

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL  
RESEARCH

**Растворимая гуанилатциклаза (pГЦ)  
в реализации гипотензивного  
и антиагрегантного эффектов  
терафталта (ТФ, натриевая соль  
4,5-октакарбокситфалоцианина кобальта)**

**Т.А. Сидорова<sup>1</sup>, Н.В. Пятакова<sup>2</sup>, И.С. Северина<sup>2</sup>,  
О.Л. Калия<sup>3</sup>, Г.К. Герасимова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, Москва, Российская Федерация, 119121

<sup>3</sup> ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», ул. Большая Садовая, д. 1, Москва, Российская Федерация, 123995

**Soluble Guanylyl Cyclase (sGC)  
in Mechanisms of Hypotensive  
and Antiaggregatory Effects Induced  
by Teraphtal (TP, sodium salt  
4,5-cardoxyphthalocyanin-cobalt)**

**TA Sidorova<sup>1</sup>, NV Pyatakova<sup>2</sup>, IS Severina<sup>2</sup>,  
OL Kaliya<sup>3</sup>, GK Gerasimova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

<sup>2</sup> V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 bld. 8, Pogodinskaya str., Moscow, Russian Federation, 119121

<sup>3</sup> State Scientific Center NIOPIC, 1 Bol'shaya Sadovaya str., Moscow, Russian Federation, 123995

РЕФЕРАТ

**Актуальность и цели.** Разнообразие противоопухолевых препаратов определяет не только их лечебный эффект, но и спектр осложнений, включая острые гемодинамические нарушения: артериальную гипотензию/гипертензию, нарушения в свертывающей системе крови. Цель работы заключается в выяснении роли растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) в механизмах развития гипотензивного и антиагрегантного эффектов, индуцированных терафталом (ТФ) в экспериментальных условиях и в клинике.

**Методы.** Влияние различных препаратов на базальную активность pГЦ, выделенной из тромбоцитов крови человека, оценивали по продукции циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) с помощью иммуноферментного метода. Влияние ТФ на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ, изучали турбидиметрическим методом Борна с помощью агрегометра.

**Результаты.** В присутствии ТФ базальная активность pГЦ возрастает в среднем в 2,5 раза. Кривая активации pГЦ терафталом имеет колоколообразный вид, максимальный эффект стимуляции фермента достигается при концентрации препарата 1 мкмоль/л. ТФ не влияет на эффективность активации pГЦ известными регуляторами фермента: нитропруссидом (SNP) и YC-1. В то же время преинкубация pГЦ с ТФ приводит к снижению в среднем на 33 % способности YC-1 потенцировать стимуляцию pГЦ, индуцированную SNP. *In vitro* выявлена способность ТФ ингибировать агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, и определена величина IC<sub>50</sub> для ТФ (15 мкмоль/л).

ABSTRACT

**Background & Aims.** Many antitumor drugs produces not only the variety of therapeutic effects but also a broad spectrum of side effects, including acute hemodynamic dysfunctions (hypotension/hypertension, coagulation disorders). The aim of the paper is to investigate the role of soluble guanylyl cyclase (sGC) in mechanisms of hypotensive and antiaggregatory effects induced by teraphtal (TP) under experimental conditions in the clinic.

**Methods.** The effect of different products on the basal activity of sGC isolated from platelets of human peripheral blood was assessed by the immunoenzyme method based on production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). The effect of TP on ADP-induced human platelet aggregation was evaluated by the turbidimetric Born method using an aggregometer.

**Results.** In the presence of TP, the basal sGC activity increased by the average of 2.5-fold. The TP-induced dose-response curve of sGC activation displays a bell-shaped behavior with maximal stimulation effect achieved at a concentration of 1 μmol/L. TP does not affect the sGC activation induced by known sGC regulators, such as sodium nitroprusside (SNP) and YC-1. On the other hand, after preliminary incubation of sGC with TP, the ability of YC-1 to potentiate the enzyme stimulation induced by SNP decreased by about 33 %. *In vitro* tests demonstrated the ability of TP to inhibit the ADP-induced platelet aggregation and established the IC<sub>50</sub> value for TP (15 μmol/L).

**Conclusion.** TP is a direct sGC activator and therefore is able to participate in regulation of the NO→sGC→cGMP signaling

**Заключение.** ТФ является прямым активатором рГЦ и, следовательно, способен участвовать в регуляции сигнального пути  $\text{NO} \rightarrow \text{pGC} \rightarrow \text{cGMP}$ , контролирующего базальный тонус сосудов и агрегантные свойства тромбоцитов. Принимая во внимание особенности природы ТФ, обсуждается вовлечение дополнительных механизмов в развитие гипотензии и нарушений гемостаза, индуцированных препаратом.

**Ключевые слова:** тромбоциты человека, растворимая гуанилатциклаза, терафтал, нитропруссид натрия, YC-1, гипотензия, АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов.

**Получено:** 24 апреля 2015 г.

**Принято в печать:** 25 февраля 2016 г.

*Для переписки:* Татьяна Александровна Сидорова, канд. мед. наук, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(499)612-79-92; e-mail: tatsid@yahoo.com

*Для цитирования:* Сидорова Т.А., Пятакова Н.В., Северина И.С. и др. Растворимая гуанилатциклаза (pGC) в реализации гипотензивного и антиагрегантного эффектов терафтал (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбокситалацианина кобальта). Клиническая онкогематология. 2016;9(2):138–47.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-138-147

pathway that controls the basal vascular tone and aggregatory platelet properties. Taking into account the TP characteristics, the paper discusses the involvement of additional mechanisms in the development of hypotension and hemostatic disorders induced by the drug.

**Keywords:** human platelets, soluble guanylyl cyclase, teraphthal, sodium nitroprusside, YC-1, hypotension, ADP-induced platelet aggregation.

**Received:** April 24, 2015

**Accepted:** February 25, 2016

*For correspondence:* Tat'yana Aleksandrovna Sidorova, PhD, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(499)612-79-92; e-mail: tatsid@yahoo.com

*For citation:* Sidorova TA, Pyatakova NV, Severina IS, et al. Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) in Mechanisms of Hypotensive and Antiaggregatory Effects Induced by Teraphthal (TP, sodium salt 4,5-cardoxyphthalocyanin-cobalt). Clinical oncohematology. 2016;9(2):138–47 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-138-147

## ВВЕДЕНИЕ

Биологическая активность противоопухолевых препаратов различных классов имеет свои особенности. Химическая структура этих веществ определяет не только их лечебные свойства, но и спектр побочной токсичности, включая острые гемодинамические эффекты: дисрегуляцию (снижение или повышение) АД, нарушения в свертывающей системе крови и др. В клинической онкологии для отдельных препаратов частота сердечно-сосудистых и гемостатических осложнений составляет 10–20 % случаев [1].

Данные литературы, посвященные исследованиям механизмов гемодинамических эффектов цитостатических средств, малочисленны. В то же время высокий риск тяжелых осложнений, таких как гипертонический криз, коллапс, тромбозы, кровотечения, индуцированных химиотерапией, требует от клиницистов понимания причин развития этих патологических состояний.

