

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

АНТИАГРЕГАЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ 2-МОРФОЛИНО-5-(ТИЕНИЛ-2)-6Н-1,3,4-ТИАДИАЗИН ГИДРОБРОМИДА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO* И *EX VIVO*

Ю. С. Логвинова¹, В. А. Макаров¹, О. Н. Чупахин², Л. П. Сидорова²,
Н. М. Перова², В. Л. Русинов²

Исследовано влияние 2-морфолино-5-(тиенил-2)-6Н-1,3,4-тиадиазина (Н-29) на агрегацию тромбоцитов в экспериментах на донорской плазме *in vitro*. Тромбоцитарное взаимодействие снижалось при индукции как АДФ, так и арахидоновой кислотой. Исследовалось влияние данного соединения в опытах *ex vivo* при введении в вену и внутрь на агрегацию тромбоцитов и некоторые параметры плазменного гемостаза.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов; 1,3,4-тиадиазины

ВВЕДЕНИЕ

Агрегация тромбоцитов играет ведущую роль в физиологии и патологии гемостаза. Образованный из агрегированных клеток тромб, часть которого составляют тромбоциты, является основным фактором возникновения заболеваний, связанных с нарушением кровообращения (инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоэмболии различной локализации) [1]. Поэтому фармакологическая модуляция агрегационной активности тромбоцитов является одним из ведущих направлений в коррекции нарушений системы гемостаза.

В настоящее время существует большое количество препаратов, снижающих агрегацию тромбоцитов. Но эти средства обладают рядом недостатков: множественные побочные эффекты, низкая избирательность действия некоторых из них, неоднозначность влияния на способность тромбоцитов к агрегации и антиагрегационную активность сосудистой стенки, а также ограничения, обусловленные низкой стабильностью при хранении.

Соединения, принадлежащие к классу 1,3,4-тиадиазинов, обладают широким спектром действия [9, 10]. Описаны противовирусные, антибактериальные, противогрибковые, противовоспалительные, антиоксидантные и сосудорасширяющие свойства различных представителей данного класса веществ [2 – 8, 11]. Выявлено антиагрегантное действие некоторых 1,3,4-тиадиазинов. Так, 2-нитрозоимино-3,6-дигид-

ро-2Н-1,3,4-тиадиазины снижают агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном, а производные пиразино[2,3-с][1, 2, 6]тиадиазин 2,2 диоксида незначительно снижают агрегацию тромбоцитов человека и кроликов, индуцированную АДФ и арахидоновой кислотой [1, 3]. Поэтому класс тиадиазинов представляет интерес для дальнейшего исследования и поиска новых соединений, действующих на различные пути активации и агрегации тромбоцитов. Целенаправленный синтез веществ может значительно увеличить эффективность и избирательность их действия.

Целью настоящей работы было изучение влияния нового соединения класса тиадиазинов на агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *ex vivo*, а также на параметры плазменного гемостаза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе изучено влияние 2-морфолино-5-(тиенил-2)-6Н-1,3,4-тиадиазина (Н-29) на агрегацию тромбоцитов в опытах *in vitro* и *ex vivo*, а также на параметры плазменного гемостаза.

Соединение синтезировано сотрудниками кафедры органической химии Уральского федерального университета им. первого Президента России Б. Н. Ельцина (Екатеринбург). Рабочие растворы исследуемого соединения готовили путем их разведения в дистиллированной воде (для экспериментов на донорской плазме и для введения животным внутрь) или в физиологическом растворе (для внутривенного введения экспериментальным животным).

Эксперименты по изучению влияния Н-29 на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* проводили на венозной крови здоровых доноров ($n = 5$), которую получали путем пункции локтевой вены и стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1.

¹ Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (зав. — проф. В. А. Макаров) ФГБУ “Гематологический научный центр” Минздрава РФ, 125167, Москва, Нов. Зыковский пр., 4а; E-mail: yuliya8405@mail.ru

² Кафедра органической химии (зав. — акад. РАН О. Н. Чупахин) Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, E-mail: vlapp@isnet.ru

