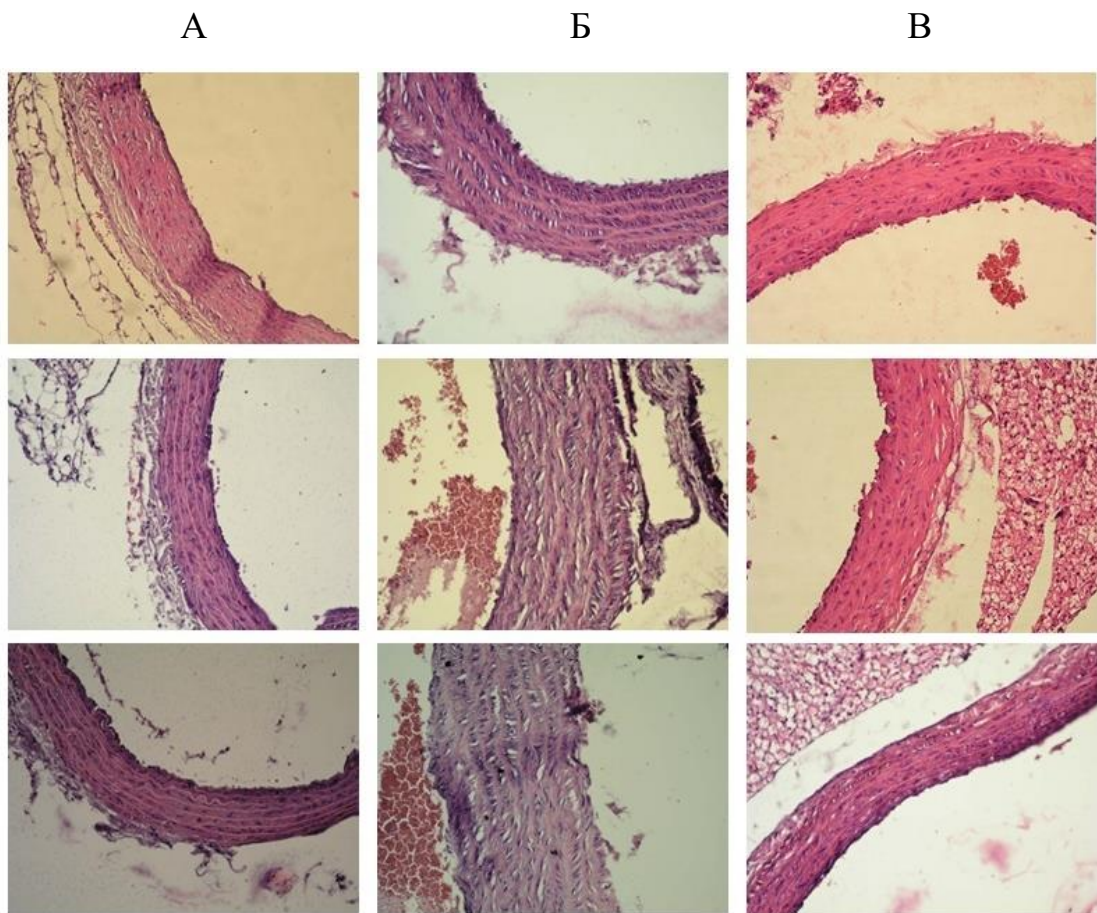


Рис. 7.7. Репрезентативні зрізи аорти спонтанно гіпертензивних щурів. А – зрізи аорти контрольного щура, Б – зрізи аорти щурів, які отримували корм з високим вмістом холестеролу, В – зрізи аорти щурів за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145».

Для кількісної оцінки цих патологічних змін проводили аналіз гістологічних зрізів у програмі ImageJ. Стінка аорти щурів на тлі дієти з високим вмістом холестеролу була товщою за стінку аорти контрольних щурів (Рис. 7.8).

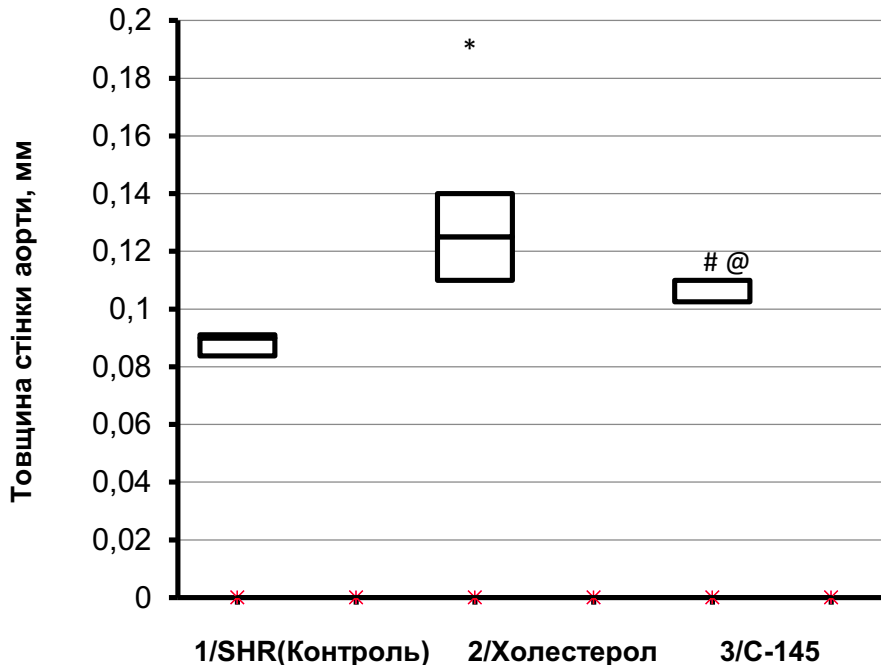


Рис. 7.8. Товщина стінки аорти спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %), (А) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145».

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00308$. Результат достовірний $p < 0,05$.

Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0083$. Результат достовірний $p < 0,05$.

@ Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0271$. Результат достовірний $p < 0,05$ (порівняно з групою «А»).

Також обчислили відсоток видозміненої тканини в медіа аорти. Обрахунки загальної площі білих включень у програмі ImageJ дозволили показати, що

застосування С-145 достовірно зменшувало кількість переродженої тканини в медіа аорти (Рис. 7.9).

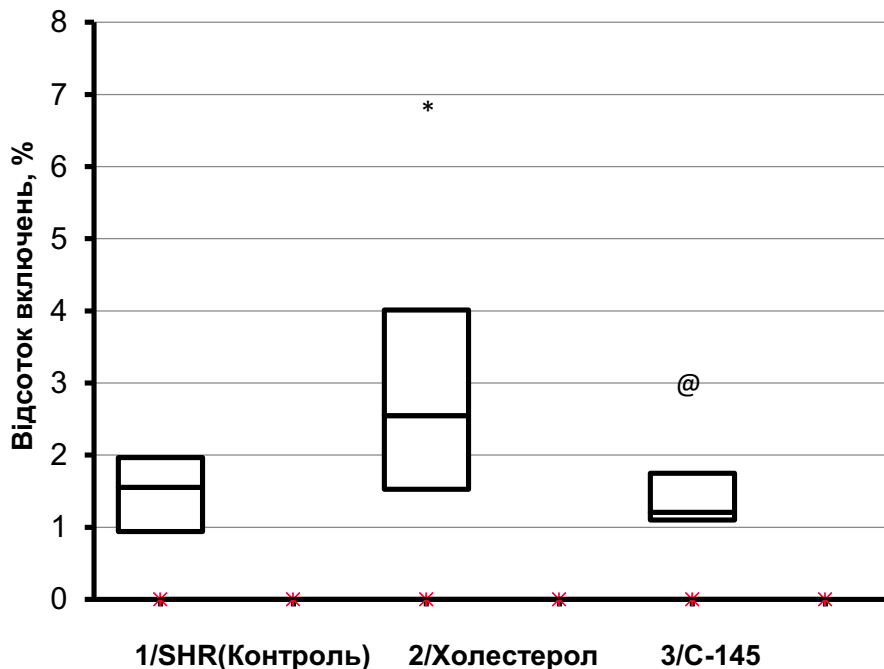


Рис. 7.9. Відсоток жирових і сполучнотканинних включень у стінці аорти спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з високим вмістом холестеролу (3 %), (2) та за умов корекції лікарською субстанцією «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,11876$. Результат достовірний $p < 0,5$.

@ Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0096$. Результат достовірний $p < 0,05$ (порівняно з групою 2).

Застосування прямого інгібітора полімеризації фібрину (лікарської субстанції «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145») достовірно зменшувало товщину стінки аорти (Рис. 7.8) та зменшувало кількість видозміненої тканини в ній (Рис. 7.9). Ми пов'язуємо цей ефект саме із

антиполімеризаційною дією С-145, яка запобігає формуванню фібринових депозитів, що здатні ушкоджувати стінку судини. Разом із продемонстрованим антитромботичним ефектом С-145 така судиннопротекторна дія є ще однією рисою, яка засвідчує перспективність майбутнього терапевтичного препарату.

7.2. Дія С-145 на компоненти системи гемостазу за умов високожирової дієти

Застосування дієти з високим вмістом холестеролу дозволило виробити у спонтанно гіпертензивних щурів передтромботичний стан та апробувати лікарську субстанцію «Каліксарен С-145» як антитромботичний засіб. За такої постановки експерименту кров дослідних тварин штучно насичувалася холестеролом, що створювало передумови до активації системи зсідання крові генерації тромбіну та підвищення прокоагулянтного потенціалу плазми крові.

Однак, для підтвердження ефективності С-145 як антитромботичного агенту *in vivo*, було важливо дослідити його властивості за умов розвитку передтромботичного стану у метаболічній моделі, яка б точніше відображала реальні патофізіологічні зміни у організмі. Для цього було обрано модель високожирової дієти у спонтанно гіпертензивних щурів. Щурам SHR вигодовували корм з вмістом вісцерального жиру понад 30 % протягом 6 місяців. Останні два місяці дослідні щурі отримували С-145 перорально у кількості 12 мг/кг маси тіла (Рис. 7.10).

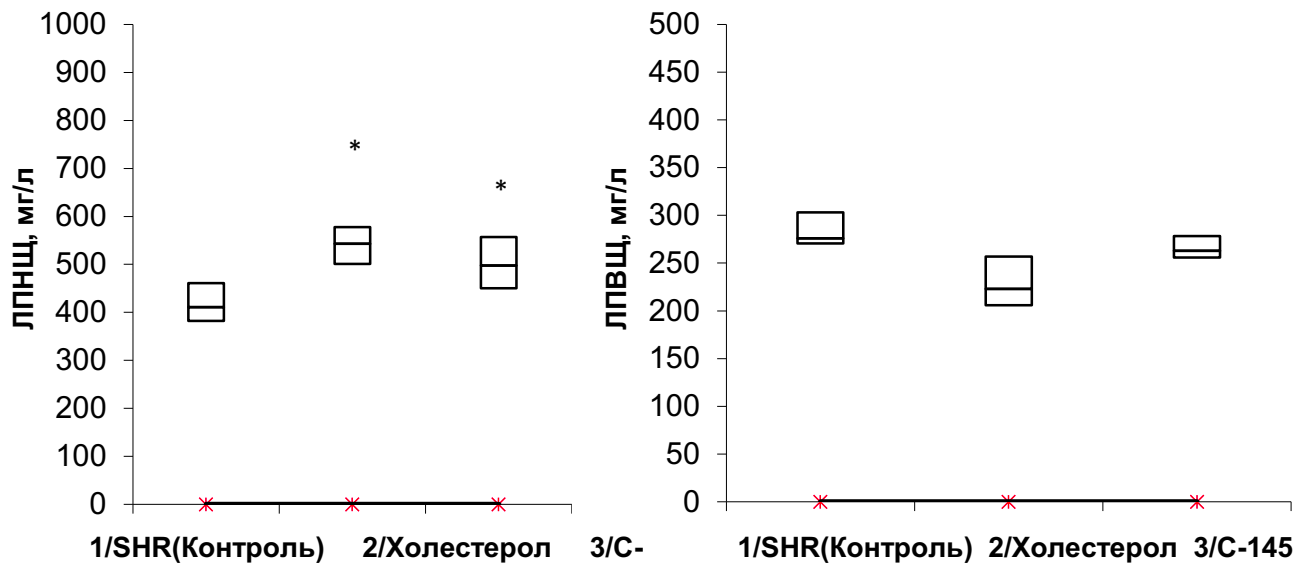


Рис. 7.10. Вміст ліпопротеїнів низької щільності (А, ЛПНЩ) та ліпопротеїнів високої щільності (Б, ЛПВЩ) у спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з вмістом вісцерального жиру (30 %) (2) та за умов корекції препаратом С-145 (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00262$. Результат достовірний при $p < 0,05$.

Розвиток передтромботичного стану у щурів підтверджували скороченням часу зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ (Рис. 7.2). Порівняно з «холестерольною» моделлю передтромботичного стану, «метаболічна» модель призводила до менш вираженого скорочення часу зсідання плазми крові, яке, однак, було достовірне [100]. Застосування С-145 упродовж 2 останніх місяців вироблення моделі дозволило уникнути цього скорочення, час зсідання плазми крові не відрізнявся від контрольних значень (Рис. 7.11).

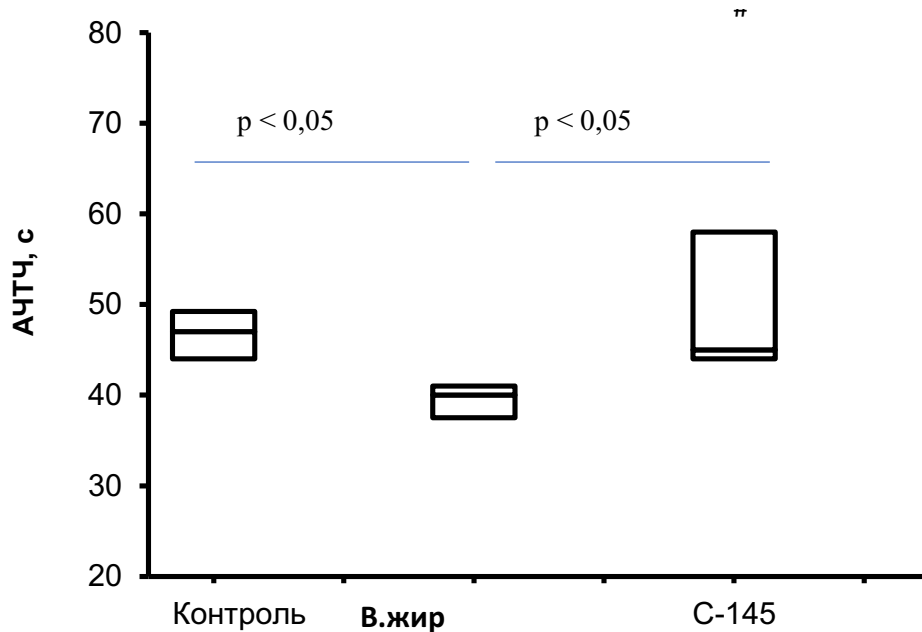


Рис. 7.11. Час зсідання плазми крові щурів у тесті АЧТЧ у спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А) та за умов корекції препаратом С-145 (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний $p < 0,05$, порівняно з контролем.

Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний $p < 0,05$, порівняно з групою А.

Визначення протеїну С у плазмі крові щурів за умов високожирової дієти показало різке зниження його вмісту в середньому до 50 % (Рис. 7.12). Такого значного зниження не спостерігали за умов холестерольної дієти, однак застосування С-145 і в цьому випадку дозволило запобігти цьому явищу. Оскільки протеїн С споживається за умов запалення або внутрішньосудинної генерації тромбіну, можна говорити про те, що антиполімеризаційна дія С-145 запобігає утворенню фібринових депозитів, що зменшує запальні процеси у організмі.

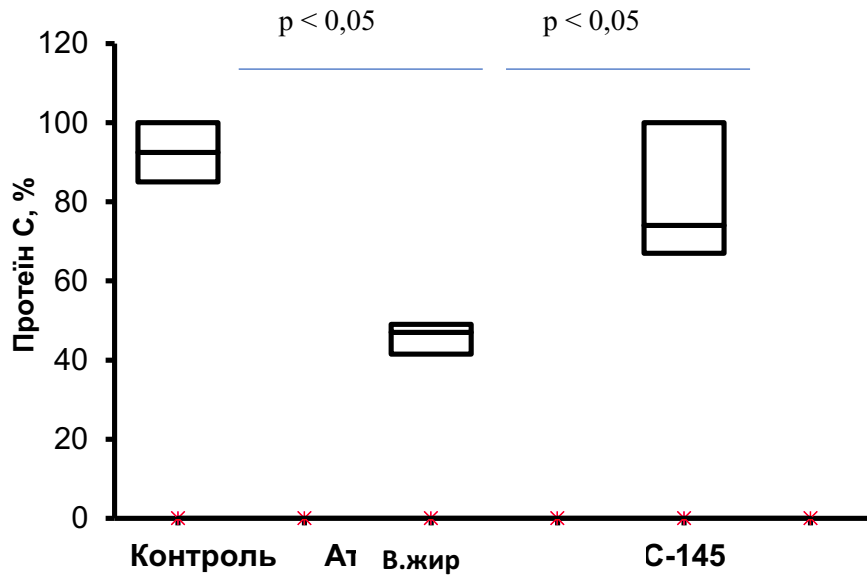


Рис. 7.12. Рівень протеїну С в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А) та за умов корекції препаратом С-145 (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний при $p < 0,05$.

Для підтвердження активації системи зсідання крові у щурів за умов високожирової дієти ми визначали вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) у плазмі крові [101]. РФМК – це олігомери фібрину desA з фібриногеном та фрагментами фібриногену-фібрину, які з’являються у кровотоці за умов внутрішньосудинної генерації невеликих концентрацій тромбіну, які не призводять до формування полімерного фібрину, однак відщеплюють від фібриногену фібринопептиди А, внаслідок чого фібрин формує олігомери, які вільно циркулюють у кровотоці.



Рис. 7.13. Вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А), та за умов корекції лікарською субстанцією С-145 (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний при $p < 0,05$.

Практично у всіх щурів дослідної групи було виявлено накопичення РФМК (Рис. 7.13.). Застосування С-145 дозволило уникнути цього ефекту, що яскраво свідчить про важливість антиполімеризаційної дії С-145 для зниження ризику внутрішньосудинного тромбоутворення.

Як і у випадку холестерольної дієти, дієта з високим вмістом вісцерального жиру викликала тенденцію до підвищення концентрації фібриногену в плазмі крові дослідних тварин. Споживання С-145 не запобігало цьому явищу, навпаки, концентрація фібриногену зростала (Рис. 7.14).

Оскільки таке зростання концентрації фібриногену не супроводжувалося зниженням вмісту протеїну С, можна стверджувати, що воно не пов'язане з розвитком запального процесу. Причину цього явища слід шукати у стимулюючій дії препарату на синтетичні процеси протеїнів у печінці. Це припущення частково підтверджується дією С-145 на проліферацію клітин у культурі ендотеліоцитів, однак потребує подальших ґрунтовних досліджень.

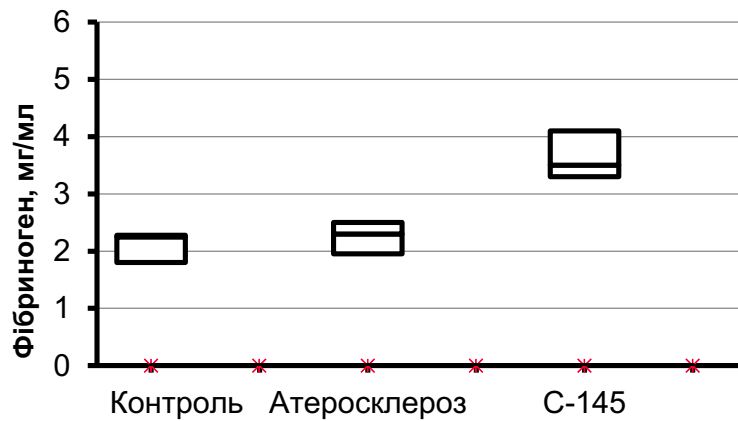


Рис 7.14. Концентрація фібриногену в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А) та за умов корекції лікарською субстанцією С-145 (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний при $p < 0,05$.

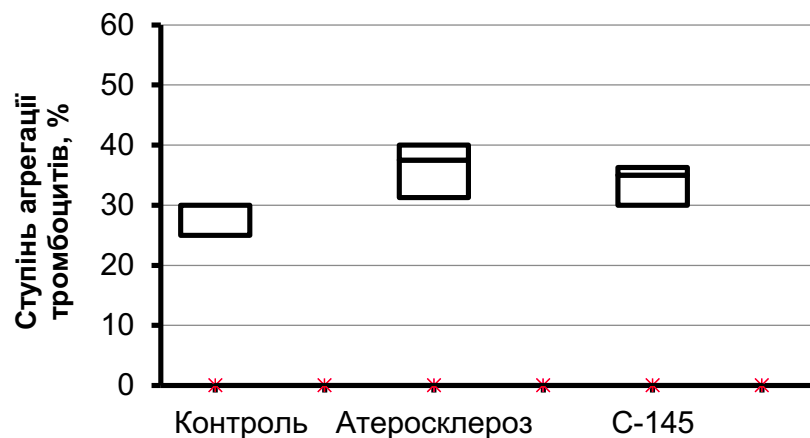


Рис. 7.15. Ступінь агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А) та за умов корекції лікарською субстанцією С-145 (С-145).

Ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів за умов високожирової дієти зростала, хоча і менш виражено, порівняно з холестерольною дієтою. Застосування С-145 дозволило нівелювати вплив дієти на активність тромбоцитів (Рис. 7.15, Рис. 7.16).

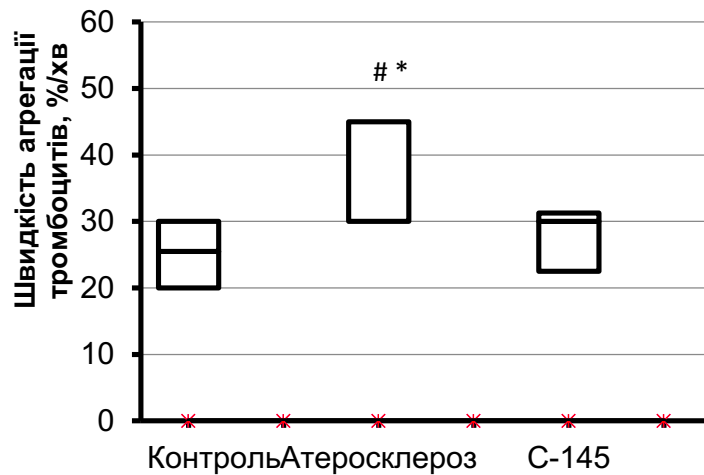


Рис. 7.16. Швидкість агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А) та за умов корекції лікарською субстанцією С-145 (С-145).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний при $p < 0,05$.

Відповідно до критерію Манна-Вітні результат достовірний при $p < 0,05$.

Таким чином, вигодовування спонтанно гіпертензивним щурам вісцерального жиру протягом 6 місяців призвело до розвитку у них передтромботичного стану. Аналогічно до експериментів у холестерольній моделі, застосування С-145 нівелювало ці патологічні зміни. Варто відзначити, що дієта з високим вмістом вісцерального жиру викликала більш різке зниження вмісту протеїну С, порівняно з холестерольною дієтою, що свідчить про більш інтенсивні запальні процеси за такої моделі. Важливо, що антиполімеризаційна дія С-145 справляє позитивний вплив на стан тромбоцитарної ланки гемостазу. У випадку холестерольної дієти нами було відзначено позитивну дію С-145 на архітектуру стінки судин. Тому було важливо визначити стан стінки аорти і за високожирової дієти.

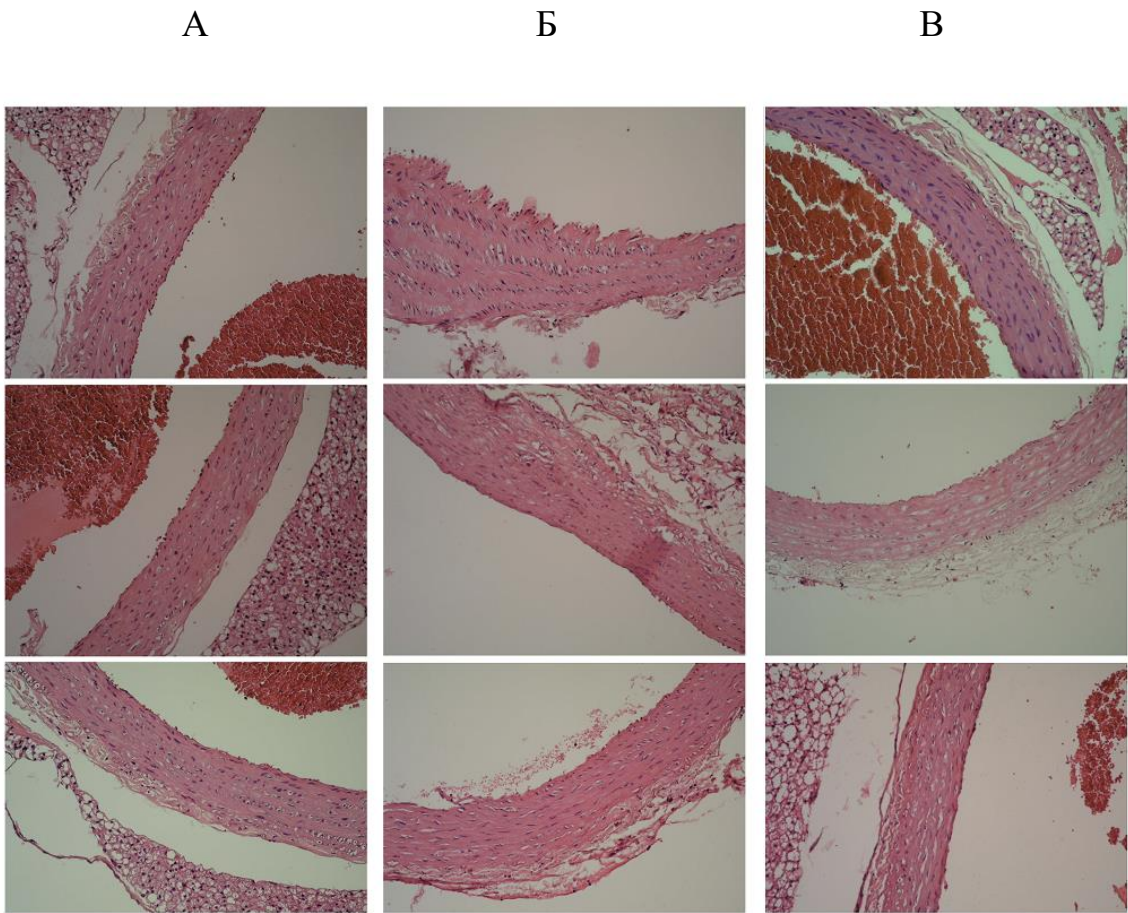


Рис. 7.17. Репрезентативні зрізи аорти спонтанно гіпертензивних щурів. А – зрізи аорти контрольного щура, Б – зрізи аорти щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру, В – зрізи аорти щурів за умов корекції лікарською субстанцією С-145.

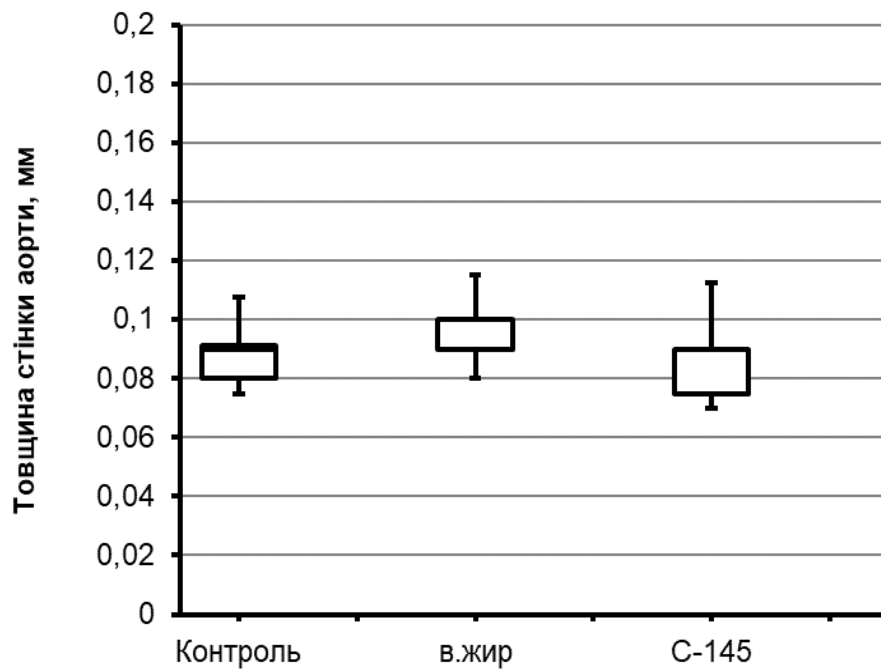


Рис. 7.18. Товщина стінки аорти спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (А) та за умов корекції лікарською субстанцією С-145.