Снижение АД нередко наблюдается после введения моноклональных антител [2–4], цитокинов [5], интерферонов [6], цитостатических агентов [7–9], таргетных препаратов [10], бортезомиба [11], гомохарингтонина [12]. Причины гипотензивного эффекта противоопухолевых средств разные. Как свидетельствуют данные литературы, не только сами препараты, но и растворители, входящие в состав их лекарственных форм, вносят вклад в конечный побочный эффект. Так, «медиаторный шок» с падением АД развивался при внутривенном введении этопозида [7]. Однако причиной такой реакции оказался не сам цитостатик, а его растворитель (твин), и эта проблема была устранена с использованием водорастворимой формы препарата [13]. Длительное время считалось, что снижение АД у больных, получавших таксаны, связано с развитием реакции гиперчувствительности в ответ на растворитель (ПЭГ-35 касторовое масло) [14]. Однако выяснилось, что паклитаксел самостоятельно стимули-

рует выброс нейропептидов (вещества Р, нейрокинина А) и индуцирует развитие воспаления в чувствительных нервах вегетативной нервной системы. Это, в свою очередь, приводит к снижению тонуса гладкой мускулатуры сосудов [15]. Вегетативная нервная система и пути ее регуляции тонуса сосудов, как предполагается, вовлекаются в механизм гипотензии, индуцированной винкристином (блокада адренорецепторов [16]) и селективными ингибиторами Akt-киназ (блокада никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [17]). Механизм гипотензивного эффекта бортезомиба неизвестен [18]. Нельзя исключить, что по аналогии с винкристином в развитие гипотензии может быть вовлечена вегетативная нервная система [16]. Такое предположение может подтверждаться развитием периферической нейротоксичности у пациентов, получающих препарат [19]. Падение АД у больных после введения гомохарингтонина [20], а у животных в ответ на селективные ингибиторы Akt-киназ [21] связывают с нарушением функции сердечно-сосудистой системы вследствие угнетения L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках.

Гипертензия, как правило, может развиваться на фоне кардиотоксичности (антрациклиновые антибиотики, митоксантрон) и/или нефротоксичности (цисплатин) [22, 23]. В то же время некоторые препараты способны вызывать прямой «прессорный» эффект. Развитие выраженной гипертензии наблюдается при использовании ингибиторов ангиогенеза: бевацизумаба (моноклональное антитело к эндотелиальному фактору роста сосудов — VEGF-A) [24, 25] и сунитиниба (мультикиназный ингибитор, включая рецепторы VEGF — VEGFR) [26, 27]. Более того, развитие гипертензии у больных на фоне лечения сунитинибом рассматривается как биологический маркер эффективности препарата [28].

Установлено, что в механизмах гипертензии, индуцированной антиангиогенными препаратами, ключевую

роль играет блокада сигнальных путей VEGF/VEGFR [29] вследствие нейтрализации лиганда (VEGF-A) бевацизумабом [30] или рецептора (VEGFR) сунитинибом [31]. В развитии гипертензии, вызванной ингибиторами ангиогенеза, выделяют раннюю (острую) и позднюю (хроническую) фазы. Ранние изменения АД после введения этих препаратов связаны с быстрым угнетением сигнальных путей VEGF/VEGFR и снижением активности фермента эндотелия сосудов — синтазы оксида азота (eNOs) [32, 33]. Блокада активности eNOs приводит к снижению синтеза оксида азота (NO), который является мощным эндогенным активатором растворимой гуанилатциклазы (pГЦ), цитозольного белка-фермента в клетках гладкой мускулатуры сосудов. В настоящее время известно, что pГЦ играет ключевую роль в сигнальном пути  $NO \rightarrow pГЦ \rightarrow cГМФ$ , который контролирует базальный тонус гладкой мускулатуры сосудов, агрегационные свойства тромбоцитов [34] и тем самым участвует в поддержании нормальной функции сердечно-сосудистой системы [35]. Повторные курсы химиотерапии антиангиогенными препаратами вызывают структурное и функциональное повреждение микроциркуляции в организме и вносят вклад в дальнейшее поддержание гипертензии у больных. В такой ситуации развивается хроническое ремодулирование системы капилляров в организме. Оно заключается в разрежении капиллярной сети и наблюдается при лечении как бевацизумабом [29], так и сунитинибом [30].

Осложнением противоопухолевой химиотерапии могут быть и нарушения в системе свертывания крови. Риск развития тромбоэмболических осложнений, которые и сами по себе увеличиваются у онкологических больных (паранеопластический синдром), может дополнительно усугубляться противоопухолевыми препаратами: цисплатином [1], бевацизумабом, эстрамустином, талидомидом [36]. Как и в случае дисрегуляции АД, патофизиология нарушений гемостаза, индуцированных цитостатическими препаратами, комплексная и не достаточно изучена. Тромбоэмболия как осложнение противоопухолевой химиотерапии может быть следствием прямого повреждения эндотелия сосудов, например, доксорубицином [37], усиления агрегации тромбоцитов цисплатином вследствие освобождения прокоагулянтов (тромбоксана) [38], гепатотоксичности фторурацила, приводящей к снижению продукции антикоагулянтов [39].

С другой стороны, такие препараты, как винкристин [40] и паклитаксел [41], обладают антиагрегантными свойствами, в основе которых лежит угнетение продукции тромбоксанов в тромбоцитах.

Гемодинамические эффекты противоопухолевых веществ, выявленные еще в фазе экспериментальных исследований, как правило, подтверждаются в клинике.

В качестве нового противоопухолевого средства начаты клинические исследования бинарной каталитической системы терафтала в комбинации с аскорбиновой кислотой [БК (ТФ+АК)]. На доклинической стадии было установлено, что введение животным ТФ, компонента каталитической системы, в низкой токсической дозе сопровождается гемодинамическими осложнениями: развитием умеренной гипотензии [42] и нарушением гемостаза со снижением способности тромбоцитов к агрегации [43]. Результаты I фазы клинических исследований БК (ТФ+АК) свидетельствуют о том, что у больных отмечены

аналогичные осложнения, вплоть до развития коллапса у I пациента [44].

Выявленные у животных гемодинамические нарушения после введения ТФ, сочетание индуцированной гипотензии с антиагрегантным свойством препарата, легли в основу гипотезы о том, что в механизме наблюдаемых эффектов ТФ может участвовать pГЦ и ее сигнальные пути в клетке. В пользу нашей гипотезы «pГЦ — молекулярная мишень ТФ», свидетельствуют данные литературы о том, что близкие по химической структуре к ТФ (фталоцианин) металлопорфирины являются активаторами pГЦ с гемодинамическими последствиями: протопорфирин IX (PPIX) [45], витаминеры витамина B<sub>12</sub> (оксикобаламин, цианокобаламин) и его природные предшественники [46, 47].

**Цель данной работы** — выяснить, вовлекается ли pГЦ в механизмы гипотензивного и антиагрегантного эффектов ТФ. Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали влияние ТФ на функциональную активность pГЦ и агрегацию тромбоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались следующие химические реагенты и лекарственные средства: Histopaque-1077, креатинфосфокиназа, гуанозинтрифосфат (ГТФ), теофиллин, магния хлорид, ЭДТА, Трис-ОН, Трис-НСI, аденозиндифосфат (АДФ), ДМСО; YC-1-[3-(5'-гидроксиметил-2'-фурил)-1-бензилиндазол] (Sigma, США); креатинфосфат, дитиотреитол (ДТТ), альбумин (Seriva, Швеция); натрия хлорид, натрия цитрат (квалификация «осч»; «Реахим», Россия); нитропруссид натрия (SNP) (Fluka, Швейцария); терафтал-лио (серия 051298) — препарат совместного производства ФГУП ГНЦ «Научно-исследовательского института полупродуктов и красителей» — «НИОПИК» и ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Для приготовления стоковых растворов SNP и ТФ препараты растворяли в воде, YC-1 — в ДМСО; все дальнейшие разведения выполнялись в 50 ммоль/л Трис-НСI буфере (pH 7,6).

Наборы для определения cГМФ в биологических образцах методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) получены от компаний Bioimmugen (Россия) и Amersham (RPN226, Великобритания).

Источником pГЦ служили тромбоциты крови здоровых людей. Забор венозной крови осуществляли в пробирку с антикоагулянтом (3,8% раствор натрия цитрата в физиологическом растворе).

### Выделение pГЦ из тромбоцитов человека

Тромбоциты получали из цельной крови путем двухступенчатого центрифугирования [48]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 ммоль/л Трис-НСI (pH 7,6), содержащую 0,2 ммоль/л ДТТ, разрушали с помощью дезинтегратора MSE 5–78 (Великобритания) при температуре 2° С в течение 20 с, затем центрифугировали при скорости 34 000 об./мин в течение 1 ч (Beckman, США). Надосадочная фракция, полученная после ультрацентрифугирования, служила в качестве pГЦ. Количество выделенного белка-фермента в супернатанте определяли по методу Бредфорда. Цитозольная фракция тромбоцитов одного донора служила в качестве белка-фермента только для одного эксперимента.