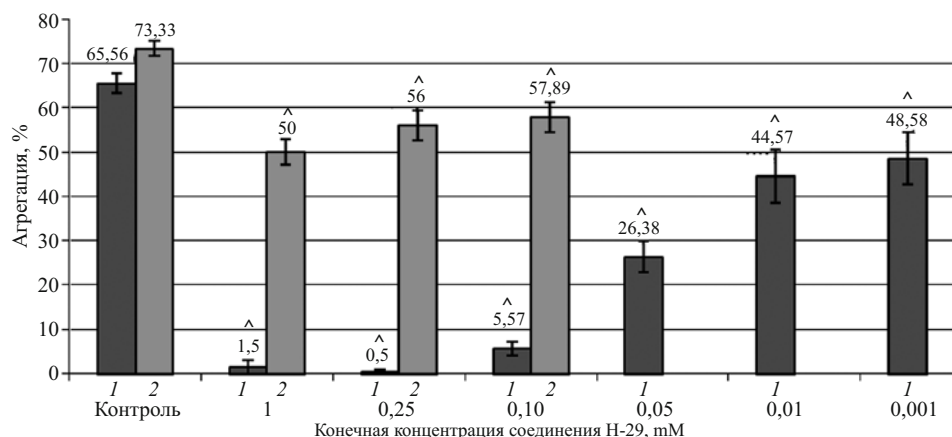


Рис. 1. Влияние H-29 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ (1) и арахидоновой кислотой (2) в опытах *in vitro*.

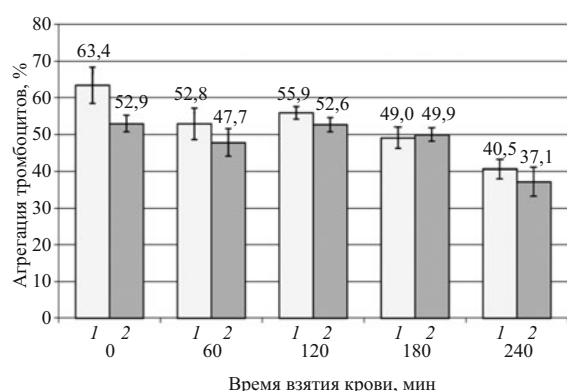


Рис. 2. Влияние H-29 в дозе 20 мг/кг на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ (1) и арахидоновой кислотой (2) в опытах *ex vivo*.

Объектом исследования в экспериментах являлась богатая тромбоцитами плазма. Для её приготовления кровь донора, содержащую 3,8 % раствор цитрата натрия, центрифугировали в пластиковой пробирке в течение 10 мин при 1000 об/мин. Полученный верхний слой плазмы отбирали. Остаток повторно центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин для получения бедной

тромбоцитами плазмы, которую использовали в качестве оптического контроля.

В экспериментах по изучению влияния H-29 на агрегацию тромбоцитов *ex vivo* и параметры плазменного гемостаза использовали кроликов ($n = 12$) массой 3 – 4,6 кг. Кровь для исследования собирали методом свободного падения капель. Для этого делали разрез краевой вены уха и собирали кровь в пластиковую пробирку, содержащую 3,8 % раствор цитрата натрия.

Исследуемое вещество вводили в краевую вену уха в дозах 10 и 20 мг/кг, а также внутрь в дозе 100 мг/кг. Пробы крови забирали до введения вещества (использовали как контроль), через 1, 2, 3 и 4 ч после введения.

В работе были использованы методы оценки функциональной активности тромбоцитов (оценка степени агрегации) и состояния плазменного гемостаза (определение активированного частичного тромбопластинного времени, протромбинового времени, тромбинового времени, концентрации фибриногена и числа тромбоцитов).

Агрегацию тромбоцитов изучали методом светорассеяния, предложенным G. Vorn на агрегометрах фирмы “CHRONO-LOG CORPORATION” (США) и

Таблица 1. Влияние H-29 при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг на агрегацию тромбоцитов *ex vivo* и параметры плазменного гемостаза

Параметр	До введения (контроль)	Через 1 ч после введения	Через 2 ч после введения	Через 3 ч после введения	Через 4 ч после введения
Агрегация тромбоцитов, %					
АДФ $1 \cdot 10^{-5}$ М	65,0 ± 2,4	57,5 ± 2,4*	51,7 ± 3,6*	48,5 ± 3,5*	55,6 ± 2,4*
Агрегация тромбоцитов, %	67,1 ± 1,6	58,0 ± 4,2	55,6 ± 4,9	55,9 ± 4,6	53,1 ± 3,2*
АК $1 \cdot 10^{-3}$ М					
Число тромбоцитов, %	100	91,3 ± 7,8	87,5 ± 5,1*	97,7 ± 7,4	108,0 ± 5,5
АЧТВ, с	14,9 ± 1,5	13,8 ± 0,9	15,7 ± 1,0	13,2 ± 0,4	13,4 ± 0,3
Протромбиновое время, с	10,2 ± 0,8	10,4 ± 0,6	10,3 ± 0,4	9,8 ± 0,3	9,7 ± 0,2
Тромбиновое время, с	12,0 ± 0,2	12,5 ± 0,4	13,3 ± 0,3	13,2 ± 0,7	13,0 ± 0,5
Концентрация фибриногена, г/л	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1

* — достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$).

