

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,4-ТИАДИАЗИНА НА АГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

Т. М. Васильева¹, В. А. Макаров¹, О. Н. Чупахин², Л. П. Сидорова²,
Н. М. Перова², В. Л. Русинов²

Исследовано влияние новых соединений, принадлежащих к классу 1,3,4-тиадиазинов, на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*. Все изученные тиадиазины оказывали антиагрегационный эффект и ингибировали агрегацию, индуцированную АДФ и арахидоновой кислотой, в широком диапазоне концентраций. Наиболее активными соединениями среди изученных 1,3,4-тиадиазинов являются: L-19, L-28 и L-31, эффективно снижающие агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой и АДФ, в концентрациях 0,01 – 1 мМ.

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

ВВЕДЕНИЕ

Тромбозы играют ключевую роль в возникновении инфаркта миокарда, ишемического инсульта и тромбоэмболий различной локализации. Фармакологические средства, влияющие на различные стадии тромбообразования, делят на три группы: антикоагулянты, фибринолитики и антиагреганты [1]. Препараты первых двух групп получили широкое применение в медицинской практике. Начиная с 70-х годов, внимание исследователей все более привлекают средства, влияющие на различные этапы агрегации тромбоцитов, что связано с активным участием этих клеток в процессах свертывания крови.

При действии на тромбоциты различных веществ — агонистов (тромбин, коллаген, АДФ, адреналин и др.), в клетках иницируется цепь последовательных реакций, приводящих к образованию агрегатов и формированию тромбоцитарной пробки в месте повреждения кровеносного сосуда. Тромбоциты также предоставляют фосфолипидную поверхность для сборки теназных и протромбиназных комплексов [9]. Поэтому модуляция агрегационной способности тромбоцитов является одним из главных направлений в коррекции нарушений системы гемостаза. В настоящее время в мире активно разрабатываются способы целенаправленного химического синтеза антиагрегантов нового поколения, обладающих высокой эффективностью и избирательностью действия.

Соединения, принадлежащие к классу 1,3,4-тиадиазинов, обладают широким спектром биологического действия [2]. Описаны антибактериальные, противовирусные, противовоспалительные, антиоксидантные, кардиотонические и сосудорасширяющие свойства различных тиадиазинов [7, 8, 10 – 12, 14].

Некоторые производные тиадиазинов обладают выраженным влиянием на свертывающую систему крови. Например, установлена антифибринолитическая активность 3-замещенных-5-(4-карбоксициклогексилметил)-тетрагидро-2Н-1,3,5-тиадиазин-2-тионов, сравнимая с активностью транексамовой кислоты [13]. В рядах 1,3,4-тиадиазинов найдены вещества, обладающие уникальным сочетанным антикоагулянтным и антиагрегантным действием [3]. 2-Нитрозоимино-3,6-дигидро-2Н-1,3,4-тиадиазин снижает агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном [15]. В других исследованиях при воздействии фенил- и гетероарилпиразино[2,3-с][1,2,6]тиадиазин 2,2-диоксидов наблюдалось уменьшение агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, арахидоновой кислотой и коллагеном, как *in vitro*, так и *ex vivo* [5, 6].

Таким образом, тиадиазины представляют класс соединений, на основе которых возможно создание эффективных антиагрегантов, действующих на различные пути активации и агрегации тромбоцитов. Целью настоящей работы было изучение антиагрегационных свойств новых синтезированных 1,3,4-тиадиазинов на венозной крови здоровых доноров.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе изучено влияние 14 образцов новых производных 5-арил-2-циклоалкилимино-1,3,4-тиадиазинов на агрегационную активность тромбоцитов человека *in vitro*. Исследованы следующие вещества:

¹ Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (зав. — проф. В. А. Макаров) Гематологического научного центра РАМН, Москва, 125167, Нов. Зыковский пр., 4а;
E-mail: protein7@rambler.ru

² Кафедра органической химии (зав. — акад. РАН О. Н. Чупахин) Уральского государственного технического университета, Екатеринбург, 620002, ул. Мира, 19;
E-mail: chupakhin@ios.uran.ru