### Определение функциональной активности рГЦ

Каталитическую активность рГЦ измеряли по методу, описанному в работе D.L. Garbers и F. Murad [49]. Согласно этому методу, для определения **базальной активности** рГЦ пробы (конечный объем 150 мкл) содержали 50 ммоль/л Трис-НСI буфер (рН 7,6), 20 мкг рГЦ-белка; субстратную смесь: 1 ммоль/л ГТФ, 4 ммоль/л магния хлорида, 10 ммоль/л теофиллина, 4 ммоль/л креатинфосфата, 20 мкг (120–160 ед.) креатинфосфокиназы. Для изучения **препарат-индуцированной активности** рГЦ (без величины базальной активности) в пробы дополнительно вносили SNP (10 мкмоль/л), YC-1 (3 мкмоль/л) или ТФ (в диапазоне концентраций  $10^{-9}$ – $10^{-4}$  моль/л). В этом случае сначала проводили преинкубацию фермента с препаратом при температуре 2 °С в течение 7–10 мин, а затем добавляли субстратную смесь и продолжали инкубацию при 37 °С в течение 15 мин в водяной бане. Ферментативную реакцию останавливали, помещая пробы в кипящую баню на 2 мин, затем их остужали на льду.

Содержание цГМФ в пробах, синтезированное рГЦ в ходе ферментативной реакции, определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), используя коммерческие наборы фирмы Bioimmunogen (Россия) и Amersham (Великобритания).

Результаты экспериментов представлены в виде удельной активности фермента, выраженной в пкмоль цГМФ/мг белка/мин. Эффективность препаратов в качестве активаторов оценивали с помощью степени активации, величина которой равна отношению удельной активности фермента в присутствии препарата к базальной активности. В зависимости от задачи исследования данные представлены в виде среднего из двух параллельных измерений или  $M \pm m$ .

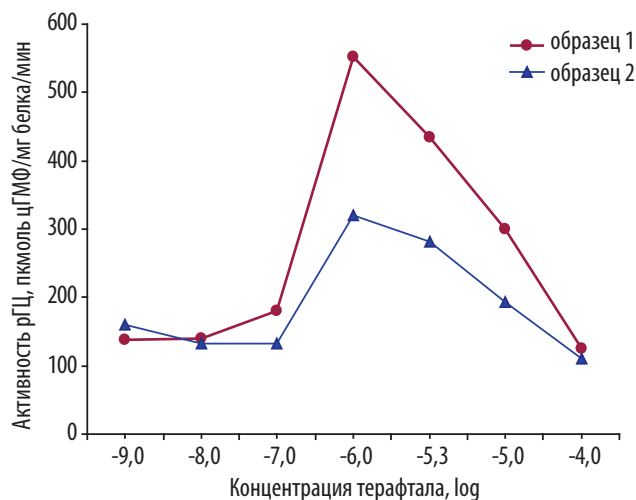
### Определение способности тромбоцитов к агрегации

Для исследования агрегации тромбоцитов кровь доноров помещали в пластиковую посуду, содержащую 3,8% раствор натрия цитрата в соотношении с кровью 1:9 по объему. Кровь центрифугировали при 450 g в течение 7 мин и отбирали богатую тромбоцитами плазму. Количество тромбоцитов при этом составляло  $(2,5–3,5) \times 10^8$  клеток в 1 мл плазмы. При необходимости исходную концентрацию тромбоцитов разбавляли плазмой, полученной в результате дополнительного центрифугирования оставшейся кровью при 1000 g в течение 20 мин. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ в конечной концентрации 12,5 мкмоль/л, инициирующей 48%-ю агрегацию. Процесс агрегации изучали с помощью турбидиметрического метода Борна [50], использовали агрегометр, разработанный в лаборатории биоорганической химии МГУ. ТФ (в диапазоне концентраций от  $1 \times 10^{-6}$  до  $2 \times 10^{-5}$  моль/л) добавляли в кювету за 1 мин до индуктора агрегации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Исследования влияния ТФ на функциональную активность рГЦ тромбоцитов человека

Для того чтобы выяснить, является ли ТФ регулятором рГЦ, мы с помощью рГЦ двух доноров (образцы 1 и 2) оценили активность препарата в широком диапазоне концентраций ( $10^{-9}$ – $10^{-4}$ ), моль.



**Рис. 1.** Зависимость активации растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека от концентрации терафталла. Данные представлены в виде среднего из двух параллельных измерений

**Fig. 1.** Dependence of soluble guanylyl cyclase (pGC) in human platelets on the teraphthal concentrations. Data are presented as a mean of two parallel measurements

Согласно нашим данным, представленным на рис. 1, базальная активность фермента в присутствии ТФ увеличивается, при этом эффективность активации зависит от дозы препарата. Максимальная активация фермента в обоих образцах наблюдается при концентрации препарата  $10^{-6}$  моль/л. Кроме того, важной особенностью кривой активации рГЦ в присутствии ТФ является ее четко «колоколообразный» характер с 2 фазами: активаторной (левое плечо) и ингибиторной (правое плечо). Колоколообразный тип кривой зависимости активации рГЦ от дозы активатора описан в литературе для природных индукторов фермента: NO [51, 52], витамина  $B_{12}$ , его предшественников [46] и их синтетических аналогов [53]. Такое двухфазное поведение кривой зависимости активации рГЦ от дозы активатора, как полагают исследователи, связано с наличием на ферменте двух сайтов (активаторного и ингибиторного) для взаимодействия с регулятором [52, 53]. В настоящее время «колоколообразный» механизм регуляции описан для белков различных классов [54], и, вероятно, в ближайшем будущем рГЦ сможет пополнить их ряды.

Поскольку максимальная активация рГЦ в присутствии ТФ достигается при концентрации препарата 1 мкмоль/л (см. рис. 1), в дальнейших исследованиях эта концентрация была выбрана для оценки эффективности ТФ как прямого активатора рГЦ. С этой целью в образцах рГЦ, выделенных из крови 9 доноров, было исследовано влияние на базальную активность ТФ параллельно с известными регуляторами SNP (донор NO) и YC-1.

Согласно нашим данным, представленным в табл. 1, в присутствии ТФ базальная активность рГЦ возрастает в среднем в 2,5 раза, при этом степень активации колеблется в диапазоне 1,3–4,0. Эффективность активации рГЦ терафталом по сравнению с таковой для SNP оказалась в 10 раз меньше (среднее значение 21, диапазон 3–90). В то же время она сопоставима с эффективностью другого известного активатора — YC-1 (среднее значение 3,1, диапазон 1,6–5,2). Согласно данным литературы,

**Таблица 1.** Влияние препаратов на базальную активность растворимой гуанилатциклазы тромбоцитов человека

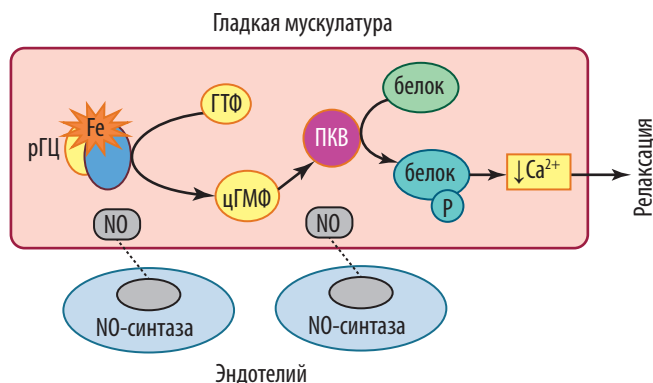
рГЦ (доноры)	Базальная активность рГЦ в присутствии (+) и без (-) препаратов, пкмоль цГМФ/мг белка/мин (степень активации)			
	(-) (базальная)	+ТФ (1 мкмоль/л)	+SNP (10 мкмоль/л)	+УС-1 (3,3 мкмоль/л)
1	138	552 (4,0)	НО	НО
2	123	320 (2,6)	НО	НО
3	113	267 (2,4)	360 (3,2)	301 (2,6)
4	52	98 (1,9)	317 (6,0)	179 (3,4)
5	60	96 (1,6)	420 (7,0)	94 (1,6)
6	46	125 (2,7)	2194 (50,0)	93 (2,0)
7	42	63 (1,5)	1617 (38,0)	219 (5,2)
8	37	48 (1,3)	НО	142 (4,0)
M ± m	76 ± 14	196 ± 72 (2,5 ± 0,4)	1877 ± 469 (21 ± 17)	(171 ± 42) (3,1 ± 0,7)

НО — не определено.