“BIOLA” (Россия) [5]. Агрегацию вызывали путем добавления проагрегантов в кювету с богатой тромбоцитами плазмой. В качестве проагрегантов использовали АДФ (“Boehringer Mannheim”, Австрия) в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М и арахидоновую кислоту в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М. Арахидоновая кислота (АК), свободная от продуктов окисления, была предоставлена сотрудниками лаборатории оксипинов (зав. — В. В. Безуглов) Института биоорганической химии РАН.

О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции (A_{\max}) по сравнению с исходной величиной.

Оценку параметров плазменного гемостаза проводили на коагулометре Минилаб-701М (“Юнимед”, Россия).

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) определяли с использованием набора “АЧТВ-тест” (НПО “Ренам”, Россия), протромбинового времени по методу А. Quick с использованием набора “Техпластин-тест”, тромбинового времени — с использованием набора “Тромбо-тест”, оценку концентрации фибриногена проводили по методу А. Clauss с использованием набора “Тех-фибриноген-тест” (“Технология Стандарт”, Россия).

Число тромбоцитов определяли оптическим методом, предложенным В. Walkowiak и соавт. на спектрофотометре фирмы “Аквилон” (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Соединение Н-29 не обладало способностью индуцировать агрегацию тромбоцитов *in vitro*. Изученный 1,3,4-тиадиазин ингибировал АДФ- и АК-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Полученные результаты показаны на рис. 1.

В случае АДФ-индуцированной агрегации вещество достоверно ингибировало тромбоцитарное взаимодействие в 1,3 – 1,5 раза в конечных концентрациях 0,1 мМ – 1 мМ.

При индукции арахидоновой кислотой в концентрации 0,05 мМ соединение уменьшало тромбоцитарную

агрегацию практически в 2,5 раза по сравнению с исходным уровнем. Достоверное антиагрегационное действие вещества проявлялось и при его применении в более низких концентрациях (0,001 мМ – 0,01 мМ). При этом тромбоцитарная активность оставалась сниженной в 1,3 – 1,5 раза.

Влияние Н-29 на агрегацию тромбоцитов и параметры плазменного гемостаза исследовали при введении в вену в дозах 10 и 20 мг/кг и внутрь в дозе 100 мг/кг.

При внутривенном введении Н-29 в краевую вену уха кролика способность тромбоцитов к АДФ-индуцированной агрегации достоверно снижалась во всех временных интервалах взятия крови. Максимальный ингибирующий эффект достигался через 180 мин после введения тиадиазина и составлял $48,5 \pm 3,5$ %, что в 1,3 раза ниже исходных данных (табл. 1).

При индукции агрегации АК наблюдались следующие изменения. Спустя 240 мин способность клеток к агрегации снижалась в 1,3 раза. Таким образом, ингибирование агрегации усиливалось через 4 ч после введения вещества.

Среди параметров плазменного гемостаза достоверно снижалось только число тромбоцитов на 120-й минуте эксперимента (в 1,2 раза). К 180-й минуте этот показатель пришел к исходному значению.

Результаты исследования антиагрегационных свойств Н-29 при его внутривенном введении в дозе 20 мг/кг показаны на рис. 2. При внутривенном введении Н-29 в дозе 20 мг/кг способность тромбоцитов к АДФ-индуцированной агрегации достоверно понижалась через 60 – 240 мин после инъекции. Максимальный ингибирующий эффект достигался на 240-й минуте. При этом агрегация падала практически в 1,6 раза по сравнению с исходными данными.

При индукции агрегации АК максимальный антиагрегационный эффект наблюдался спустя 240 мин. Способность клеток к агрегации снижалась в 1,4 раза по сравнению с контролем.

Параметры плазменного гемостаза не изменялись на протяжении всего эксперимента.

Таблица 2. Влияние Н-29 при введении внутрь в дозе 100 мг/кг на агрегацию тромбоцитов *ex vivo* и параметры плазменного гемостаза

Параметр	До введения (контроль)	Через 1 ч после введения	Через 2 ч после введения	Через 3 ч после введения	Через 4 ч после введения
Агрегация тромбоцитов, % АДФ $1 \cdot 10^{-5}$ М	$54,0 \pm 2,4$	$51,7 \pm 2,0$	$48,7 \pm 2,0$	$48,3 \pm 1,9$	$43,7 \pm 2,2^*$
Агрегация тромбоцитов, % АК $1 \cdot 10^{-3}$ М	$54,1 \pm 3,7$	$51,0 \pm 3,4$	$54,2 \pm 2,7$	$56,7 \pm 1,4$	$48,5 \pm 2,3$
Число тромбоцитов, %	100	$105,1 \pm 11,5$	$100,2 \pm 6,7$	$108,4 \pm 15,5$	$104,3 \pm 16,5$
АЧТВ, с	$18,7 \pm 0,5$	$18,3 \pm 0,5$	$17,0 \pm 0,6$	$17,3 \pm 0,5$	$17,2 \pm 0,8$
Протромбиновое время, с	$9,7 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,2$
Тромбиновое время, с	$14,2 \pm 0,2$	$13,5 \pm 0,5$	$14,2 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,4$	$13,8 \pm 0,5$
Концентрация фибриногена, г/л	$3,9 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,2$

* — достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Способность снижать функциональную активность тромбоцитов *ex vivo* H-29 при введении внутрь в дозе 100 мг/кг представлена в табл. 2.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что введение кроликам внутрь тиадиазина H-29 в дозе 100 мг/кг приводило к достоверному снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов через 240 мин в 1,2 раза. Однако такое ингибирование агрегации является клинически незначимым. Достоверное снижение агрегации тромбоцитов, индуцированной АК, не наблюдалось.

Показатели плазменного гемостаза (количество тромбоцитов, протромбиновое время, концентрация фибриногена, тромбиновое время, АЧТВ) в течение всего эксперимента достоверно не изменялись.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что целенаправленная оптимизация химической структуры 2-морфолино-5-(тиенил-2)-6H-1,3,4-тиадиазина позволит создать более эффективный ингибитор тромбоцитарной агрегации.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании *in vitro* H-29 вызывает выраженный антиагрегационный эффект при индукции как АДФ, так и арахидоновой кислотой.

2. Наиболее значительный антиагрегационный эффект в экспериментах *ex vivo* наблюдается при внутривенном введении H-29 в дозе 20 мг/кг массы животного.

3. Параметры плазменного гемостаза достоверно не изменяются, либо изменения клинически незначимы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 07-03-96096_p_урал_a и 08-03-12068-офи).

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. М. Васильева, В. А. Макаров, О. Н. Чупахин и др., *Гематол. и трансфузиол.*, № 4, 12 – 15 (2008).
2. О. Н. Чупахин, Л. П. Сидорова, Н. М. Перова и др., *Патент РФ № 2259371. Изобретения. Полезные модели*, 24, 469 (2005).
3. О. Н. Чупахин, Л. П. Сидорова, Н. М. Перова и др., *Хим.-фарм. журн.*, № 5, 106 – 111 (2011).
4. О. Н. Чупахин, Л. П. Сидорова, Э. А. Тарахтий и др., *Патент РФ № 2157210. Изобретения. Полезные модели*, 28, 188 (2000).
5. J. J. Aaron, M. D. Gaye Seye, S. Trajkovska, et al., *Top Heterocycl. Chem.*, № 16, 153 – 231(2009).
6. G. L. Almajan, S. F. Barbuceanu, I. Saramet, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, № 7, 3191 – 3195 (2010).
7. K. S. Bhat, B. Poojary, D. J. Prasad, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, № 12, 5066 – 5070 (2009).
8. M. F. El Shehry, A. A. Abu-Hashem, E. M. El-Telbani, *Eur. J. Med. Chem.*, № 5, 1906 – 1911 (2010).
9. W. A. El-Sayed, O. M. Ali, M. M. Hathoot, et al., *Z Naturforsch C.*, № 1, 22 – 28 (2010).
10. V. Kumar, S. K. Sharma, S. Singh, et al., *Arch Pharm (Weinheim)*, № 2, 98 – 107 (2010).
11. X. Liu, R. Yan, N. Chen, et al., *Molecules*, № 11, 827 – 836 (2006).

Поступила 01.10.12

THE ANTIAGGREGANT ACTION OF 2-MORPHOLINO-5-(THIENYL-2)-6-H-1,3,4-THIADIAZINE IN *IN VITRO* AND *EX VIVO* EXPERIMENTS

Yu. S. Logvinova¹, V. A. Makarov¹, O. N. Chupakhin², L. P. Sidorova², N. M. Perova², and V. L. Rusinov²

¹ Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167, Russia

² Ural Federal University, ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002, Russia

The influence of 2-morpholino-5-(thienyl-2)-6-H-1,3,4-thiadiazine (H-29) on the platelet aggregation has been studied in experiments on donor plasma *in vitro*. It is established that H-29 causes a decrease in the platelet interaction induced by ADP and arachidonic acid. The influence of H-29 on platelet aggregation was also studied in *ex vivo* experiments with intravenous and oral administration, and some parameters of plasmatic hemostasis were evaluated.

Keywords: platelet aggregation; 1,3,4-thiadiazines