2-морфолино-5-(2'-метилфенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (Н-16);
 2-морфолино-5-(4'-метоксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (Н-17);
 2-морфолино-5-(4'-бромфенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (Н-18);
 2-морфолино-5-(4'-хлорфенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, мезилат (Н-30);
 этил-1-метоксиимино-1-[2-пиперидино-6Н-1,3,4-тиадиазин-5-ил] ацетат, гидробромид (Н-35);
 этил-1-метоксиимино-1-(2-морфолино-6Н-1,3,4-тиадиазин-5-ил) ацетат, гидробромид (Н-46);
 2-морфолино-5-(4'-хлорфенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (L-19);
 2-морфолино-5-(3',4'-дигидроксифенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидрохлорид (L-28);
 2-морфолино-5-(4'-фторфенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (L-31);
 2-(2',6'-диметилморфолино)-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (L-34);
 2-тиоморфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин, мезилат (L-36);
 2-пирролидин-1-ил-5-(4'-хлорфенил)-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (L-37);
 этил-1-метоксиимино-1-(2-пирролидин-1-ил-6Н-1,3,4-тиадиазин-5-ил) ацетат, гидробромид (L-47).

Соединения были синтезированы сотрудниками кафедры органической химии Уральского государственного технического университета (Екатеринбург). Рабочие растворы исследуемых соединений готовили путем их разведения в дистиллированной воде до достижения необходимой концентрации.

Эксперименты по исследованию антиагрегационной способности 1,3,4-тиадиазин-2-аминов были выполнены с

использованием венозной крови здоровых доноров ($n = 50$), которую получали путем пункции кубитальной вены и стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами.

Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре фирмы "Chrono-Log Corporation" (США) по методу G. Born [4]. С этой целью в кювету прибора помещали 250 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Оптическим контролем служил такой же объем плазмы, не содержащей тромбоцитов. О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции (A_{\max}) по сравнению с исходной величиной. Эксперименты проводили следующим образом: в кювету, содержащую 250 мкл богатой тромбоцитами плазмы, добавляли 28 мкл изучаемого препарата, инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при температуре 37 °С и индуцировали процесс тромбоцитарной агрегации.

В качестве проагрегантов в работе использовали аденозиндифосфорную кислоту (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 оксипиринов (зав. — В. В. Безуглов) Института биоорганической химии РАН.

Статистический анализ полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами ва-

Таблица 1. Влияние 6-R-1,3,4-тиадиазин-2-аминов на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ ($1 \cdot 10^{-5}$ М) *in vitro* (A_{\max} , %)

Исследуемое вещество	АДФ (контроль)	Конечная концентрация, mM			
		1	0,5	0,1	0,01
Н-16	57,3 ± 4,0	37,5 ± 4,7*	—	40,6 ± 3,2	41,5 ± 1,9
Н-17	54,3 ± 2,5	32,6 ± 2,0*	—	41,0 ± 2,5	40,7 ± 2,7
Н-18	64,8 ± 3,1	57,8 ± 3,7	—	55,4 ± 3,3	55,8 ± 5,6
Н-30	47,4 ± 2,9	28,1 ± 4,4*	28,9 ± 2,4*	33,7 ± 3,0*	39,5 ± 2,9*
Н-35	60,9 ± 2,3	40,1 ± 1,8*	42,1 ± 2,3*	46,0 ± 1,5*	45,8 ± 2,1*
Н-46	51,7 ± 3,8	38,9 ± 1,6*	39,4 ± 3,5*	43,8 ± 4,1	40,2 ± 2,8
L-19	62,5 ± 3,3	37,4 ± 3,9*	—	41,8 ± 2,8*	47,1 ± 1,2*
L-28	64,9 ± 2,8	33,6 ± 2,7*	37,3 ± 3,9*	45,2 ± 3,0*	48,3 ± 2,6*
L-31	57,7 ± 2,3	26,1 ± 1,7*	32,9 ± 1,8*	39,1 ± 2,0*	41,6 ± 2,3*
L-34	61,3 ± 1,9	39,4 ± 1,6*	44,9 ± 1,3*	48,0 ± 1,4*	46,4 ± 1,0*
L-36	68,1 ± 2,5	49,5 ± 3,2*	37,1 ± 2,5*	55,5 ± 4,6*	62,5 ± 5,0
L-37	54,1 ± 2,5	35,3 ± 2,5 *	40,0 ± 1,9*	42,2 ± 1,3*	41,9 ± 1,9*
L-47	57,4 ± 3,5	36,4 ± 0,8*	43,6 ± 1,7*	47,2 ± 1,3	44,6 ± 1,9

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

риационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные соединения не обладали способностью индуцировать агрегацию тромбоцитов *in vitro* и оказывали антиагрегационный эффект. Все изученные в работе 1,3,4-тиадиазины ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека в различных концентрациях. Полученные результаты представлены в табл. 1.