степень активации рГЦ (2–4 раза) характерна как для известных эндогенных регуляторов фермента, близких по химической структуре к ТФ (РРІХ [55], витамин В<sub>12</sub> и предшественников витамина В<sub>12</sub> [46, 47]), так и для синтетического соединения УС-1 [56], которое, как предполагают его создатели, имитирует неизвестный эндогенный регулятор рГЦ [57].

Таким образом, согласно нашим данным, ТФ является прямым активатором рГЦ, а наблюдаемый в его присутствии «колоколообразный» характер кривой активации фермента наводит на мысль о том, что он может быть имитатором природного регулятора фермента. Поскольку рГЦ оказалась молекулярной мишенью ТФ, этот препарат потенциально способен модулировать ее сигнальные пути в клетке. В первую очередь это касается сигнального пути eNOS→NO→рГЦ→цГМФ регуляции базального тонуса гладкой мускулатуры стенок сосудов и, следовательно, уровня давления в сосудистом русле.

Основные участники этого пути представлены на рис. 2.



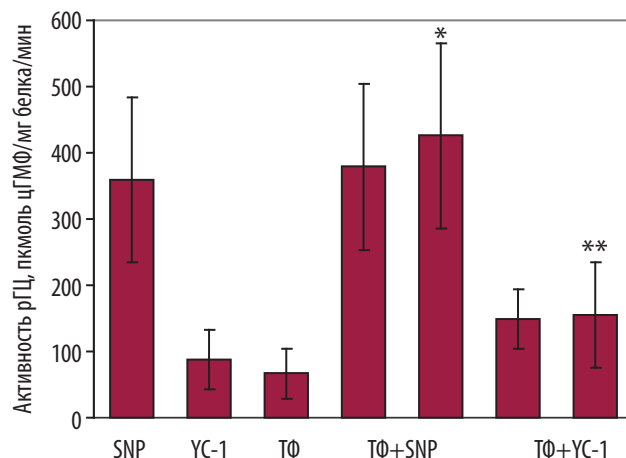
**Рис. 2.** Сигнальный путь eNOS→NO→рГЦ→цГМФ регуляции базального тонуса гладкой мускулатуры стенок сосудов NO — оксид азота; ГТФ — гуанозинтрифосфат; ПКВ — цГМФ-зависимая протеинкиназа; рГЦ — растворимая гуанилатциклаза; цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат.

**Fig. 2.** The eNOS→NO→sGC→cGMP signaling pathway of regulation of the basal tone of vascular wall smooth muscles NO — nitrogen oxide; ГТФ — guanosine triphosphate; ПКВ — cGMP-dependent protein kinase; рГЦ — soluble guanylyl cyclase; цГМФ — cyclic guanosine monophosphate.

В клетках эндотелия с помощью эндотелиальной формы синтазы оксида азота (eNOS) синтезируется сигнальная молекула — оксид азота (NO). Проникнув из эндотелия в клетки гладкой мускулатуры сосудов, NO активирует рГЦ, что приводит к увеличению концентрации в клетке вторичного мессенджера — цГМФ. В свою очередь, цГМФ, самостоятельно или путем активации цГМФ-зависимой протеинкиназы, снижает активность Ca<sup>2+</sup>-каналов и/или насосов, что в дальнейшем приводит к вазодилатации [58]. ТФ, будучи активатором рГЦ, способен вмешиваться в регуляцию этого сигнального пути на участке рГЦ→цГМФ, что может лежать в основе цГМФ-зависимого механизма гипотензивного эффекта препарата.

Достаточна ли степень активации фермента в 2–4 раза, достигаемая в присутствии ТФ, для индукции гипотензии, наблюдаемой после введения ТФ у животных [42, 44]? Как свидетельствуют данные литературы, известные регуляторы рГЦ, такие как РРІХ и УС-1, по силе активации фермента сопоставимы с ТФ и обладают способностью индуцировать гемодинамические нарушения. Накопление РРІХ в крови больных, источником которого является 5-аминолевулиновая кислота в фотодинамической терапии, коррелирует с развитием гипотензии [59, 60]. Введение животным УС-1 также сопровождается гемодинамическими эффектами [61]. С другой стороны, развитие гипотензии, вызванное как РРІХ, так и УС-1, может быть следствием не только их собственной эффективности как активаторов рГЦ, но и их способности усиливать активацию фермента физиологическим активатором — NO [62, 63].

Принимая во внимание возможность взаимодействия с эндогенными регуляторами рГЦ, мы исследовали влияние ТФ на активацию рГЦ донором NO (SNP), УС-1 и известную способность УС-1 вызывать дальнейшую стимуляцию фермента, индуцированную SNP [62].



**Рис. 3.** Влияние терафтала (ТФ) на способность нитропрусида (SNP) и УС-1 активировать растворимую гуанилатциклазу (рГЦ). По оси абсцисс — варианты комбинированного воздействия препаратов; аддитивный вклад веществ в комбинации отражают столбцы (ТФ+SNP)\* и (ТФ+УС-1)\*\*. Данные представлены в виде M ± m трех независимых экспериментов

**Fig. 3.** The effect of teraphthal (ТФ) on the ability of sodium nitroprusside (SNP) and УС-1 to activate soluble guanylyl cyclase (рГЦ). X-axis demonstrates variants of a combined effect of drugs; columns (ТФ+SNP)\* and (ТФ+УС-1)\*\* reflect the additive contribution of substances in the combination. Data are presented as M ± m of three independent experiments

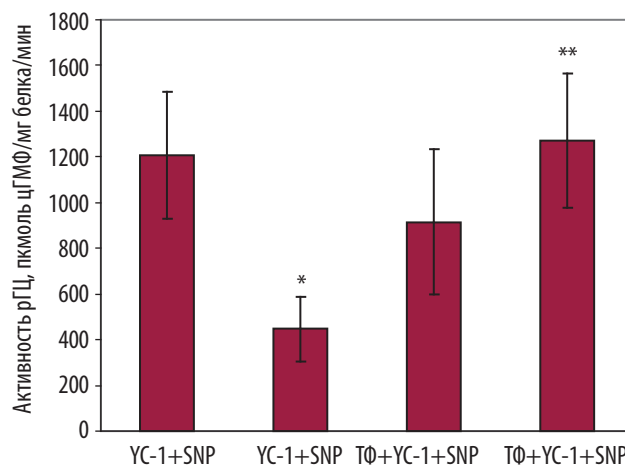
На рис. 3 представлены данные о величине активности рГЦ, индуцированной SNP, YC-1 и их комбинациями с ТФ. Согласно нашим данным, величина активности рГЦ, индуцированная SNP, самостоятельно и в присутствии ТФ практически не изменяется ( $359 \pm 124$  и  $379 \pm 125$  соответственно). Эти данные свидетельствуют о том, что конечный эффект комбинации SNP с ТФ не является суммой вклада обоих препаратов (т. е. не имеет аддитивный характер) и даже снижен на 11 % по сравнению с ожидаемым [столбец (ТФ+SNP)\*]. Снижение эффективности SNP в присутствии ТФ можно объяснить особенностями иона  $Co^{2+}$  в структуре ТФ (фтаलोцианин), который не связан с лигандами [64]. Как полагают,  $Co^{2+}$ , имеющий координационную вакансию, способен захватывать NO (донором которого выступает SNP) и тем самым «убирать» его из среды [65]. Согласно нашим данным, величина активности рГЦ, индуцированная YC-1 в присутствии ТФ, увеличивается в 1,7 раза по сравнению с таковой без ТФ ( $88 \pm 45$  и  $149 \pm 45$  соответственно). При этом реальный эффект активации YC-1 фермента в условиях комбинации с ТФ совпадает с прогнозируемым суммарным вкладом каждого из препаратов [столбец (ТФ+YC-1)\*\*].