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,00308$. Результат достовірний при $p < 0,05$.

Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0083$. Результат достовірний при $p < 0,05$.

@ Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0271$. Результат достовірний при $p < 0,05$ (порівняно з групою «А»).

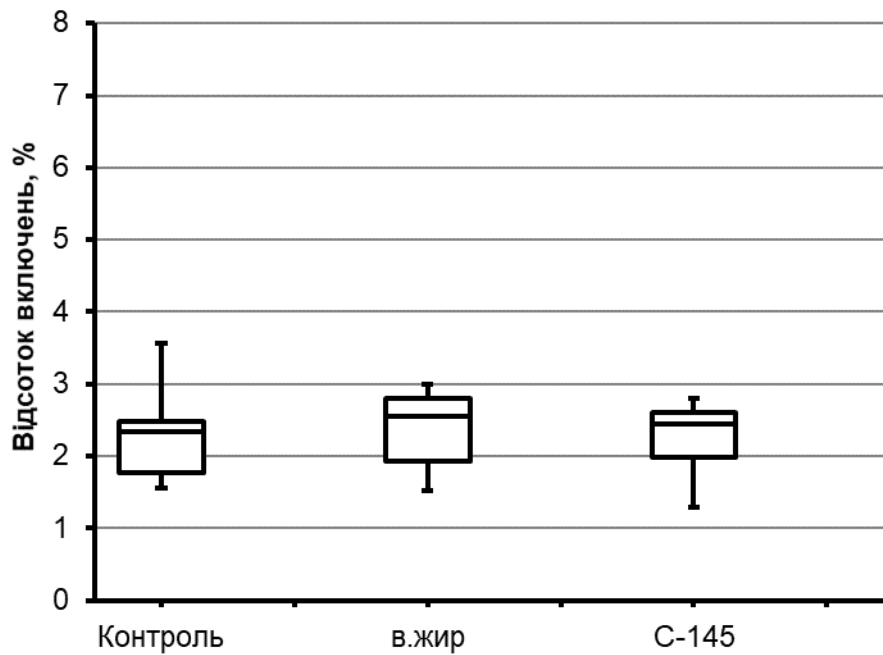


Рис. 7.19. Відсоток жирових і сполучнотканинних включень у стінці аорти спонтанно гіпертензивних щурів (1), які отримували корм з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) (2) та за умов корекції лікарською субстанцією С-145 (3).

* Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,11876$. Результат достовірний при $p < 0,5$.

@ Відповідно до критерію Манна-Вітні, $p = 0,0096$. Результат достовірний при $p < 0,05$ (порівняно з групою 2).

Було показано, що дія високожирової дієти була менш виражена, ніж дія дієти з високим вмістом холестеролу. Зокрема, спостерігали незначне потовщення стінки аорти щурів, які отримували корм з 30 % вісцерального жиру протягом 6 місяців. Застосування С-145 дозволило уникнути такого ефекту у дослідній групі тварин.

7.3. Дія С-145 на тканину серця спонтанно гіпертензивних щурів за умов високожирової дієти

Відомо, що дієта з високим вмістом вісцерального жиру негативно впливає на стан серцевого м'яза. Крім того, враховуючи виключне значення кровопостачання серця, будь-які порушення гемостазу є фактором ризику для функціонування цього життєво важливого органу.

Тому, нами було проведено гістологічне дослідження стану міокарду спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували високожирову дієту протягом 6 місяців. Порівнювали гістологічні зрізи міокарду, забарвлені за допомогою гематоксиліну та еозину, для щурів, які отримували високожирову дієту та щурів, яким протягом двох останніх місяців експерименту вполювали 12 мг/кг маси тіла С-145.

В міокарді за умов споживання високожирової дієти спостерігали зернисту дистрофію кардіоміоцитів. Ядра кардіоміоцитів гетерохромні, спостерігалися ділянки міокарду, які містили кардіоміоцити, що не мали ядер та містили гомогенізовану цитоплазму. Це можна вважати початковою стадією некрозу. В гомогенізованій цитоплазмі спостерігали накопичення дрібних крапель гіаліну (гіаліново-крапельна дистрофія). В ділянках з патологічно зміненими кардіоміоцитами порушувалася синцитіальна будова міокарду, розвивався набряк інтерстиції, відбувалася лімфоцитарна інфільтрація (Рис. 7.20 А).

У сполучному матриксі серцевого м'язу утворювалися також зони геморагій і плазматичного міокарду (Рис. 7.20 Б).

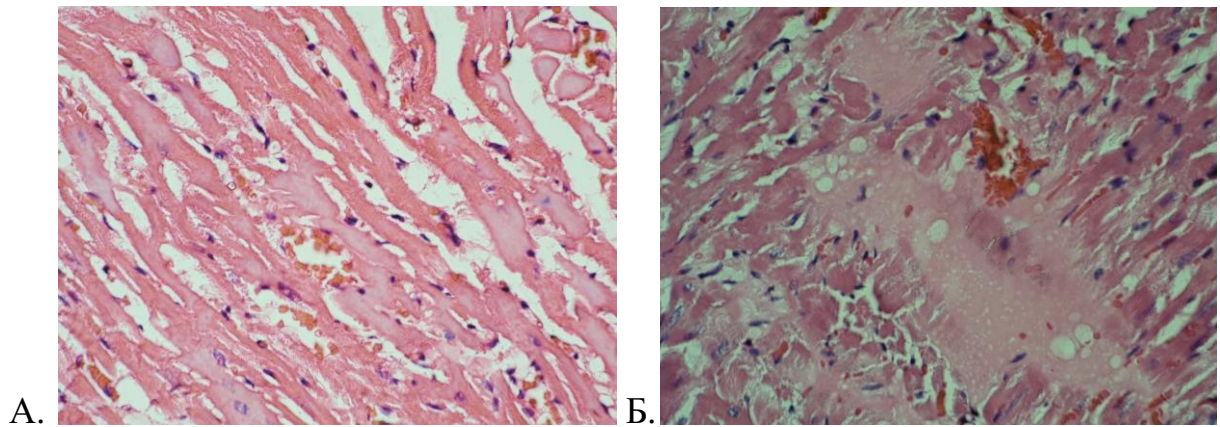


Рис. 7.20. Ділянка міокарду спонтанно гіпертензивного щура, який споживав вісцеральний жир. Збільшення x 400.

А. Зерниста дистрофія, гетерохроматизація ядер кардіоміоцитів, лімфоцитарна інфільтрація, загибель кардіоміоцитів.

Б. Плазмоеморагічне просочування міокарду.

У просвіті судин міокарду спостерігали скупчення еритроцитів та їхню адгезію до стінки судин. Медіа частини судин містила значно стоншені ділянки, крім того, у медіа спостерігали практично прозорі ділянки, утворені в результаті набряку та жирової інфільтрації сполучнотканинного матриксу. Спостерігали також периваскулярний набряк (Рис. 7.20 А). У інших випадках навпаки – потовщення та набряк стінок судин загрожували перекриттям просвіту (Рис. 7.20 Б).

В частині вен спостерігалися скупчення та стаз еритроцитів, а також пристіночне скупчення протеїнів плазми. Стінка таких вен витончена, іноді розшаровується. Капіляри містять одиничні еритроцити.

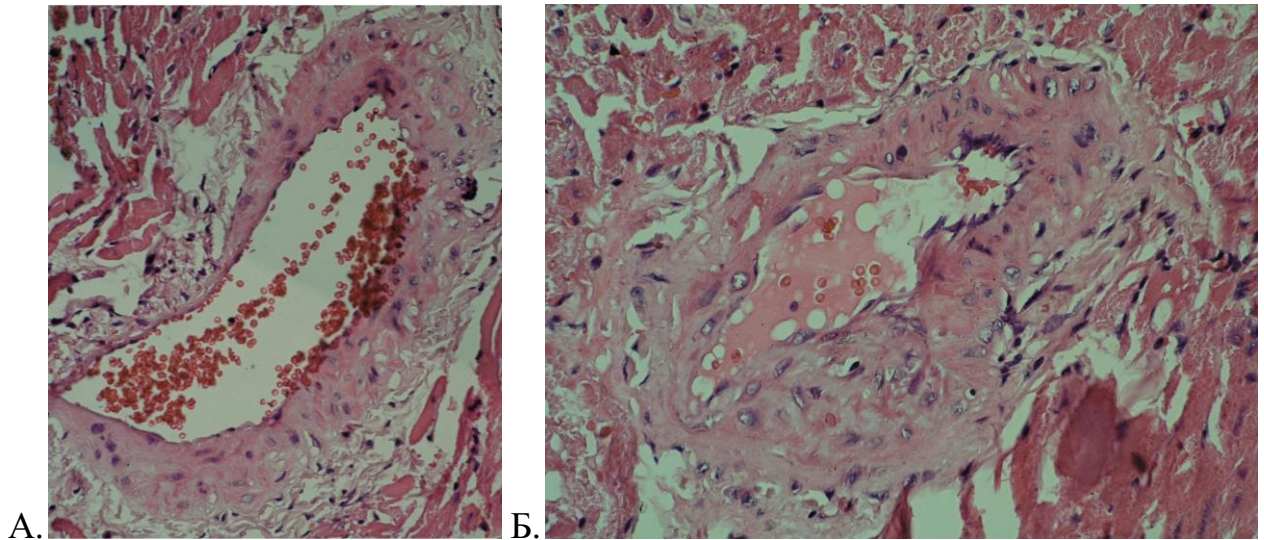


Рис. 7.21. Поперечний переріз судини міокарду спонтанно гіпертензивного щура, який споживав вісцеральний жир. Збільшення x400.

А. Помітна ділянка витонченої ділянки медіа судини. набряк медіа судини.

Б. Вакуолізація ядер клітин. Гіпертрофія судинної стінки. набряк медіа судини.

Дослідній групі щурів випоювали 12 мг/кг калікс[4]арену С-145 протягом останніх двох місяців перед виведенням з експерименту. Варто відзначити насамперед, що застосування С-145 помітно не елімінувало негативні ефекти високожирової дієти на серцевий м'яз щурів. Зокрема, ми відмічали зернисту дистрофію кардіоміоцитів, порушення цілісності стінки синцитію, набряк інтерстицію, характерну для серця під час високожирової дієти (Рис. 7.21).

Водночас, у міокарді дослідних щурів спостерігали ділянки зі значним кровонаповненням капілярів та розширенням їх просвіту (Рис. 7.21 Б). Крім того, у міокарді спостерігали гіперплазію кардіоміоцитів, що можна розглядати як компенсаторну захисну реакцію серцевого м'яза на ураження (Рис. 7.21).

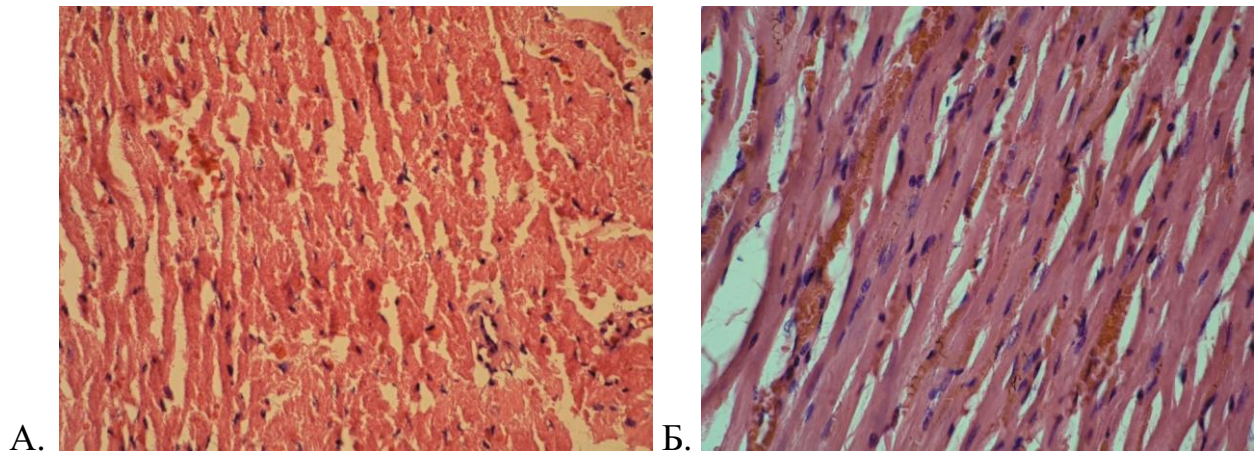


Рис. 7.22. Ділянка міокарду спонтанно гіпертензивного щура, який споживав вісцеральний жир та 12 мг/кг С-145 протягом 2 місяців перед виведенням з експерименту. Збільшення $\times 400$.

А. Помітні кардіоміоцити з ознаками гіаліново-крапельної дистрофії.

Б. Виразно помітні капіляри з активним кровонаповненням.

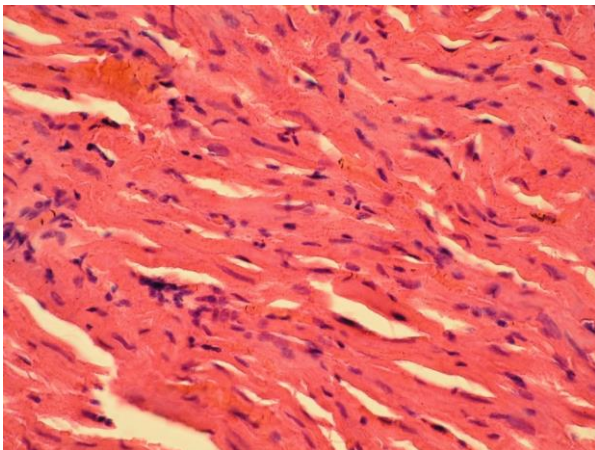


Рис. 7.23. Ділянка міокарду спонтанно гіпертензивного щура, який споживав вісцеральний жир та 12 мг/кг С-145 протягом 2 місяців перед виведенням з експерименту. Гіперплазія кардіоміоцитів. Збільшення $\times 400$.

Судини міокарду зберігали свою структуру. Відзначали незначне потовщення стінки судин, відсутність набряку медіа судин, відсутність потоншення, які були типовими для щурів з високожировою дієтою (Рис. 7.24).

В медіа артерій спостерігали одиничні двоядерні гладеньком'язові клітини (Рис. 7.24 А).

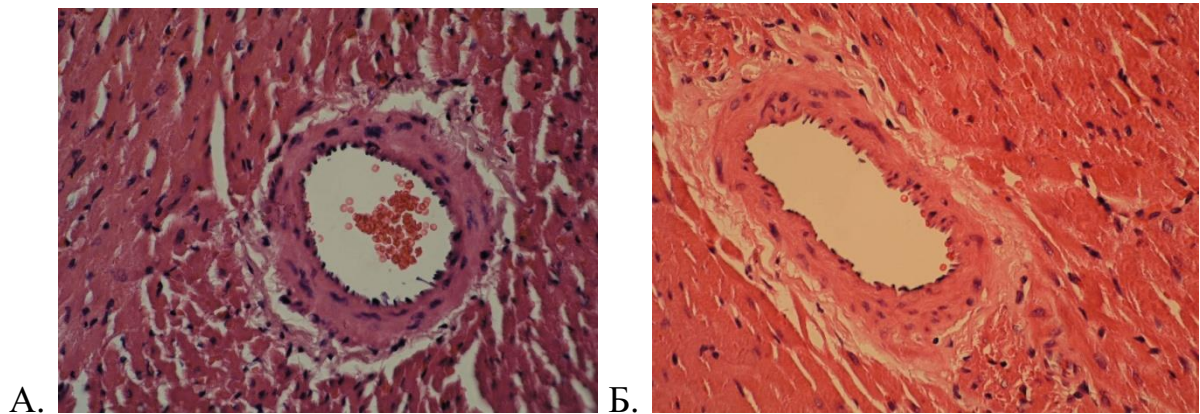


Рис. 7.24. Поперечний переріз судини міокарду спонтанно гіпертензивного щура, який споживав вісцеральний жир 12 мг/кг С-145 протягом 2 місяців перед виведенням з експерименту. Збільшення $\times 400$.

А. Одиничні двоядерні гладеньком'язові клітини в медіа судини.

Б. Відсутнє розшарування інтими судини. Відсутній набряк медіа судини.

Таким чином, введення у раціон щурів вісцерального жиру приводило до патологічних змін у кардіоміоцитах, що викликали гіалінову дистрофію та загибель кардіоміоцитів. Спостерігалось порушення структури міокарду, розвиток набряку, лімфоцитарної інфільтрації. З'являлися витончення чи навпаки – набряк медіа судин, які загрожували геморагіями або перекриттям просвіту судин.

На фоні введення С-145 спостерігали гіперплазію кардіоміоцитів. Водночас, не було виявлено гіалінової дистрофії, так само як і розшарування, витончення чи набряку інтими судин.

Отже, ми виявили позитивний вплив С-145 на судини серцевого м'яза. Така судиннопротекторна дія С-145 дозволила розглядати його як потенційний засіб, який сприятиме підтриманню або ж відновленню кровопостачання серця за умов порушення кровопостачання серцевого м'яза, зокрема за гострого інфаркту міокарда.

Позитивна дія на судини серця може бути додатковим ефектом антитромботичного засобу, який здійснюється завдяки антиполімеризаційній дії (запобігає тромбозу судин серця) або ж завдяки безпосередньому впливу на клітини судин.

Було вирішено підтвердити виявлений ефект на моделі гострого інфаркту міокарда. Для цього було використано відому модель ураження серцевого м'яза ізопротренолом.

РОЗДІЛ 8. АПРОБАЦІЯ ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ЗАСІБ КАЛІКС[4]АРЕН С-145» ЗА УМОВ ІЗОПРОТРЕНОЛОВОГО ІНФАРКТУ МІОКАРДУ

8.1 Вироблення моделі та електрокардіографічні дослідження

Для дослідження ефектів С-145 на тканини серцевого м'яза за умов ішемізації використали ізопротренольну модель, у якій інфаркт міокарду викликали одноразовою ін'єкцією ізопротренолу у дозі 100 мг/кг здоровим щурам, самцям лінії Вістар.

Ізопротренол відомий своєю здатністю індукувати множинні некротичні ушкодження у серцевому м'язі. Спостереження проводили протягом двох тижнів після вироблення моделі, дослідній групі щурів вводили перорально 12 мг/кг С-145 щоденно до виведення з експерименту.

Рентгенографічні дослідження виявили численні ураження тканин за дії ізопротренолу, проводили прижиттєву кардіографію та гістологічний аналіз тканин серця через два тижні після індукції ішемії.

Електрокардіографічні дослідження проводили у щурів до відтворення патології міокарду та під кінець досліду у контрольних, дослідних тварин, а також у інтактного щура, який отримувач досліджуваній препарат.

Ознаками розвитку інфаркту міокарда вважали збільшення зубця Т та зменшення кута відхилення комплексу QRS (Рис. 8.2). Зубець Т відображає реполяризацію шлуночків міокарду, його збільшення та розширення свідчить про ішемію, дилатацію правого чи лівого передшлунків і легенеvu гіпертензію. Комплекс QRS відображає синхронізацію депольризації лівого і правого шлуночків міокарду, тобто період відновлення.

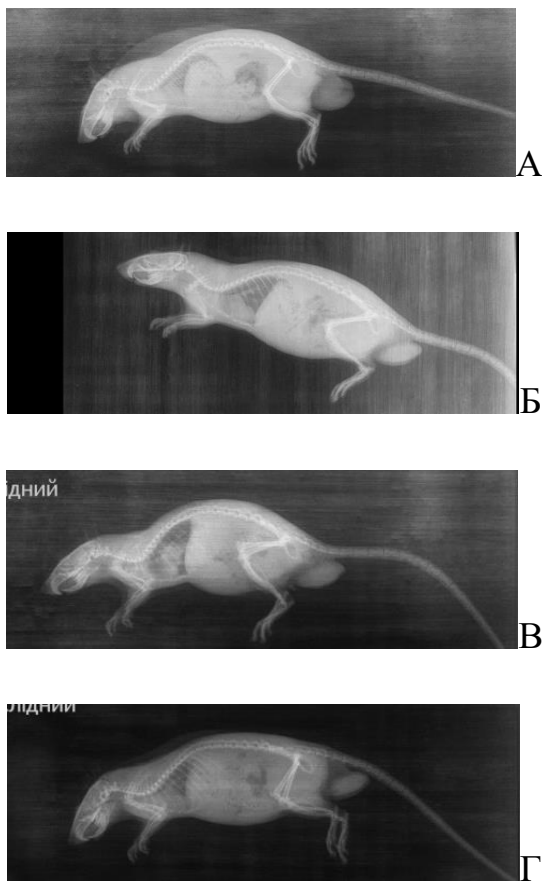


Рис. 8.1. Рентгенографічні дослідження щурів, взятих у експеримент. А – інтактна тварина; Б – тварина з ізопротренол-індукованою ішемізацією; В, Г – тварини з ізопротренол-індукованою ішемізацією на тлі застосування С-145.

Було показано, що застосування С-145 упродовж реабілітації тварин після експериментального інфаркту міокарда призводило до нормалізації цих параметрів (Рис. 8.3, Рис. 8.4).

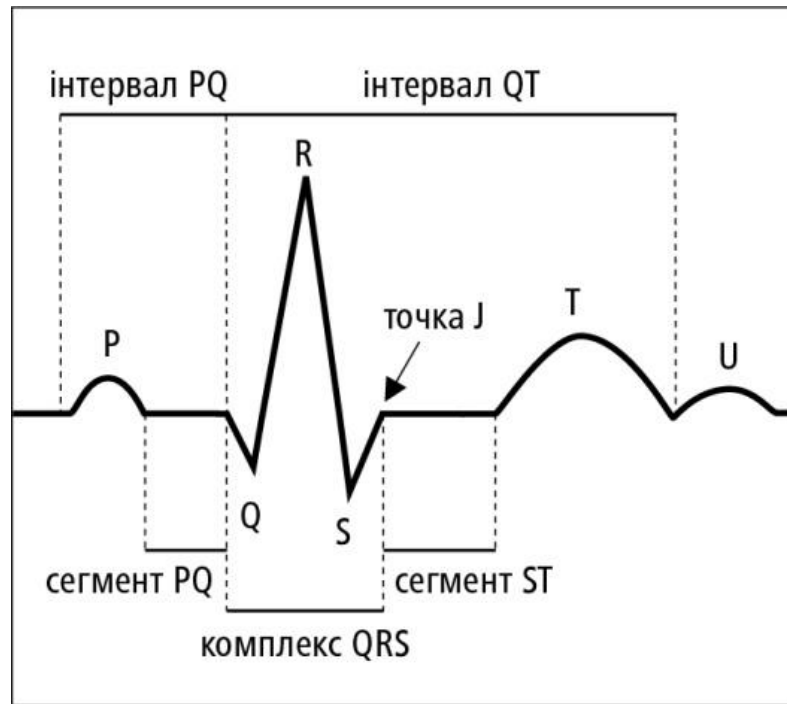


Рис. 8.2. Основні параметри кардіограми.

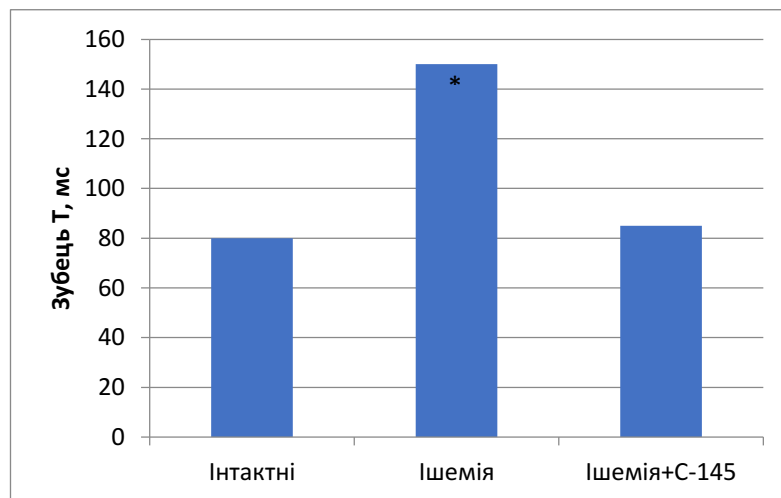


Рис. 8.3. Значення тривалості зубця Т у щурів до експериментальної ішемізації (Інтактні), на 14 добу після ішемії (Ішемія) та за умов введення С-145 при ішемії (Ішемія + С-145).

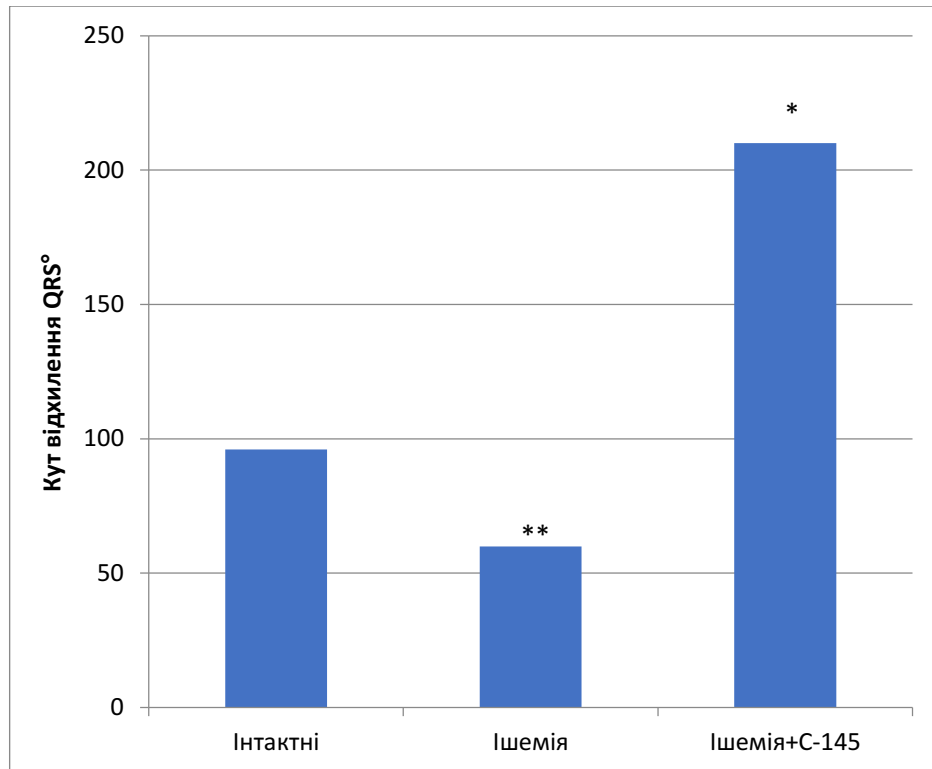


Рис.8.4. Значення кута відхилення QRS у щурів до експериментальної ішемізації (Інтактні), на 14 добу після ішемії (ішемія) та за умов введення С-145 при ішемії (Ішемія + С-145).

8.2 Гістологічні дослідження

Структуру серцевого м'язу через 14 діб після експериментальної ішемізації у щурів вивчали за допомогою забарвлення гістологічних зрізів гематоксиліном-еозином (Рис. 8.5). В міокарді інтактних тварин відмічалися кардіоміоцити звичайної будови без патологічних змін та еухроматинізації.

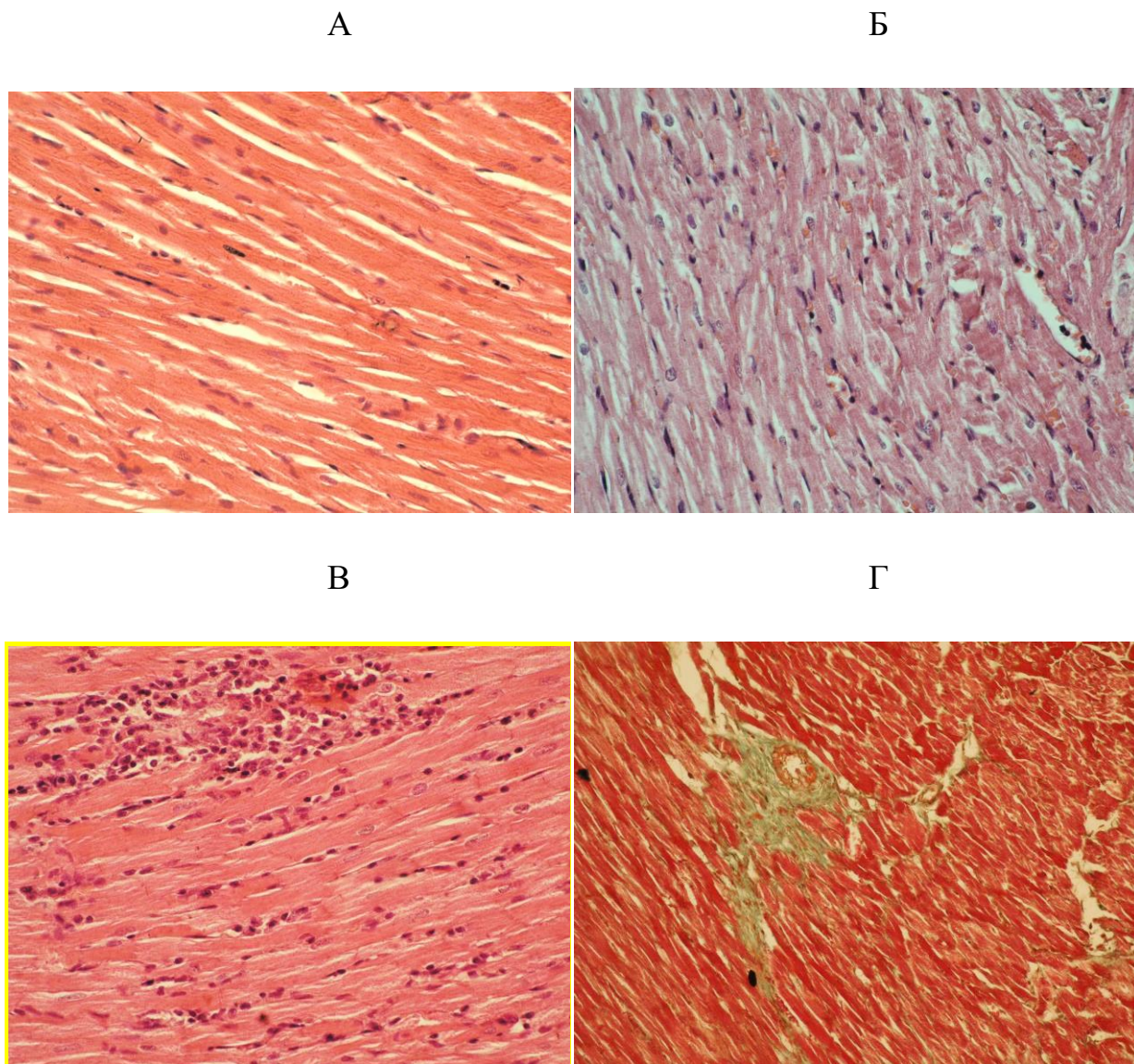


Рис. 8.5. Будова серцевого м'язу щурів. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Збільшення 1х400 (А, Б, В); забарвлення по Масону (Г).