Данные, представленные на рис. 4, свидетельствуют, что в наших экспериментах подтверждается известная способность YC-1 потенцировать дальнейшую стимуляцию фермента, исходно индуцированную донором азота, SNP [62] [столбец (YC-1+SNP)].

В этих условиях столбец «суммарный вклад препаратов в активацию фермента» соответствует столбцу [(YC-1+SNP)]. Во же время неожиданно в присутствии ТФ способность YC-1 потенцировать активацию рГЦ оксидом азота снижалась на 33 % [(столбец (ТФ+YC-1+SNP)]. Учитывая, что эффективность активации рГЦ как SNP, так YC-1 в присутствии ТФ не изменяется, можно предположить, что в основе снижения способности YC-1 усиливать эффективность стимуляции рГЦ оксидом азота в присутствии ТФ лежит конкуренция ТФ с YC-1 за связывание с теми сайтами рГЦ-белка, которые отвечают за механизм YC-1-опосредованной сенситизации (увеличение чувствительности) фермента к NO [62].

Таким образом, по нашим данным, в присутствии ТФ эффективность активации рГЦ оксидом азота и YC-1 как по отдельности, так и в комбинации друг с другом не увеличивается. Из этого следует, что в присутствии ТФ дополнительная активация рГЦ природным регулятором NO и «эндогенным» YC-1 [60] на участке рГЦ→цГМФ сигнального пути  $eNOS \rightarrow NO \rightarrow rGC \rightarrow cGMP$  не происходит.

Могут ли в этих условиях вовлекаться другие участники этого сигнального пути, в частности eNOS? Как свидетельствуют данные литературы, регуляция активности eNOS может осуществляться с помощью рецепторов нейромедиаторов, в частности  $\beta$ -адренорецепторов. Так, небиволол, селективный антагонист  $\beta_1$ -адренорецепторов, увеличивает активность eNOS и продукцию NO через соответствующие рецепторы, экспрессированные в клетках эндотелия [66]. По нашим данным, ТФ в опытах *in vitro* конкурирует за связывание с клетками со специфическим антагонистом  $\beta$ -адренорецепторов — дигидроальпренолом [67]. В связи с этим не исключено, что ТФ, будучи антагонистом  $\beta$ -адренорецепторов, способен вмешиваться в регуляцию базального тонуса гладкой мускулатуры сосудов, активируя в эндотелии eNOS.



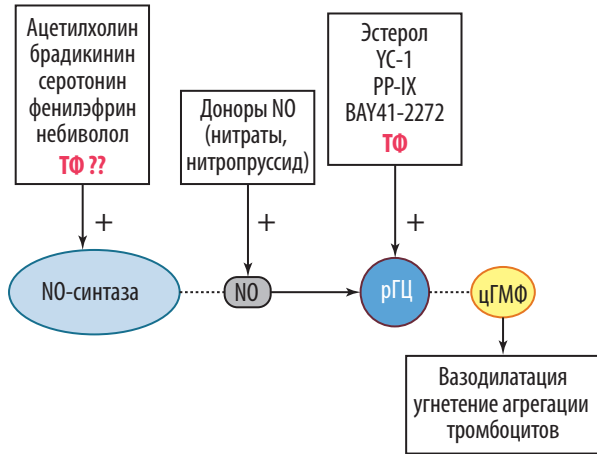
**Рис. 4.** Влияние терафтала (ТФ) на способность YC-1 потенцировать SNP-индуцированную стимуляцию растворимой гуанилатциклазы (рГЦ). По оси абсцисс — варианты комбинированного воздействия препаратов; аддитивный вклад веществ в комбинации отражают столбцы (YC-1+SNP)\* и (ТФ+YC-1+SNP)\*\*.

**Fig. 4.** The effect of teraphtal (ТФ) on the ability of YC-1 to potentiate the SNP-induced stimulation of soluble guanylyl cyclase (pGC). X-axis demonstrates variants of a combined effect of drugs; columns (YC-1+SNP) and (ТФ+YC-1+SNP) reflect the additive contribution of substances in the combination. Data are presented as  $M \pm m$  of three independent experiments

Кроме того, известно, что гипотензивный эффект некоторых неселективных  $\beta$ -блокаторов (лабеталол и карведилол) может осуществляться за счет их способности блокировать постсинаптические  $\alpha_1$ -адренорецепторы [68]. Ранее в наших исследованиях было показано, что ТФ конкурирует с празозином, антагонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов, за связывание с опухолевыми клетками [67]. В связи с этим не исключено, что в гипотензивный эффект, индуцированный ТФ, может вносить вклад и воздействие препарата на систему регуляции сосудов в автономных ганглиях. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о том, что в физиологических тестах вазоконстрикцию, вызванную адреналином, агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов, способны модулировать соединения, близкие по химической структуре к ТФ (витамин  $B_{12}$  и его аналоги) [46] наряду с YC-1 [69].

Таким образом, механизм гипотензивного эффекта, индуцированного ТФ, не ограничивается активацией рГЦ в сигнальном пути  $eNOS \rightarrow NO \rightarrow rGC \rightarrow cGMP$  на участке рГЦ→цГМФ регуляции базального тонуса гладкой мускулатуры сосудов в присутствии препарата. Мы предполагаем, что дополнительный вклад в снижение АД вносит активация препарата eNOS, опосредованная  $\beta$ -адренорецепторами, и блокада постсинаптических  $\alpha_1$ -адренорецепторов в автономных ганглиях.

Агонисты (ацетилхолин, брадикинин, серотонин [71] и фенилэфрин [72]), антагонист  $\beta$ -адренорецепторов небиволол [66] усиливают продукцию NO путем активации NO-синтазы. Доноры NO (нитроглицерин, нитропруссид, ингаляционный NO), гормон эстетрол [73], YC-1, PPIX, BAУ 41-2272, ТФ активируют рГЦ, увеличивая синтез вторичного мессенджера — цГМФ. Активация цГМФ-зависимых протеинкиназ и ионных каналов вызывает физиологические эффекты: гипотензивный, антиагрегантный.



**Рис. 5.** Стимуляторы сигнального пути eNOS→NO→pGC→цГМФ (модифицированный фрагмент схемы, цит. по [70])  
NO — оксид азота; pGC — растворимая гуанилатциклаза; ТФ — терафтал; цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат.

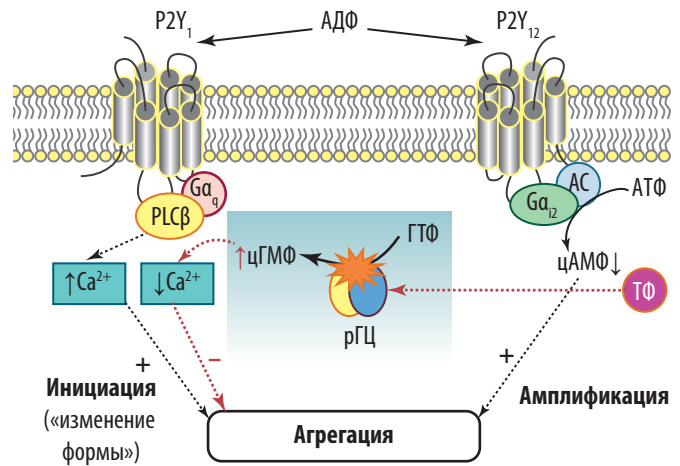
**Fig. 5.** Stimulators of the eNOS→NO→sGC→cGMP signaling pathway (modified fragment of the scheme, cited according to [70])  
NO — nitrogen oxide; pGC — soluble guanylyl cyclase; ТФ — teraphthal; цГМФ — cyclic guanosine monophosphate.