А. Типова будова міокарду (кардіоміоцити) у щурів до експериментальної ішемізації (контроль).

Б. Типова будова міокарду (кардіоміоцити) у щурів на 14 добу після експериментальної ішемізації.

В. Типова будова міокарду (кардіоміоцити) у щурів на 14 добу після експериментальної ішемізації та щоденного вживання 12 мг/кг С-145.

Г. Сполучнотканинне переродження тканини серця за експериментальної ішемізації.

За експериментальної ішемізації спостерігали лімфоцитарну інфільтрацію і незначне збільшення кількості фібробластів (Рис. 8.5 Б). Наслідком розвитку всіх перерахованих патологічних змін був розвиток фіброзу інтерстиція (Рис.8.5 Г).

Основною відмінністю в тканині серця щурів, які отримували С-145 після ішемізації, була еухроматинізація та гіпертрофія ядер кардіоміоцитів (Рис. 8.5 В). Відмічено і ділянки з загиблими кардіоміоцитами, які містять скупчення лімфоцитів, однак сполучнотканинного переродження не спостерігали.

Забарвлення по Масону використовували для ідентифікації переродження тканини, розростання фібробластів та накопичення колагену. У тварин до проведення ін'єкції ізопротренолу ці процеси помірні та знаходяться у межах норми. Водночас, ін'єкція ізопротренолу та ішемізація тканини серця викликала підвищену еухроматизацію кардіоміоцитів (Рис. 8.4) та набряк інтерстицію судин серця (Рис. 8.5). Забарвлення по Масону дозволило виявити еластинові волокна у середній оболонці судини (Рис. 8.5 Г).

Отже, через 14 днів після експериментальної ізопротренол-індукованої ішемізації міокарду спостерігали підвищену еухроматинізацію ядер, збільшення накопичення колагенових волокон. Ознаками деструктивних змін були також набряк середньої оболонки артерій, лейкоцитарно-лімфоцитарна інфільтрація, розростання сполучної тканини – фіброз.

У групі тварин, що отримували С-145, також відмічено еухроматинізацію ядер, яка є компенсаторним механізмом реакції міокарду на ураження. Хоча С-145 не впливав на обсяг фібробластного переродження тканини серця, за його застосування не спостерігали набряку периваскулярного простору судин серця, функціональний стан стінок судин нормалізувався.

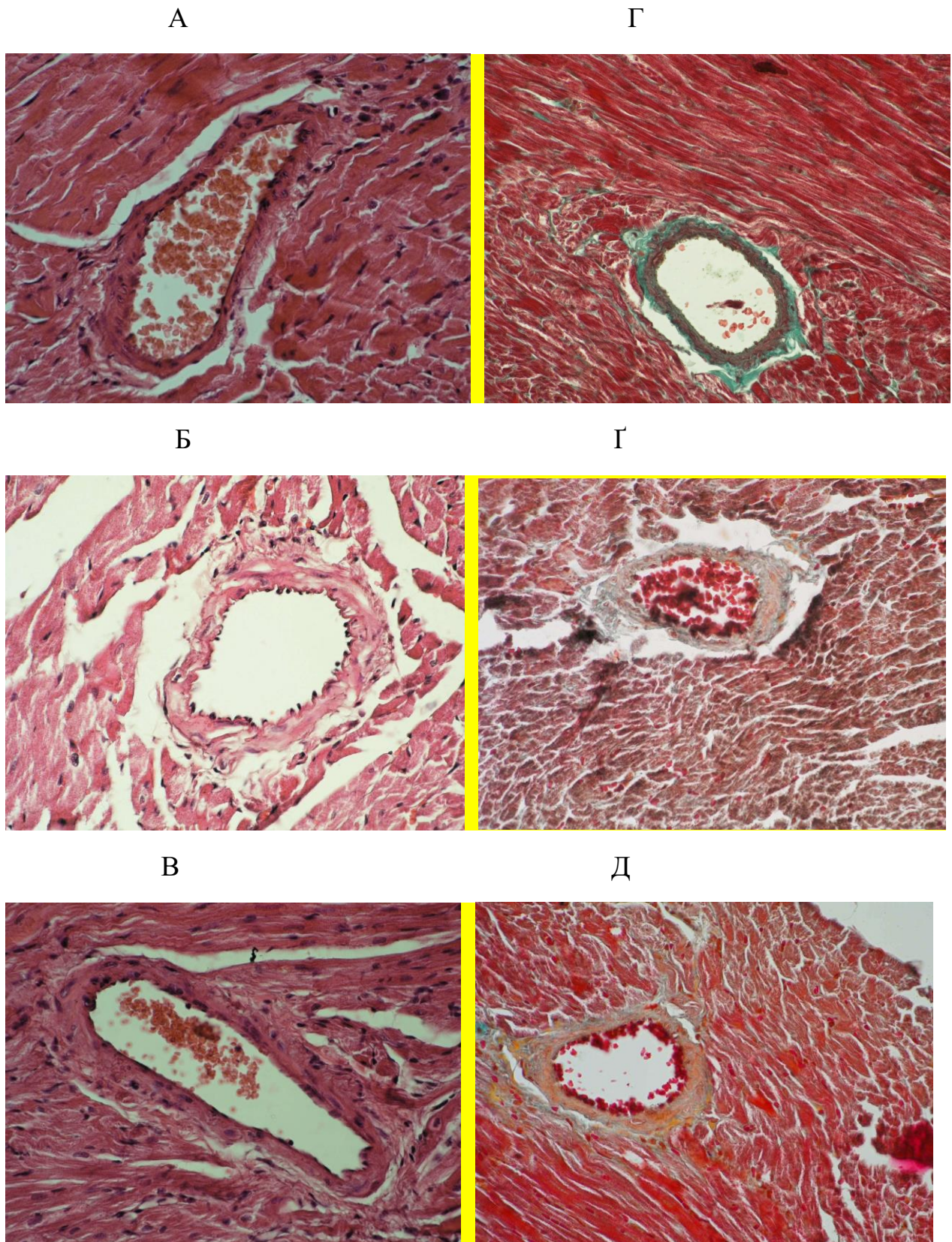


Рис. 8.6. Поперечний переріз судини серцевого м'язу щурів. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Збільшення x400. Забарвлення гематоксиліном-еозином (А, Б, В); забарвлення по Масону (Г, Е, Д).

А. Типова будова судини серця у щурів до експериментальної ішемізації (контроль). Стінка артерій без змін.

Б. Типова будова судини серця у щурів на 14 добу після експериментальної ішемізації. набряк інтерстицію судини.

В. Типова будова судини серця у щурів на 14 добу після експериментальної ішемізації та щоденного впоювання 12 мг/кг С-145. набряк інтерстицію судини відсутній.

Г. Типова будова судини серця у щурів до експериментальної ішемізації (контроль). Помірна кількість сполучної тканини в периваскулярному просторі та інтерстиції.

І. Типова будова судини серця у щурів на 14 добу після експериментальної ішемізації. Поява еластинових волокон у медіа судини.

Д. Типова будова судини серця у щурів на 14 добу після експериментальної ішемізації та щоденного впоювання 12 мг/кг С-145. Еластин у медіа та периваскулярному просторі.

8.3. Рівень розчинного фібрину як маркер активації системи зсідання крові

Розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК) складаються з олігомерів фібрину, фібриногену та їхніх фрагментів. Вони є ознакою генерації тромбіну в кровотоці й вказують на ступінь активації системи зсідання крові.

Для оцінки загального стану системи гемостазу ми визначали вміст РФМК у плазмі крові щурів з ізопротренол-індукованою ішемізацією на самореабілітації та за умов введення С-145 (Рис. 8.7).

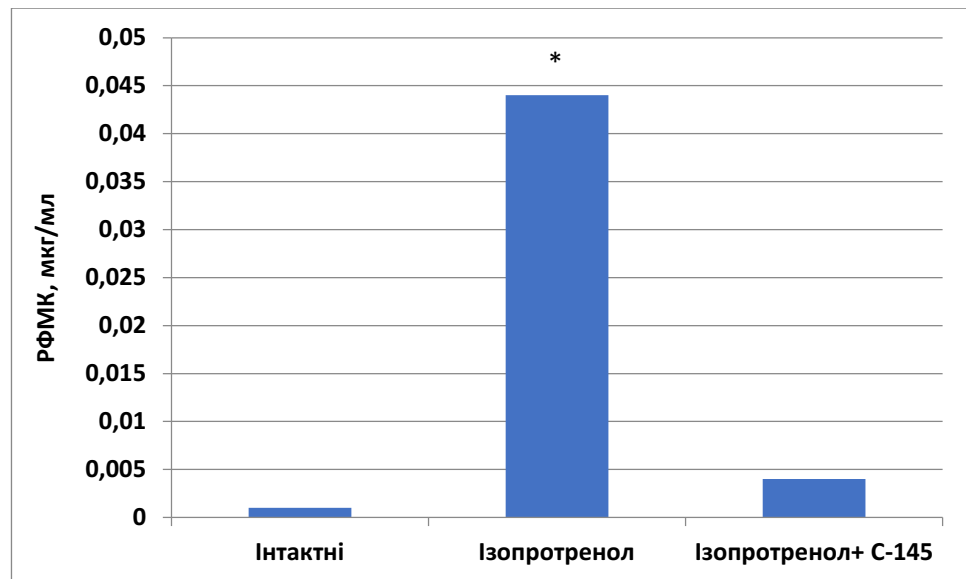


Рис. 8.7. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) у плазмі крові щурів через 14 днів після експериментальної ішемізації (Ізопротренол) та ішемізації на тлі щоденного вживання 12 мг/кг С-145 (Ізопротренол + С-145). Інтактні – щурі до введення ізопротренолу.

Проведені дослідження виявили значне накопичення РФМК у плазмі крові щурів на 14-ий день після ін'єкції ізопротренолу. Такого накопичення на тлі застосування С-145 виявлено не було. Це є ще одним підтвердженням превалюючого антитромботичного ефекту досліджуваного препарату, а також і вказує на менш виражені запальні процеси за умов його застосування.

РОЗДІЛ 9. ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ СУБСТАНЦІЇ «КАЛІКС[4]АРЕН С-145»

9.1. Тест на сенсibiliзацію шкіри

Сенсibiliзаційну дію лікарської субстанції «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» вивчали на мурчаках за методом Клігмана-Магнусона - OECD Test Guideline No. 406 (OECD Guideline for Testing of Chemicals «Skin Sensitisation»). Дослідження проводили за затвердженим стандартом для доклінічних досліджень.

Дослідження провели на 23 мурчаках, самцях і самицях, білої масті. Як позитивний контроль використано дані лабораторного контролю з класичним алергеном – динітро-хлорбензолом (ДНХБ).

У попередньому досліді визначали індукуючу і тестовану концентрацію С-145. Трьом мурчакам щоденно (протягом 5 днів) наносили на шкіру розчин С-145 у вигляді 33 %, 25 % і 12,5 % водного розчину. Було визначено концентрації для проведення основного дослідження: 33 % водний розчин.

В основному досліді для індукції організму на спині тварин (10 піддослідних і 10 контрольних) на вистрижених ділянках шкіри з обох боків від хребетного стовпа робили три парні ін'єкції (по 0,05 мл кожна):

I - ад'ювант Фрейнда, розведений в дистильованій воді у рівних об'ємах 1:1 (піддослідним і контрольним тваринам);

II – Калікс[4]арен С-145 у вигляді 33 % водного розчину для піддослідних тварин і дистильована вода для контрольних.

III – піддослідним тваринам 66 % водний розчин С-145 з 50 % ад'ювантом Фрейнда (1:1); контрольним тваринам – розчинник (дистильована вода) з водного розчину з 50 % водним розчином ад'юванта Фрейнда (1:1); контрольним тваринам – розчинник (дистильована вода) з водним розчином ад'юванта Фрейнда (1:1).

На 7 добу досліду піддослідним тваринам на вистрижені ділянки шкіри спини наносили С-145 по 0,2 мл у вигляді 33 % розчину, контрольним мурчакам – еквівалентний об'єм дистильованої води під оклюзивну пов'язку на 48 годин. Оскільки С-145 не був подразнювачем шкіри, то за 24 години до індукуючої аплікації тестовану ділянку тіла додатково обробляли 0,5 мл 10 % розчину лаурилсульфату натрію у вазеліні для створення місцевого подразнення.

На 21 добу для виявлення сенсibiliзуючого ефекту С-145 проводили тестування контрольних і піддослідних тварин шляхом нанесення на шкіру правої бокової поверхні тіла по 0,2 мл С-145 в тестованій концентрації під оклюзивну пов'язку. На ліву бокову поверхню тіла наносили рівний об'єм дистильованої води. Експозиція – 24 години.

Оцінку реакції шкіри проводили візуально за чотирибальною шкалою Магнусона-Клігмана через 48 та 72 години. В індукційній фазі після ін'єкцій та аплікації на шкіру індукуючої концентрації С-145 у контрольних тварин ознак подразнення шкіри не було виявлено. Симптомів інтоксикації чи загибелі тварин також не спостерігали.

Через 48 і 72 години після нанесення С-145 алергічні реакції шкіри так само біли відсутні. В групі тварин з ДНХБ позитивна реакція шкіри визначалася у 100 % тварин.

Таким чином, на стандартизованій моделі продемонстровано, що С-145 не виявляє сенсibiliзаційної дії на організм мурчаків.

9.2. Тест на мутагенність

З метою дослідження потенційної мутагенної активності лікарської субстанції «Антитромботичний засіб Калікс[4]арен С-145» було проведено тест Еймса відповідно до флюктуаційного методу з преінкубацією в суспензії. Мутагенну активність досліджували згідно рекомендацій OECD 471 (OECD

Guideline for the testing of chemicals Bacterial Reverse Mutation Test) на двох штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 і TA100 з метаболічною активацією та без метаболічної активації в двох повторах і шести концентраціях.

На першому етапі досліджень було необхідно встановити бактеріотоксичність субстанції. Для цього було обрано штам *Salmonella typhimurium* TA98. Бактерії вирощували за присутності С-145 у концентраціях від 0,16 до 10 мг/мл. Максимальною небактеріотоксичною концентрацією С-145 було визначено 5 мг/мл.

Для метаболічної активації мутагенної активності застосовували фракцію S-9. Цю фракцію отримують з гомогенату печінки щурів, яким попередньо вводять Aroclor 1254, і застосовують у тесті Еймса на бактеріях, щоб імітувати метаболізм досліджуваної речовини, який відбувався б у ссавців.

Для проведення досліджень, в якості тест-системи, використано бактерії. В даному методі використовують штами бактерій, в гістидиновий (*Salmonella typhimurium*) оперон яких внесені точкові мутації, що ведуть до порушення синтезу цих амінокислот і нездатності бактерій до зростання на середовищі, що не містить зазначені амінокислоти. Індукція в результаті мутагенного впливу зворотних мутацій за типом заміни пар основ або зсуву рамки зчитування, відповідно, в генах His цих тестерних штамів призводить до реверсії прототрофності бактерій за цими амінокислотами і здатності до зростання на безгістидиновому середовищі.

Тестові штами піддавали дії різних концентрацій досліджуваного зразка С-145 і вирощували на середовищі, що не містить гістидин. Мутагенний потенціал оцінювали по індукції ревертантів від ауксотрофності по гістидину або триптофану до прототрофності, здатності до виживання і зростання на безгістидиновому середовищі.

Дослідження проводили на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 та TA100 за присутності 0,0016, 0,008, 0,004, 0,2, 1,0 та 5 мг/мл С-145. Дані штами є найбільш збалансованими за наявністю дефекту ліпополісахаридного шару,

присутності делеції в генах, які відповідальні за ексцизійну репарацію, наявності плазміди антибіотикочутливості. Штам *Salmonella* TA100 дозволяє реєструвати індукцію мутацій за типом заміни пар основ, штамми *Salmonella* TA98 - мутацій за типом зсуву рамки зчитування. Індукція зворотних мутацій за типом заміни основ на штаммах *Salmonella typhimurium* відбувається по парі GC, що дозволяє детектувати мутагени, що реалізують свій ефект шляхом окислювальної модифікації або за рахунок утворення зшивок, а також мутагени гідразинового ряду.

Експеримент проводили в чистому бар'єрному боксовому приміщенні, яке було забезпечено примусовою вентиляцією, із застосуванням ламінарної шафи абактеріального повітряного середовища. Коливання температури від 19 до 25 °C, вологості - від 30 до 60 %. Стерильність забезпечували бактерицидні лампи, щоденні і генеральні прибирання та дотримання правил роботи в боксовому приміщенні.

Дослідження мутагенної активності було проведено в основному тесті на індукцію генних мутацій у *Salmonella typhimurium* на двох штаммах TA98 і TA100 з і без метаболічної активації в двох повторах.

Було показано, що С-145 в концентраціях від 0,0016 мг/мл до 5 мг/мл у тесті Еймса мутагенну активність не проявляє.

РОЗДІЛ 10. СТВОРЕННЯ ПРОТОТИПУ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ

В результаті проведених досліджень було доведено ефективність антитромботичної дії С-145 за умов перорального введення *in vivo* лабораторним тваринам кількох видів. У всіх дослідах спостерігали настання антиполімеризаційного ефекту та його зникнення через 24 години після введення. Отже, ми вирішили, що створюваний нами препарат буде рекомендовано приймати один раз на добу.

Отримані результати також дозволяють визначити як пріоритетний пероральний спосіб введення. Відтак було вирішено створити прототип у вигляді капсул.

Інше важливе спостереження, що за дозування 12 мг/кг ми спостерігали подовження часу зсідання плазми крові тварин в тесті АЧТЧ, яке можна назвати надмірним. За умов застосування варфарину, який також знижує прокоагулянтний потенціал плазми крові, нормальним вважається пригнічення коагуляції в 1,5 рази. Тому для створення прототипу лікарського препарату ми обрали дозу в 10 разів меншу, а саме 1,2 мг/кг для людини з масою 75 кг.

У Таблиці 10.1 наведено склад капсул, який ми пропонуємо для ефективного застосування майбутнього лікарського препарату. Можливе також виробництво капсул з меншим дозуванням за умов збереження пропорції складників.

Таблиця 10.1.

Підготовка сировини та матеріалів для виготовлення прототипу лікарського препарату «Калікс[4]арен С-145»

№	Найменування компонентів	Склад на 1 капсулу		Кількість на серію, г
		%	мг	Теор.
1	2	3	4	5
<i>Сировина, що не потребує перерахунку</i>				
1	С 145	33,33	100,00	4,00
2	МКЦ 102	33,33	100,00	4,00
3	Крохмаль кукурудзяний	28,33	85,00	3,40
4	Натрію крохмальгліколят	3,33	10,00	0,40
5	Тальк	1,67	5,00	0,20
Всього:		100	300	12,00
6	Капсули желатин, №0, (білий/біла)	н/п	н/п	38 шт.

За допомогою напівавтоматичної капсулювальної машини отримано 38 капсул, які було поміщено у блістер (рис10.1).

Отримання капсульованої форми прототипу лікарського препарату «Калікс[4]арен С-145» дозволило провести дослідження з його розчинності в середовищі 0,1 N HCl.

Показано, що сполука належить до дуже добре розчинних, понад 90 % препарату, доставленого у капсулі, розчиняється за 15 хв (Таблиця 10.2). Профіль розчинення представлено на рис. 10.3.



Рис. 10.1. Зовнішній вигляд капсул прототипу лікарського препарату «Калікс[4]арен С-145».

Таблиця. 10.2.

Профіль розчинення зразку капсул, що містять С-145 (100 мг), с.011221, в середовищі розчинення 0,1 N HCl

Точка відбору	t, хв	X, % Зразок 1	X, % Зразок 2	X, % Зразок 3	X, % Зразок 4	X, % Зразок 5	X, % Зразок 6	Середнє	RSD, %
	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	10	75,7	74,4	84,7	65,8	88,4	67,9	76,1	11,7
2	15	94,5	98,4	96,7	101,3	101,0	100,2	98,7	2,7
3	20	93,9	97,9	96,2	100,8	100,5	99,6	98,7	2,7
4	30	94,9	95,7	98,5	99,5	98,4	93,4	96,7	2,5
5	45	94,4	95,1	98,0	98,9	97,8	92,9	96,2	2,5

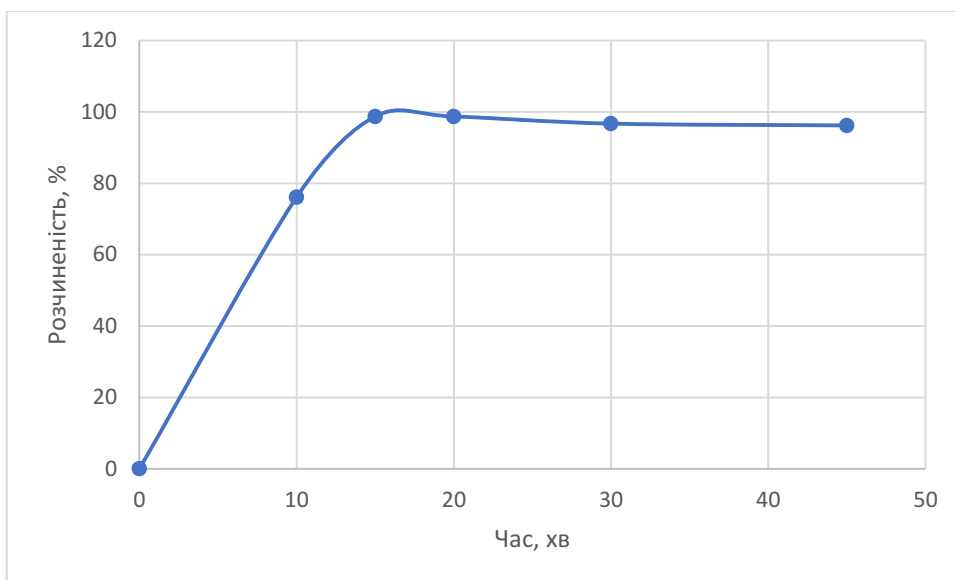


Рис. 10.2. Профіль розчинення капсульованої форми прототипу лікарського препарату «Калікс[4]арен С-145 в середовищі 0,1 N HCl.

Таким чином, нами було створено прототип антитромботичного лікарського засобу «Калікс[4]арен С-145» та показано високу ефективність його розчинності.

РОЗДІЛ 11. ЗАКЛЮЧЕННЯ

Представлена робота є комплексним дослідженням, спрямованим на випробування нової лікарської субстанції з антитромботичною дією – калікс[4]арену С-145. Починаючись вибором цільової молекули, аналізом її властивостей *in vitro*, вона завершується апробацією *in vivo*, випробуваннями за передтромботичного стану та доклінічними дослідженнями. Таким чином, біохімічний аналіз перспективної терапевтичної сполуки має біотехнологічне значення, адже дозволяє створити прототип лікарського препарату.

Натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145) виявилася ефективним інгібітором полімеризації фібрину, що дозволило розглядати її як потенційний антитромботичний засіб нового типу [102]. На сьогодні у світі не існує антитромботичних засобів з таким механізмом дії, що робить запропоновану розробку унікальною. Щодо її комерціалізації Інститутом біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України підписано договір з однією з провідних фармацевтичних компаній України.

Проведений скринінг антиполімеризаційної активності дозволив обрати калікс[4]арен С-145 з-поміж інших схожих за структурою сполук. Перевірка його функціональної активності у модельних системах дозволила відсіяти аналогічні сполуки, які мали більшу кількість потенційних побічних ефектів [103]. Випробування на лабораторних тваринах дали змогу обрати ефективну терапевтичну дозу для зниження здатності крові до коагуляції, яку надалі було застосовано у кількох експериментальних моделях [104, 105].

Виявлено ефективне зниження прокоагулянтного потенціалу плазми крові у моделях передтромботичного стану та протекторну дію калікс[4]арену С-145 на стінки аорти та судини серця [106]. Останній ефект сприяв покращенню стану тварин за експериментального інфаркту міокарду.

Доклінічні дослідження, виконані за стандартами GLP відповідно до протоколів OECD, засвідчили низьку токсичність, відсутність мутагенного та подразнюючого ефектів калікс[4]арену С-145 (Рис. 10.1).

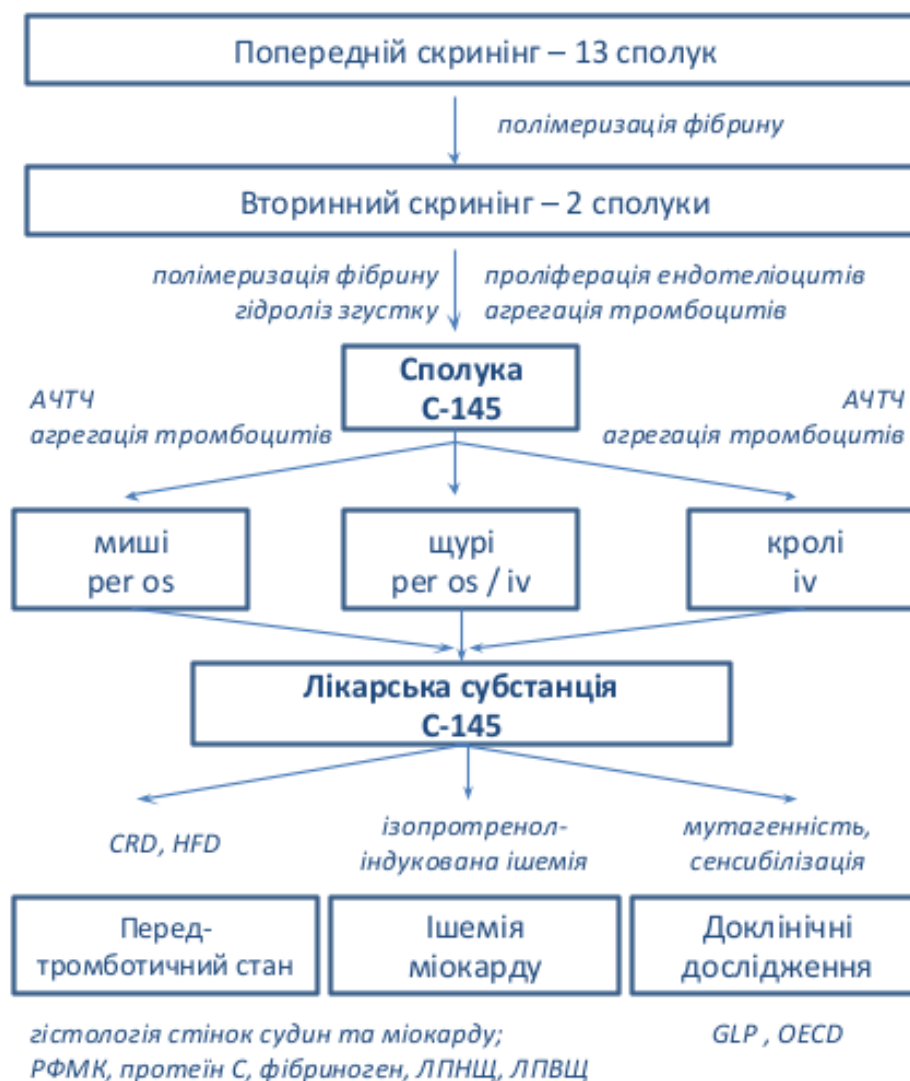


Рис. 10.1. Узагальнена схема проведеного дослідження прототипу нового антитромботичного засобу. С-145 - Натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти; АЧТЧ – активований частковий тромбoplastиновий час; per os – пероральне введення; iv – внутрішньовенне введення; CRD – дієта, багата на холестерол (3 %), у спонтанно гіпертензивних щурів; HFD – дієта, багата на вісцеральний жир (30 %), у спонтанно гіпертензивних щурів; GLP – належна лабораторна практика; OECD – стандарти Організації економічного співробітництва та розвитку; РФМК – розчинні фібрин-мономерні комплекси; ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності; ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності.