В заключение этого раздела следует отметить, что ТФ, пополняя ряды регуляторов pGC [74] (рис. 5), представляет интерес для исследователей. Это в первую очередь связано с тем, что, будучи прямым активатором pGC и не вмешиваясь в механизм активации pGC оксидом азота и YC-1, он оказался препаратом, в присутствии которого способность YC-1 потенцировать активацию фермента NO существенно (на 30 %) снижается. Принимая во внимание гипотезу об «эндогенном» аналоге YC-1 [57], можно предположить существование природных ТФ-подобных модуляторов pGC, которые защищают фермент от чрезмерной активации NO в присутствии «эндогенного» YC-1.

#### Влияние терафтала на агрегацию тромбоцитов человека

В настоящее время известно, что активаторы pGC реализуют свой антиагрегантный эффект через увеличение концентрации цГМФ в тромбоцитах [75].

Поскольку ТФ, по нашим данным, оказался прямым активатором pGC, мы предположили, что антиагрегантные свойства этого препарата также связаны с активацией pGC в тромбоцитах с участием сигнальных путей физиологических регуляторов гемостаза (АДФ, коллагена, тромбина). Известно, что АДФ (нуклеотид) играет ключевую роль в процессах гемостаза (инициации и развитии тромбоза) в артериальном русле. Сам по себе АДФ является слабым индуктором агрегации тромбоцитов и вызывает только обратимые реакции, включая изменение формы тромбоцитов, по сравнению с сильными стимуляторами или «агонистами» типа тромбина и коллагена. Однако резкое повышение концентрации АДФ в плазме вследствие выброса нуклеотида из специфических гранул активированных тромбоцитов и разрушенных эритроцитов приводит к тому, что АДФ становится важным, так называемым вторичным агонистом, который усиливает многие реакции тромбоцитов и вносит вклад в развитие тромбоза. На рис. 6 представлены внутриклеточные сигнальные пути, включение которых



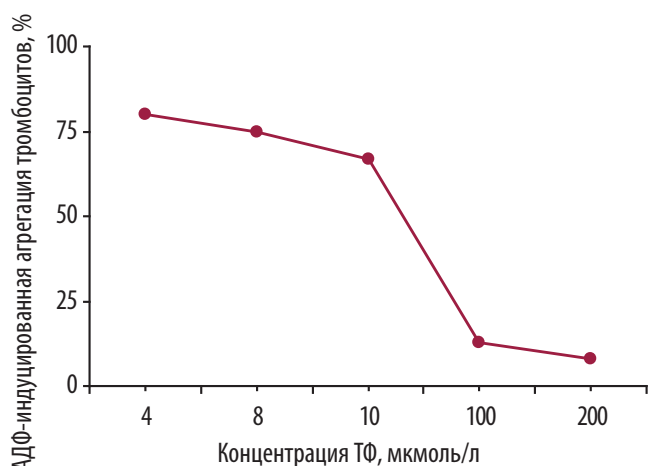
**Рис. 6.** Сигнальный путь, запускаемый АДФ через пуриновые рецепторы в тромбоцитах человека, и его участники. цГМФ-зависимый механизм антиагрегантного эффекта терафтала  
AC — аденилатциклаза; PLCβ — фосфолипаза C β; АДФ — аденозиндифосфат; АТФ — аденозинтрифосфат; ГТФ — гуанозинтрифосфат; pGC — растворимая гуанилатциклаза; ТФ — терафтал; цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат.

**Fig. 6.** Signaling pathways triggered by ADP via purine receptors in human platelets and its participants. cGMP-dependent mechanism of the antiaggregatory effect of teraphthal  
AC — adenylyl cyclase; PLCβ — phospholipase C beta; АДФ — adenosine diphosphate; АТФ — adenosine triphosphate; ГТФ — guanosine triphosphate; pGC — soluble guanylyl cyclase; ТФ — teraphthal; цГМФ — cyclic guanosine monophosphate.

необходимо для агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ [76]. Процесс активации тромбоцитов начинается со взаимодействия АДФ с мембранными рецепторами пуриновых нуклеотидов семейства P2 двух типов (P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub>), которые, в свою очередь, сцеплены внутри клетки с G-белками, принадлежащими к классам G<sub>αq</sub> и G<sub>αi2</sub> соответственно. Сигнальный путь, запускаемый АДФ через пуриновые рецепторы в тромбоцитах, и его участники представлены на рис. 6.

Взаимодействие АДФ с рецепторами P2Y<sub>1</sub> (см. рис. 6, слева) приводит к последующей активации G<sub>αq</sub> и фосфолипазы C β (PLCβ) и завершается мобилизацией ионов Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточного депо и увеличением их внутриклеточной концентрации. Функциональный ответ клетки на эти события проявляется в изменении поверхности тромбоцитов, которое способствует слабой, транзитной их агрегации.

Сигнальный путь P2Y<sub>1</sub>→G<sub>αq</sub>→PLCβ→[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> абсолютно необходим для начальных этапов агрегации (обратимая фаза) тромбоцитов, индуцированной АДФ, но недостаточен для полноценной агрегации. Необратимая фаза обеспечивается активацией в присутствии АДФ второго сигнального пути P2Y<sub>12</sub>→G<sub>αi2</sub>→AC→цАМФ, в котором участвуют рецепторы P2Y<sub>12</sub> и их партнеры в клетке, ингибиторные G-белки класса G<sub>αi2</sub> (см. рис. 6, справа). Активация этих белков приводит к угнетению активности аденилатциклазы (AC) и снижению уровня внутриклеточной концентрации цАМФ с последующим угнетением (вследствие дефосфорилирования) белков цитоскелета, участвующих в поддержании формы клеток. Таким образом, одновременная активация АДФ двух сигнальных путей создает биохимические условия (высокий уровень ионов Ca<sup>2+</sup> и низкий уровень цАМФ), необходимые и достаточные для полноценной агрегации тромбоцитов [76].



**Рис. 7.** Влияние терафтала (ТФ) на агрегацию тромбоцитов, индуцированную аденозиндифосфатом (АДФ). Данные представлены в виде средней величины торможения агрегации (в %) тромбоцитов 2 доноров

**Fig. 7.** The effect of teraphthal (ТФ) on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (АДФ). Data are presented as a mean percentage of aggregation inhibition in platelets of 2 donors

С целью выяснить, участвуют ли сигнальные пути АДФ в антиагрегантном эффекте ТФ, мы исследовали влияние препарата на агрегацию тромбоцитов, индуцированную нуклеотидом.

Согласно нашим данным, представленным на рис. 7, в условиях предварительной инкубации (1 мин) тромбоцитов с ТФ в диапазоне концентраций препарата 4–200 мкмоль/л агрегация тромбоцитов, вызванная АДФ, угнетается вплоть до 92 %, величина  $IC_{50}$  для ТФ равна 15 мкмоль/л. В этих же условиях максимальная эффективность ингибирования агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, донором оксида азота SNP (100 мкмоль/л) достигает 79 %. Выявленная способность ТФ тормозить индукцию агрегации тромбоцитов АДФ подтверждает наличие у препарата антиагрегантного свойства, а также предполагает участие сигнальных путей АДФ в его реализации.

На рис. 6 (центральная часть) представлен возможный сценарий вмешательства ТФ в АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. ТФ, будучи активатором рГЦ, способствует увеличению концентрации цГМФ с последующим снижением внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , в результате чего снижается способность АДФ индуцировать агрегацию тромбоцитов с участием сигнального пути  $P2Y_1 \rightarrow G\alpha_q \rightarrow PLC\beta \rightarrow [Ca^{2+}]_i$ . Описанные выше события отражают цГМФ-зависимый механизм антиагрегантного эффекта ТФ. Могут ли существовать дополнительные, цГМФ-независимые пути влияния ТФ на гемостаз? Ранее мы установили, что в опухолевых клетках в присутствии ТФ увеличивается концентрация цАМФ [67]. Не исключено, что аналогичные изменения внутриклеточного уровня цАМФ происходят при воздействии ТФ на тромбоциты. Тогда в присутствии ТФ эффективность прохождения сигнала и через второй сигнальный путь  $P2Y_{12} \rightarrow G\alpha_{12} \rightarrow AC \rightarrow цАМФ$ , запускаемый АДФ для закрепления агрегации, будет снижаться (см. рис. 6, справа). Согласно данным литературы, для многих регуляторов рГЦ известен двойной (цГМФ-зависимый и цГМФ-независимый) механизм их антиагрегантного действия [77].