Сукупність усіх виявлених ефектів досліджуваної молекули забезпечує прикладний потенціал запропонованої роботи. Калікс[4]арен С-145 має шанс стати першим антитромботичним засобом, який за механізмом дії буде унікальним, за ефективністю не поступатиметься засобам попередніх поколінь, а також володітиме судинопротекторною дією на додачу до антитромботичної.

Фізіологічні ефекти молекули калікс[4]арену С-145, показані за умов введення лабораторним тваринам, тим більш важливі, що вони вочевидь пов'язані з єдиним значним і доведеним механізмом дії – інгібуванням полімеризації фібрину. Якщо запалення (детектоване за зміною рівню протеїну С) та порушення судинної стінки (виявлене гістологічно) за патологічних умов можна знизити, запобігаючи лише внутрішньосудинному формуванню полімерного фібрину, то ми можемо говорити про виключне значення системи гемостазу та полімеризації фібрину в фізіології та патофізіології кровообігу.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі представлено дослідження потенційної антитромботичної субстанції (калікс[4]арен С-145), яке охоплює вибір сполуки *in vitro*, її тестування у модельних системах, адаптацію до використання *in vivo*, тестування на моделях передтромботичного стану та доклінічні дослідження відповідно до стандартів GLP.

1. Проведено скринінг низки водорозчинних калікс[4]аренів і визначено калікс[4]арен С-145 та його сульфур-модифіковану форму С-145S як найбільш ефективні інгібітори полімеризації фібрину *in vitro*.
2. Вперше показано, що, на відміну від калікс[4]арену С-145, сульфур-модифікована форма С-145S ефективно інгібує гідроліз фібринового згустку та стимулює проліферацію ендотеліоцитів у культурі. Тому саме калікс[4]арен С-145 було обрано як прототип антитромботичного препарату.
3. Визначено напівлетальну дозу калікс[4]арену С-145 ($LD_{50} = 1420$ мг/кг) і показано, що він є низькотоксичною сполукою, придатною для застосування *in vivo*.
4. Визначено, що максимальна антитромботична дія калікс[4]арену С-145 спостерігається на 4-6 годину після внутрішньовенного або перорального введення лабораторним тваринам у дозі 12 мг/кг маси тіла та зникає через 24 години.
5. Доведено, що калікс[4]арен С-145 ефективно інгібує процес полімеризації фібрину в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували дієту з високим вмістом холестеролу (3 %) або вісцерального жиру (30 %), і тим самим надає антитромботичний ефект.
6. Вперше виявлено протекторну дію калікс[4]арену С-145 на стінку аорти та на серцевий м'яз в умовах експериментального інфаркту міокарда.
7. Показано відсутність сенсibiliзаційної дії та мутагенного ефекту калікс[4]арену С-145.
8. Створено прототип антитромботичного засобу на основі калікс[4]арену С-145.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Smith, S. A., Travers, R. J., Morrissey, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015; 50(4): 326-36. DOI: 10.3109/10409238.2015.1050550
2. Winter W. E., Greene D. N., Beal S. G., Isom J. A., Manning H., Wilkerson G., Harris N. Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. *Adv Clin Chem.* 2020; 94: 31-84. DOI: 10.1016/bs.acc.2019.07.008
3. Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. Современные представления о системе гемостаза. Киев: Наукова Думка, 2005. – 254 с.
4. King M. W. Hemostasis: Biochemistry of Blood Coagulation: 2014. С. 3-8.
5. Göbel K., Eichler S., Wiendl H., Chavakis T., Kleinschnitz C., Meuth S. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders - A Systematic Review. *Front Immunol.* 2018 Jul 26; 9: 1731. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01731
6. Atsumi T., Amengual O., Koike T. Antiphospholipid Syndrome: Pathogenesis. In: *Systemic Lupus Erythematosus.* Academic Press; 2011: 945-965. DOI: 10.1016/B978-0-12-374994-9.10050-6
7. Carlsen E., Stinessen M., Prydz H. Differential effect of alpha-interferon and gamma-interferon on thromboplastin response in monocytes and endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1987 Nov; 70(2): 471-8.
8. Smith S., Travers R., Morrissey J. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015; 50(4):326-36. DOI: 10.3109/10409238.2015.1050550
9. Cugno M., Tedeschi A. Coagulation Factor Autoantibodies. In: Shoenfeld Y., Meroni P. L., Gershwin M. E., editors. *Autoantibodies.* 3th ed. San Diego: Elsevier; 2014. p. 499-509. DOI:10.1016/B978-0-444-56378-1.00059-9

10. Xiong W., Zhao Y., Xiong Y., Xu M., Pudasaini B., Du H., Guo X. Coagulation factor IV is an indicator of symptomatic pulmonary embolism in patients with primary lung cancer. *Clin Respir J.* 2020; 14(2):124-131. DOI: 10.1111/crj.13109.

11. Martin K., Ma A., Key N. Molecular Basis of Hemostatic and Thrombotic Diseases. In: Coleman W. B., Gregory J. T., editors. *Molecular Pathology.* Academic Press; 2018: 277-297. DOI:10.1016/B978-0-12-802761-5.00015-8

12. Weiss H, Elkmann W. Blood functions. Section 6. Stopping bleeding and blood coagulation. In: Schmidt R, Teus G, editors. *Human Physiology.* M.: Mir; 1996; 2: 431-439.

13. Zeerleder S. Factor VII-Activating Protease: Hemostatic Protein or Immune Regulator? *Semin Thromb Hemost.* 2018 Mar; 44(2):151-158. DOI: 10.1055/s-0037-1607431

14. Макацарія А, Бреннер Б, Біцадзе В, Акіньшина С. Системний венозний та артеріальний тромбоемболізм в акушерсько-гінекологічній практиці. Москва: МІА; 2016. 995с.

15. Stavrou E, Schmaier A. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* 2010 Mar; 125(3) :210-5. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.11.028

16. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2016 May; 26(4):297-303. DOI: 10.1016/j.tcm.2015.12.001

17. Franchini M, Lippi G, Favaloro E. Acquired inhibitors of coagulation factors: part II. *Semin Thromb Hemost.* 2012 Jul;38(5):447-53. DOI: 10.1055/s-0032-1305779

18. Lenting P, Christophe O, Denis C. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood.* 2015 Mar 26; 125(13):2019-28. DOI: 10.1182/blood-2014-06-528406

19. Collins P, Budde U, Rand J, Federici A, Kessler C. Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome. *Haemophilia*. 2008; 14 Suppl. 3:49-55. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01745.x

20. Lakka Klement G, Sha E, Varon D. The Role of Platelets in Angiogenesis. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. Academic Press; 2013: 487-502. DOI: 10.1016/B978-0-12-387837-3.00024-9

21. Michel F, Silvestre J, Waeckel L, Corda S, Verbeuren T, Vilaine J, et al. Thromboxane A2 prostaglandin H2 receptor activation mediates angiotensin II-induced postischemic neovascularization. *Arterioscler Thromb. Vasc Biol*. 2006; 26(3):488-93. DOI: 10.1161/01.ATV.0000201969.93348.74

22. Кузник БИ. Система гемостаза. Физиология человека. Покровский ВМ, Коротько ГФ, редактор. М.: Медицина. 2000; 1: 313-25.

23. Kattula S, Byrnes J, Wolberg A. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37(3): e13-e21. DOI: 10.1161/ATVВАНА.117.308564

24. Litvinov R, Gorkun O, Galanakis D, Yakovlev S, Medved L, Shuman H, Weisel J. Polymerization of fibrin: direct observation and quantification of individual B:b knob-hole interactions. *Blood*. 2007; 109(1): 130-8. DOI: 10.1182/blood-2006-07-033910

25. Uchiba M, Okajima K. Fibrinopeptide A (FPA), fibrinopeptide B (FPB) and fibrinopeptide Bbeta(15-42) (FPBbeta15-42)]. *Nihon Rinsho*. 2004;62 Suppl 12:615-7.

26. Зубаиров М.Д. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: ФОН; 2000. 367 с.

27. Vilar R, Fish RJ, Casini A, Neerman-Arbez M. Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica*. 2020 Jan 31; 105(2):284-296. DOI: 10.3324/haematol.2019.236901

28. Weisel J, Litvinov R. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2007; 121(10): 1712-9. DOI: 10.1182/blood-2012-09-306639
29. Trabold K, Makhoul S, Gambaryan S, van Ryn J, Walter U, Jurk K. The Direct Thrombin Inhibitors Dabigatran and Lepirudin Inhibit GPIIb/IIIa-Mediated Platelet Aggregation. *Thromb. Haemost.* 2019; 119(6):916-929. doi: 10.1055/s-0039-1685139
30. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res.* 2015 Oct 30;29(6):437-44. DOI: 10.7555/JBR.29.20150121
31. Prevost N, Wolfe D, Tognolini M, Brass L. Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2003 Jul;1(7):1613-27. DOI: 10.1046/j.1538-7836.2003.00327.x
32. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri Z. Specific synergy of multiple substrate-receptors interaction in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998 Sep 4;94(5):657-66. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81607-4
33. Gawaz M. Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic disease. Stuttgart; New York: Thieme; 2001. 190 p.
34. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med.* 2002 Oct;8(10):1175-81. DOI: 10.1038/nm782
35. Massberg S, Brand K, Gruner S. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 196: 887-96. doi: 10.1084/jem.20012044
36. Huo Y, Schober A, Forlow S. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003; 9(1): 61-67. DOI: 10.1038/nm810

37. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2012 Apr;1(1):60-74. DOI: 10.1177/2048872612441582
38. Gutsche D. Calixarenes: A personal history. In: Vicens J, Harrowfield J, editors. *Calixarenes in the Nanoworld*. Springer; Dordrecht, The Netherlands; 2007. p. 1-19.
39. Roundhill D. Calixarenes. *Comprehensive Coordination Chemistry II*. 2003. p 485-91.
40. Baldini L., Casnati A., Sansone F., Ungaro R. Calixarene-based multivalent ligands. *Chem Soc Rev*. 2007; 36(2):254-66. DOI: 10.1039/b603082n
41. Basilotta R, Mannino D, Filippone A, Casili G, Prestifilippo A, Colarossi L, et al. Role of Calixarene in Chemotherapy Delivery Strategies. *Molecules*. 2021; 26(13):3963. DOI: 10.3390/molecules26133963
42. Español ES, Villamil MM. Calixarenes: Generalities and Their Role in Improving the Solubility, Biocompatibility, Stability, Bioavailability, Detection, and Transport of Biomolecules. *Biomolecules*. 2019 Mar 5;9(3):90. DOI: 10.3390/biom9030090.
43. Ferreira J, Bagatin I. A Cr(VI) selective probe based on a quinoline-amide calix[4]arene. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2018; 189:44-50. DOI: 10.1016/j.saa.2017.07.056
44. Jebors S, Fache F, Balme S, Devoge F, Monachino M, Cecillon S, Coleman A. Designer amphiphiles based on para-acyl-calix[8]arenes. *Org Biomol Chem*. 2008; 6(2):319-29. DOI:10.1039/b713883k
45. Morie M, Sekiya R, Haino T. Calix[4]arene-Based Triple-Stranded Metallohelicite in Water. *Chem Asian J*. 2021; 16(1):49-55. DOI: 10.1002/asia.202001154

46. Lugovskoy E, Gritsenko P, Koshel T., Koliesnik IO, Cherenok SO, Kalchenko OI, et al. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization. FEBS Journal. 2011; 278(8):1244-51. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08045.x

47. Boraste D, Chakraborty G, Ray A, Shankarling G, Pal H. Supramolecular host-guest interaction of antibiotic drug ciprofloxacin with cucurbit[7] macrocycle: Modulations in photophysical properties and enhanced photostability. J Photochem Photobiol. 2018; 358: 26-37.

48. Кошель Т, Чернышенко В, Черенок С, Колесник Е. Исследование механизма ингибирования полимеризации фибрина каликсаренбисфосфоновой кислотой и ее мононатриевой солью. Приложение к журналу «Вести Национальной академии наук Беларуси», серия биологических наук. 2012; 3: 95-8.

49. Rodik R, Boyko V, Kalchenko V. Calixarenes in bio-medical researches. Curr Med Chem. 2009; 16(13): 1630-55. DOI: 10.2174/092986709788186219

50. Pur F. Calix[4]API-s: fully functionalized calix[4]arene-based facial active pharmaceutical ingredients. Mol Divers. 2021; 25(2):1247-58. DOI: 10.1007/s11030-020-10042-0

51. Podyachev S, Zairov R, Mustafina A. 1,3-Diketone Calix[4]arene Derivatives- A New Type of Versatile Ligands for Metal Complexes and Nanoparticles. Molecules. 2021; 26(5):1214. DOI: 10.3390/molecules26051214.

52. Bhol M, Claude G, Jungfer M, Abram U, Sathiyendiran M. Calix[4]arene-Analogous Technetium Supramolecules. Inorg Chem. 2022. 23 61, 13, 5173-7. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c03691

53. Komisarenko S, Kosterin S, Lugovskoy E, Kalchenko V. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. Укр. біохім. журн. 2013; 85(6): 106-128. DOI: 10.15407/ubj85.06.106

54. Rodik R, Boyko V, Kalchenko V. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr Med Chem.* 2009; 16(13): 1630-55. DOI: 10.2174/09298670978
55. de Fátima A, Fernandes S, Sabino A. Calixarenes as new platforms for drug design. *Curr Drug Discov Technol.* 2009; 6(2):151-70. DOI: 10.2174/157016309788488302
56. Cherenok S, Vovk A, Muravyova I, Shivanyuk A, Kukhar V, Lipkowski J, Kalchenko V. Calix[4]arene alpha-aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatase. *Org Lett.* 2006; 8(4):549-52. DOI: 10.1021/ol052469a
57. Jurisch C, Arnott G. Attempted synthesis of a *meta*-metalated calix[4]arene. *Beilstein J Org Chem.* 2019; 15:1996-2002. DOI: 10.3762/bjoc.15.195
58. Shirakawa S, Kimura T, Murata S, Shimizu S. Synthesis and resolution of a multifunctional inherently chiral calix[4]arene with an ABCD substitution pattern at the wide rim: the effect of a multifunctional structure in the organocatalyst on enantioselectivity in asymmetric reactions. *J Org Chem.* 2009; 74(3):1288-96. DOI: 10.1021/jo8024412
59. Meneses A, Perez-Garcia G, Ponce-Lopez T, Tellez R, Gallegos-Cari A, Castillo C. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Rev Neurosci.* 2011; 22(3):365-71. DOI: 10.1515/RNS.2011.024
60. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act. *Vet Q.* 1986; 8(4):346-9. DOI: 10.1080/01652176.1986.9694067
61. Hollands C. The Animals (scientific procedures) Act 1986. *Lancet.* 1986 Jul 5; 2(8497):32-3. DOI: 10.1016/s0140-6736(86)92571-7
62. Polten B. Stand der Rechtsetzung im Bereich Tierschutz [Status of law-making on animal welfare]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2007; 114(3):98-103.
63. Долгов В, Свирин П. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М. Тверь: Триада; 2005. 227 с.