Таким образом, по нашим данным, антиагрегантные свойства ТФ связаны с активацией рГЦ в тромбоцитах и вовлечением цГМФ в регуляцию физиологического сигнального пути  $P2Y_1 \rightarrow G\alpha_q \rightarrow PLC\beta \rightarrow [Ca^{2+}]_i$ , контролирующего агрегантные свойства тромбоцитов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в механизме гипотензивного и антиагрегантного эффектов, индуцированных ТФ у животных и человека, лежит способность препарата вызывать активацию рГЦ внутриклеточного белка-фермента и ее цГМФ-зависимого сигнального пути регуляции базального тонуса гладкой мускулатуры сосудов и гемостаза. В развитии гемодинамических эффектов, вызванных ТФ, мы предполагаем участие дополнительных механизмов, не зависящих от концентрации цГМФ в клетке.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. при финансовой поддержке Правительства Москвы.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Т.А. Сидорова, И.С. Северина.  
**Сбор и обработка данных:** Т.А. Сидорова, И.С. Северина, Н.В. Пятакова.  
**Предоставление материалов исследования:** О.Л. Каляя, Н.В. Пятакова, Т.А. Сидорова.  
**Анализ и интерпретация данных:** Т.А. Сидорова, И.С. Северина.  
**Подготовка рукописи:** Т.А. Сидорова, И.С. Северина, О.Л. Каляя.  
**Окончательное одобрение рукописи:** все авторы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yeh EH, Tong AT, Lenihan DJ, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation*. 2004;109(25):3122–31. doi: 10.1161/01.cir.0000133187.74800.b9.
2. Lundin J, Kimby E, Bjorkholm M, et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2002;100(3):768–73. doi: 10.1182/blood-2002-01-0159.
3. Onrust SV, Lamb HM, Balfour JA. Rituximab. *Drugs*. 1999;58(1):79–88. doi: 10.2165/00003495-199958010-00009.
4. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004;22(7):1201–8. doi: 10.1200/jco.2004.10.182.
5. White RL, Schwartzenuber DJ, Guleria A, et al. Cardiopulmonary toxicity of treatment with high dose interleukin-2 in 199 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *Cancer*. 1994;74(12):3212–22. doi: 10.1002/1097-0142(19941215)74:12<3212::aid-cnrc2820741221>3.0.co;2-i.
6. Vial T, Descotes J. Immune-mediated side-effects of cytokines in humans. *Toxicology*. 1995;105(1):31–57. doi: 10.1016/0300-483x(95)03124-x.
7. Cohen MH, Broder LE, Fossieck BE, et al. Phase II clinical trial of weekly administration of VP-16-213 in small cell bronchogenic carcinoma. *Cancer Treat Rep*. 1977;61(3):489–90.
8. Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, et al. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol*. 1990;8(7):1263–8.