64. Bronić A, Margetić S, Coen Herak D, Milić M, Krešić B, Radišić Biljak V, et al. Reporting of activated partial thromboplastin time (aPTT): Could we achieve better comparability of the results? *Biochem Med (Zagreb)*. 2021; 31(2):020708. DOI: 10.11613/BM.2021.020708
65. Walker M, Retzinger A, Retzinger G. A turbidimetric method for measuring the activity of trypsin and its inhibition. *Anal Biochem*. 2006; 351(1):114-21. DOI: 10.1016/j.ab.2005.11.024
66. Joslynd D, Galbraith M. A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *J Bacteriol*. 1947; 54(1):26.
67. Born G. Changes in the distribution of phosphorus in platelet-rich plasma during clotting. *Biochem J*. 1958; 68(4):695-704. DOI: 10.1042/bj0680695
68. Xie J, Li L. Comments on the utilization of Mann-Whitney U test and Kaplan-Meier method. *J Gynecol Oncol*. 2021; 32(3):e46. DOI: 10.3802/jgo.2021.32.e46
69. Fay M, Malinovsky Y. Confidence intervals of the Mann-Whitney parameter that are compatible with the Wilcoxon-Mann-Whitney test. *Stat Med*. 2018; 37(27):3991-4006. doi: 10.1002/sim.7890
70. Tulis D. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model. *Methods Mol Med*. 2007; 139: 31-66. DOI: 10.1007/978-1-59745-571-8_2
71. Schmidt C, Rowen T. Female Genital Self-Image and Modification. *J Sex Med*. 2021; 18(12):1945-9. DOI: 10.1016/j.jsxm.2021.08.013
72. Rha E, Kim J, Yoo G. Volume Measurement of Various Tissues Using the Image J Software. *J Craniofac Surg*. 2015; 26(6):e505-6. DOI: 10.1097/SCS.0000000000002022
73. Capoor MN, Stonemetz JL, Baird JC, Ahmed FS, Awan A, Birkenmaier C, et al. Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Testing: A Comparative Effectiveness Study in a Million-Patient Sample. *PLoS One*. 2015 Aug 11; 10(8): e0133317. DOI: 10.1371/journal.pone.0133317

74. He S, Antovic A, Blombäck M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thromb Res.* 2001; 103(5): 355-61. DOI:10.1016/S0049-3848(01)00332-2

75. Blombäck B. Travels with fibrinogen. *J Thromb Haemost.* 2006; 4(8):1653-60. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02056.x

76. Meseguer J, Esteban M, Rodríguez A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microsc Res Tech.* 2002; 57(6): 491-7. DOI: 10.1002/jemt.10102

77. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem.* 2018; 120(4):303-11. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.03.007

78. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(23): 12827. DOI: 10.3390/ijms222312827

79. OECD 425. OECD Guideline for Testing of Chemicals «Acute Oral Toxicity-Up-and-Down Procedure». 2001.

80. Yao W, Cheng J, Kandhare A, Mukherjee-Kandhare A, Bodhankar S, Lu G. Toxicological evaluation of a flavonoid, chrysin: morphological, behavioral, biochemical and histopathological assessments in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2021; 44(6): 601-12. DOI: 10.1080/01480545.2019.1687510

81. Hunt P. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol.* 2017; 37(1): 50-59. DOI: 10.1002/jat.3357

82. Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition. United Nations, New York and Geneva, 2013.

83. Стефанов О. Доклінічне дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 85 с.

84. Lugovskoy E, Gritsenko P, Koshel T, Koliesnik I, Cherenok S, Kalchenko O, et al. "Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization. FEBS J. 2011 Apr; 278(8):1244-51. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08045.x

85. Chernyshenko V, Korolova D, Nikolaenko T, Dosenko V, Pashevin D, Kalchenko V, et al. Calix[4]arene C-145 effects on cellular haemostasis. Biotech. Acta. 2016; 9(3): 37-43. DOI: 10.15407/biotech9.03.037

86. Korbo L, Pakkenberg B, Ladefoged O, Gundersen H, Arlien-Søborg P, Pakkenberg H. An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. J Neurosci Methods. 1990; 31(2): 93-100. DOI: 10.1016/0165-0270(90)90153-7

87. Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Fukunaga C, Watanabe S, Kubota A, et al. A new model to evaluate the diet-induced prothrombotic state, using He-Ne laser-induced thrombogenesis in the carotid artery of apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Blood Coagul Fibrinolysis. 2002; 13(6): 497-504. DOI: 10.1097/00001721-200209000-00004

88. Albadawi H, Witting A, Pershad Y, Wallace A, Fleck A, Hoang P, et al. Animal models of venous thrombosis. Cardiovasc Diagn Ther. 2017; 7(Suppl 3): S197-S206. DOI: 10.21037/cdt.2017.08.10

89. Zhang Y, Yang Y, Chen W, Liang L, Zhai Z, Guo L, Wang C; China Venous Thromboembolism VTE Study Group. Hypertension associated with venous thromboembolism in patients with newly diagnosed lung cancer. Sci Rep. 2016; 6: 19603. DOI: 10.1038/srep19603

90. Violi F, Pastori D, Pignatelli P, Carnevale R. Nutrition, Thrombosis, and Cardiovascular Disease. Circ Res. 2020; 126(10): 1415-42. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315892

91. Wan Z. Shortened Activated Partial Thromboplastin Time (APTT): A Simple but Important Marker of Hypercoagulable State During Acute Coronary Event. In: Dr.

Angelo Squeri, editor. Coronary Artery Disease - New Insights and Novel Approaches; 2012. P. 157-66.

92. Xiaojie Z, Bing B. Correlation of fibrinogen level and absorbance change in both PT and APTT clotting curves on BCSXP. *J Nanjing Medic Univer.* 2008; 22(3): 193-8. DOI: 10.1016/S1007-4376(08)60063-5

93. Lippi G., Salvagno G., Ippolito L., Franchini M., Favaloro E. Shortened activated partial thromboplastin time: causes and management. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010; 21(5):459-63.

94. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(1): 118-127. DOI: 10.4103/0975-7406.76489

95. Johnson R. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *J Anim Sci.* 1997; 75(5):1244-55. DOI: 10.2527/1997.7551244x

96. Eckersall P, Conner J. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun.* 1988; 12(2-3):169-78. DOI: 10.1007/BF00362798

97. Bouwens E, Stavenuiter F, Mosnier L. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost.* 2013; 11 Suppl 1: 242-53. DOI: 10.1111/jth.12247

98. le Maire A, Teyssier C, Balaguer P, Bourguet W, Germain P. Regulation of RXR-RAR Heterodimers by RXR- and RAR-Specific Ligands and Their Combinations. *Cells.* 2019; 8(11):1392. DOI: 10.3390/cells8111392

99. Basanova A, Baskova I, Zavalova L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. *Biochemistry (Mosc).* 2002; 67(1):143-50. DOI: 10.1023/a:1013968618120

100. Liu B, Li J, Lin X, Hu J, Lou S. The metabolic changes in the hippocampus of an atherosclerotic rat model and the regulation of aerobic training. *Metab Brain Dis.* 2020; 35(6):1017-34. DOI: 10.1007/s11011-020-00566-7

101. Lipiński B, Worowski K. Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test. *Thromb Diath Haemorrh.* 1968; 20(1):44-9.

102. Chernyshenko V., Pirogova L., Didkivskiy V., Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Kalchenko V., Makogonenko E., Lugovskoy E. Effects of calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma in vitro and in vivo. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences.* 2016. 10(3): 146-151.

103. Chernyshenko V., Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., Didkivskiy V., Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E., Komisarenko S. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. *Ukr. Biochem. J.* 2018. 90(6): 21-30. <https://doi.org/10.15407/ubj90.06.021>

104. **Didkivskiy V.A.**, Pavlenko A.O., Marunych R. Y., Selikhova A.O., Cherenok S. O., Todosiuk T.P., Shevchenko S.M. HPLC detection of antithrombotic calix[4]arene in blood plasma of animals. *Biotechnologia Acta.* 2022. 15(2): 51-52. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.051>

105. **Didkivskiy V.**, Pavlenko A. Approbation of calix[4]arene C-145 as antithrombotic agent in vivo. *Biotechnologia acta.* 2022. 15(2): 41-46. <https://doi.org/10.15407/biotech15.05.041>

106. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Chernyshenko T.M., Platonova T.M. Protective action of N-stearoylethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet. *Ukr. Biochem. J.* 2020. 92(2): 60-70. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.060>

Додаток 1
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Chernyshenko V., Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., **Didkivskiy V.**, Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E., Komisarenko S. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. Ukr. Biochem. J. 2018. 90(6): 21-30. <https://doi.org/10.15407/ubj90.06.021> – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Chernyshenko V. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Savchuk O.– проектування та виконання дослідження;

Cherenok S.– проектування та виконання дослідження;

Silenko O. – збір даних, інтерпретація результатів;

Negelia A. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Kasatkina L.– методологія, ресурси;

Pirogova L.– концептуалізація, рецензування та редагування;

Didkivskiy V.– проведення агрегатометрії, проведення клотингових тестів, визначення динаміки росту клітин у культурі;

Yusova O.– візуалізація, ресурси, вичитка рукопису;

Kalchenko V.– методологія, ресурси;

Garmanchuk L.– концептуалізація, рецензування та редагування;

Grinenko T. – методологія, ресурси;

Lugovskoy E. – адміністрування проєкту, дослідження, концептуалізація, підготовка чернетки рукопису, написання огляду та редагування;

Komisarenko S. – методологія, ресурси, інтерпретація результатів.

2. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Chernyshenko T.M., Platonova T.M. Protective action of N-stearoylethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet. Ukr. Biochem. J. 2020. 92(2): 60-70. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.060> – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Tkachenko O.– адміністрування проекту, написання оригінальної чернетки;

Hudz Ie.– проектування та виконання дослідження;

Kosiakova H.– виконання дослідження, візуалізація;

Klymenko P. –інтерпретація результатів;

Stohnii Y.– концептуалізація, рецензування та редагування;

Didkivskiy V.– створення моделі атеросклерозу;

Chernyshenko T.M.– ресурси, методологія;

Platonova T.M – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

3. **Didkivskiy V.**, Pavlenko A. Approbation of calix[4]arene C-145 as antithrombotic agent in vivo. Biotechnologia acta. 2022. 15(5): 41-46. <https://doi.org/10.15407/biotech15.05.041>

Didkivskiy V.– проведення експерименту на тваринах і написання тексту статті;

Pavlenko A. – проектування та виконання дослідження, концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису, візуалізація, вчитка рукопису.

4. **Didkivskiy V.A.**, Pavlenko A.O., Marunych R. Y., Selikhova A.O., Cherenok S. O., Todosiuk T.P., Shevchenko S.M. HPLC detection of antithrombotic calix[4]arene in blood plasma of animals. Biotechnologia Acta. 2022. 15(2): 51-52. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.051>

Didkivskiy V.A. – проведення in vivo досліджень, введення каліксарену щурам, забір крові, визначення активованого часткового тромбoplastинового часу та протромбінового часу;

Pavlenko A.O. – проектування та виконання дослідження;

Marunych R. Y.– проектування та виконання дослідження;

Selikhova A.O. – збір даних, інтерпретація результатів;

Cherenok S. O. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Todosiuk T.P. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Shevchenko S.M. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

5. Chernyshenko V., Pirogova L., **Didkivskiy V.**, Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Kalchenko V., Makogonenko E., Lugovskoy E. Effects of calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma in vitro and in vivo. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2016. 10(3): 146-151.

Chernyshenko V. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Pirogova L. – проектування та виконання дослідження;

Didkivskiy V.– введення каліксарену щурам, забір крові, визначення загального гемостатичного потенціалу у плазмі крові щурів за умов введення каліксарену in vivo та in vitro;

Cherenok S. – збір даних, інтерпретація результатів;

Dosenko V. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Pashevin D.– методологія, ресурси;

Kalchenko V.– концептуалізація, рецензування та редагування;

Makogonenko E.– концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису;

Lugovskoy E. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

6. Chernyshenko V., **Didkivskiy V.**, Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E. Head-to-head comparison of calix[4]arene bis-phosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analog as hemostasis effectors. FEBS3+ Meeting -

XIth Parnas Conference - Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”. Ukr. Biochem. J. Volume 90, Special Issue, 2018.37.

7. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Platonova T. The impact of anti-inflammatory action of N-stearolyethanolamine on the development of atherosclerosis in spontaneously hypertensive rats taking cholesterol rich diet. 10th RECOOP Annual Project Review Meeting, Wroclaw, October 11-12, 2019:77.

8. **Didkivskiy V.**, Chernyshenko V., Pyrogorova L., Kalchenko V., Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Nikolaenko T., Harmanchuk L. Calix[4]arene-based antithrombotic medication: from *in silico* to *in vivo*. XII Український біохімічний конгрес (м. Тернопіль, 30 вересня - 4 жовтня 2019 р.), Тернопіль: Медична та клінічна хімія. 2019 Т. 21 №3 (додаток): 27.

9. **Didkivskiy V.**, Hrabovskiy O., Humenyuk A., Selikhova A., Banya M., Cherenok S., Chernyshenko V. Binding of calix[4]arene to the A-knob of fibrin: *in silico* proves *in vitro*. Clusters and nanostructured materials (CNM-6). Uzhhorod, October 5-9, 2020. 48-49.

10. Kucheriavyu Y., **Didkivskiy V.**, Selikhova A., Tokmakova Y., Cherenok S., Zhminko P., Chernyshenko V. Antithrombotic action of sodium salt of 5,11,17,23-bis (dihydroxyphosphoryl) methylcalix[4]arene *in vivo*. RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference. April 16, 2021, P 53.

11. Комісаренко С., Чернишенко В., **Дідківський В.** Створення прототипу лікарського препарату “Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145” та його доклінічні дослідження. Національна академія наук України у 2021 році / Видавець та виготовлювач Видавничий дім «Академперіодика» НАН України Київ : с 19.