9. DiBella NJ. Vincristine-induced orthostatic hypotension: a prospective clinical study. *Cancer Treat Rep.* 1980;64(2-3):359-60.
10. Zhu GD, Gandhi VB, Gong J, et al. Syntheses of potent, selective, and orally bioavailable indazole-pyridine series of protein kinase B/Akt inhibitors with reduced hypotension. *J Med Chem.* 2007;50(13):2990-3003. doi: 10.1021/jm0701019.
11. Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2002;20(22):4420-7. doi: 10.1200/jco.2002.01.133.
12. Legha SS, Keating M, Pickett S, et al. Phase I clinical investigation of homoharringtonine. *Cancer Treat Rep.* 1984;68(9):1085-91.
13. Siderov J, Prasad P, De Boer R, Desai J. Safe administration of etoposide phosphate after hypersensitivity reaction to intravenous etoposide. *Br J Cancer.* 2002;86(1):12-3. doi: 10.1038/sj.bjc.6600003.
14. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A, Cremphor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer.* 2001;37(13):1590-8. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00171-x.
15. Itoch Y, Sendo T, Hirakawa T, et al. Role of sensory nerve peptides rather than mast cell histamine in paclitaxel hypersensitivity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(1):113-9. doi: 10.1164/rccm.200307-901oc.
16. Carmichael SM, Eagleton L, Ayers CR. Orthostatic hypotension during vincristine therapy. *Arch Intern Med.* 1970;126(2):290-3. doi: 10.1001/archinte.1970.00310080096015.
17. Renninger JP, Murphy DJ, Morel DW. A selective Akt inhibitor produces hypotension and bradycardia in conscious rats due to inhibition of the autonomic nervous system. *Toxicol Sci.* 2012;125(2):578-85. doi: 10.1093/toxsci/kfr316.
18. Akosman C, Ordu C, Eroglu E, Oyan B. Development of Acute Pulmonary Hypertension After Bortezomib Treatment in a Patient With Multiple Myeloma: A Case Report and the Review of the Literature. *Am J Ther.* 2013;22(3):e88-92. doi: 10.1097/01.mjt.0000433941.91996.5f.
19. Richardson PG, Mitsiades C, Hideschima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57(1):33-47. doi: 10.1146/annurev.med.57.042905.122625.
20. Savaraj N, Lu K, Feun LG, et al. Interaction of [<sup>3</sup>H] homoharringtonine (HHT) with the calcium antagonist receptor in the rat. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1985;26:1417.
21. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, et al. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(2):350-4. doi: 10.1042/bst0320350.
22. Yeh ET. Cardiotoxicity induced by chemotherapy and antibody therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57(1):485-98. doi: 10.1146/annurev.med.57.121304.131240.
23. Senkus E, Jassem J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(4):300-11. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.11.001.
24. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(5):427-34. doi: 10.1056/nejmoa021491.
25. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):843-50.
26. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356(2):115-24. doi: 10.1056/nejmoa065044.
27. Gupta R, Maitland ML. Sunitinib, Hypertension, and Heart Failure: A Model for Kinase Inhibitor-Mediated Cardiotoxicity. *Curr Hypertens Rep.* 2011;13(6):430-5. doi: 10.1007/s11906-011-0229-4.
28. Rini BI, Cohen DP, Lu DR, et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(9):763-73. doi: 10.1093/jnci/djr128.
29. Mourad JJ, Levy BI. Mechanisms of antiangiogenic-induced arterial hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2011;13(4):289-93. doi: 10.1007/s11906-011-0206-y.
30. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1788-95. doi: 10.1038/sj.bjc.6603813.
31. Aparicio-Gallego G, Afonso-Afonso FJ, Leon-Mateos L, et al. Molecular basis of hypertension side effects induced by sunitinib. *Anticancer Drugs.* 2011;22(1):1-8. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283403806.
32. Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. *Hypertension.* 2009;54(3):652-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.129973.
33. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359-71. doi: 10.1038/nrm1911.
34. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep.* 1999;19:51-71.
35. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411(2-3):334-50. doi: 10.1016/s0005-2728(99)00024-9.
36. Daher IN, Yeh ET. Vascular complications of selected cancer therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(12):797-805. doi: 10.1038/ncp-cardio1375.
37. Aharon IB, Joseph HB, Tzabari M, et al. Doxorubicin-induced vascular toxicity –targeting potential pathways may reduce procoagulant activity. *PLoS One.* 2013;8(9):e75157. doi: 10.1371/journal.pone.0075157.
38. Togna GI, Togna AR, Franconi M, Caprino L. Cisplatin Triggers Platelet Activation. *Thromb Res.* 2000;99(5):503-9. doi: 10.1016/s0049-3848(00)00294-2.
39. Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(24):2231-47. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.050.
40. Martin JF, Greaves M. Vincristine inhibits the synthesis of malondialdehyde by human platelets in vitro. *Cancer.* 1982;49(4):665-8. doi: 10.1002/1097-0142(19820215)49:4<665::aid-cnrcr2820490413>3.0.co;2-y.
41. Lee JJ, Yu JY, Lee JH, et al. The protective effects of paclitaxel on platelet aggregation through the inhibition of thromboxane A2 synthase. *Arch Pharm Res.* 2010;33(3):387-94. doi: 10.1007/s12272-010-0307-1.
42. Ермакова Н.П., Михайлова Л.М., Трифонов А.И. и др. Влияние терафталя и бинарной каталитической системы «Терафтал+аскорбиновая кислота» на артериальное давление. *Российский биотерапевтический журнал.* 2006;5(1):14.  
[Ermakova NP, Mikhailova LM, Trifonov AI, et al. Effect of teraphthal and binary catalytic system "Teraphthal+ascorbic acid" on blood pressure. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal.* 2006;5(1):14. (In Russ)]
43. Маджуга А.В., Ермакова Н.П., Членова Е.Л. и др. Влияние терафталя на гемостаз животных. *Вопросы онкологии.* 2001;47(6):715-7.  
[Madzhuga AV, Ermakova NP, Chlenova EL, et al. Effect of teraphthal-lio on animals' hemostasis. *Voprosy onkologii.* 2001;47(6):715-7. (In Russ)]
44. Манзюк Л.В., Бредер В.В., Гершанович М.Л. и др. Результаты I-II фазы клинических испытаний каталитической системы «Терафтал+аскорбиновая кислота». *Российский биотерапевтический журнал* 2005;4(1):105-7.  
[Manzyuk LV, Breder VV, Gershanovich ML, et al. Results of Phase I-II clinical trials of catalytic system "Teraphthal+ascorbic acid". *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal.* 2005;4(1):105-7. (In Russ)]
45. Mingone CJ, Gupte SA, Chow JL, et al. Protoporphyrin IX generation from delta-aminolevulinic acid elicits pulmonary artery relaxation and soluble guanylate cyclase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(3):L337-44. doi: 10.1152/ajplung.00482.2005.
46. Sharina I, Sobolevsky M, Doursout MF, et al. Coinamides are novel coactivators of oxide receptor that target soluble guanylyl cyclase catalytic domain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(3):723-32. doi: 10.1124/jpet.111.186957.
47. Martin E, Sharina I, Liang YY, Doursout MF. Corrin-mediated activation of nitric oxide receptor and its cardiovascular consequences. *Circulation.* 2009;120:S1072. Abstract 5218.
48. Чирков Ю.Ю., Тышук И.А., Белишкина Н.Н., Северина И.С. Гуанилатциклаза тромбоцитов крови человека. *Биохимия.* 1987;52(6):956-63.  
[Chirkov YuYu, Tyshchuk IA, Belushkina NN, Severina IS. Guanylyl cyclase of human platelets. *Biokhimiya.* 1987;52(6):956-63. (In Russ)]
49. Garbers DL, Murad F. Guanylate cyclase assay methods. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1979;10:57-67.
50. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194(4832):927-9. doi: 10.1038/194927b0.
51. Bellamy TC, Garthwaite J. The receptor-like properties of nitric oxide-activated soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Mol Cell Biochem.* 2002;230(1-2):165-76.
52. Gibb B, Wykes V, Garthwaite J. Properties of NO-activated guanylyl cyclases expressed in cells. *Br J Pharmacol.* 2003;139(5):1032-40. doi: 10.1038/sj.bjp.0705318.
53. Proinsias K, Gryko DT, Hissaeda Y, et al. Vitamin B<sub>12</sub> derivatives as activators of soluble guanylyl cyclase. *J Med Chem.* 2012;55(20):8943-7. doi: 10.1021/jm3006959.
54. Bindslev N. A homotropic two-state model and auto-antagonism. *BMC Pharmacol.* 2004;4(1):11. doi: 10.1186/1471-2210-4-11.
55. Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;9:2870-3. doi: 10.1073/pnas.79.9.2870.
56. Ko FN, Wu CC, Kuo SC, et al. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood.* 1994;84(12):4226-33.
57. Chun YS, Yeo EJ, Park JW. Versatile pharmacological actions of YC-1: anti-platelet to anticancer. *Cancer Lett.* 2004;207(1):1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2004.01.005.
58. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52(3):352-7. doi: 10.1161/01.res.52.3.352.
59. Herman MA, Webber J, Fromm D, Kessel D. Hemodynamic effects of 5-aminolevulinic acid in humans. *J Photochem Photobiol B.* 1998;43(1):61-5. doi: 10.1016/s1011-1344(98)00086-4.
60. Chung IW, Eljamel S. Risk factors for developing oral 5-aminolevulinic acid-induced side effects in patients undergoing fluorescence guided resection. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2013;10(4):362-7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.03.007.
61. Rothermund L, Friebe A, Paul M, et al. Acute blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2000;130(2):205-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0703320.
62. Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, et al. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol.* 1998;54(6):962-7.
63. Severina IS. Nitric oxide. Potentiation of NO-dependent activation of soluble guanylate cyclase – (patho)physiological and pharmacotherapeutical significance. *Biomed Khim.* 2007;53(4):385-99.

64. Герасимова Г.К., Якубовская Р.И., Панкратов А.А. и др. Бинарная каталитическая терапия — новый подход к лечению злокачественных опухолей. Результаты доклинических и клинических исследований. Российский химический журнал. 2013;LVII(2):69–82.  
[Gerasimova GK, Yakubovskaya RI, Pankratov AA, et al. Binary catalytic therapy: new approach to treatment of malignancies. Results of pre-clinical and clinical studies. Rossiiskii khimicheskii zhurnal. 2013;LVII(2):69–82. (In Russ)]
65. Broderick KE, Singh V, Zhuang S, et al. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. *J Biol Chem*. 2005;280(10):8678–85. doi: 10.1074/jbc.m410498200.
66. Ignarro LJ. Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebulolol, a third-generation beta-blocker. *Blood Press*. 2004;13(Suppl 1):2–16. doi: 10.1080/08038020410016557.
67. Герасимова Г.К., Сидорова Т.А., Солнцева Т.И. и др. Бинарная каталитическая терапия — новый подход к контролю роста опухолевых клеток с помощью высокореактивных радикалов кислорода. Российский биотерапевтический журнал. 2006;5(3):98–105.  
[Gerasimova GK, Sidorova TA, Solntseva TI, et al. Binary catalytic therapy – a new approach to control of malignant tumors growth by reactive oxygen species. Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal. 2006;5(3):98–105. (In Russ)]
68. Rosendorff C. Beta-blocking agents with vasodilator activity (Short Survey). *J Hypertens*. 1993;11(Suppl 4):S37–40. doi: 10.1097/00004872-199306003-00009.
69. Seitz S, Wegener JW, Rupp J, et al. Involvement of K(+) channels in the relaxant effects of YC-1 in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1999;382(1):11–8. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00574-9.
70. Boerrigter G, Burnett JC Jr. Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25(1):30–45. doi: 10.1111/j.1527-3466.2007.00003.x.
71. Hardman JG, Davis JW, Sutherland EW. Effects of some hormonal and other factors on the excretion of guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate in rat urine. *J Biol Chem*. 1969;244(23):6354–62.
72. Silva BR, Pernomian L, Grando MD, Bendhack LM. Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2014;738:192–9. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.05.040.
73. Hilgers RHP, Oparil S, Wouters W, Coeligh Bennink HJT. Vasorelaxing effects of estetrol in rat arteries. *J Endocrinol*. 2012;215(1):97–106. doi: 10.1530/JOE-12-0009.
74. Nossaman B, Pankey E, Kadowitz P. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: review and potential therapeutic indications. *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:290805. doi: 10.1155/2012/290805.
75. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, et al. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*. 1981;57(5):946–55.
76. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*. 2008;99(3):466–72. doi: 10.1160/TH07-11-0673.
77. Roger S, Badier-Commander C, Paysant J, et al. The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 2010;161(5):1044–58. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00943.x.