1,3,4-Тиадиазины Н-16 и Н-17 достоверно снижали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов лишь в максимальной исследованной концентрации (1 мМ). При этом тромбоцитарная активность снижалась 1,7–1,6 раза по сравнению с контролем (добавление в богатую тромбоцитами плазму только АДФ). Исключение составило вещество Н-18, которое не влияло на тромбоцитарную агрегацию.

Соединения Н-30, L-19, L-28 и L-31 достоверно ингибировали тромбоцитарную агрегацию, индуцированную АДФ, во всем диапазоне исследованных концентраций (0,01–1 мМ). В максимальной исследованной концентрации эти вещества оказывали одинаковый по силе эффект и снижали тромбоцитарную агрегацию в среднем в 1,55 раза по сравнению с контрольным опытом. Действие L-19 сохранялось и при уменьшении концентрации до 0,01 мМ (отмечено ингибирование агрегации в 1,3 по сравнению с исходным уровнем). L-28 и L-31 достоверно ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию в концентрациях 0,1–1 мМ (отмечалось снижение агрегационной активности в 1,5–2 раза по сравнению с контролем).

В конечной концентрации 1 мМ вещества Н-35, L-28, L-34, L-36 и L-37 снижали агрегацию тромбоцитов в среднем на 20%. Ингибирование агрегации отме-

чалось и при дальнейшем уменьшении концентрации до 0,1–0,01 мМ.

Из сравнения антиагрегационной активности 1,3,4-тиадиазинов одной группы: Н-35, Н-46 и L-47, которые отличаются только заместителем в положении 2 тиадиазинового кольца, следует, что замена пиперидинового радикала на морфолин или пирролидин приводит к снижению антиагрегационной активности соединений. Так, 1,3,4-тиадиазин Н-35 достоверно ингибировал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в диапазоне концентраций до 0,1–0,01 мМ, а Н-46 и L-47 — в диапазоне концентраций 0,5–1 мМ.

Таким образом, все изученные 1,3,4-тиадиазины в концентрации 1 мМ обладали умеренным антиагрегационным эффектом в случае АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*, при этом максимальную ингибирующую способность проявили соединения Н-30 и L-31.

При использовании в качестве индуктора тромбоцитарной агрегации арахидоновой кислоты (АК) исследованные 1,3,4-тиадиазины имели различную активность. Полученные данные представлены в табл. 2.

Соединения Н-16 и Н-18 оказались наименее активными. Вещество Н-16 вызывало антиагрегационное воздействие только в концентрации 1 мМ (при этом было установлено понижение АК-индуцированной тромбоцитарной активности на 30% по сравнению с контролем), и не уменьшало АК-индуцированную агрегацию в меньших концентрациях. Соединение Н-18 вообще не влияло на тромбоцитарную агрегацию.

При инкубировании богатой тромбоцитами плазмы с Н-17 в концентрациях 1 и 0,1 мМ ингибирование агрегации происходило до $24,6 \pm 4,2\%$ и до $36,6 \pm 0,9\%$ соответственно. Таким образом, антиагрегационный эффект 1,3,4-тиадиазина Н-17 был существенно более выражен, чем таковой для вещества Н-16.

Вещество Н-30 вызывало достоверное снижение АК-индуцированной агрегации в диапазоне концент-

Таблица 2. Влияние 6-R-1,3,4-тиадиазин-2-аминов на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную арахидоновой кислотой (АК $1 \cdot 10^{-3}$ М) *in vitro* (A_{\max} , %)

Исследуемое вещество	АК (контроль)	Конечная концентрация, мМ				
		1	0,5	0,25	0,1	0,01
Н-16	$61,2 \pm 4,3$	$31,8 \pm 2,9^*$	–	–	$51,6 \pm 5,4$	$49,0 \pm 5,1$
Н-17	$48,1 \pm 3,2$	$24,6 \pm 4,2^*$	–	–	$36,6 \pm 0,9^*$	$45,6 \pm 4,9$
Н-30	$65,3 \pm 2,8$	0*	$28,2 \pm 5,8^*$	$39,2 \pm 4,5^*$	$50,2 \pm 3,3^*$	$56,1 \pm 2,5$
Н-35	$72,1 \pm 2,1$	0*	$10,2 \pm 3,7^*$	$26,1 \pm 2,9^*$	$45,5 \pm 3,5^*$	$56,9 \pm 2,2^*$
Н-46	$69,7 \pm 1,9$	0*	$27,6 \pm 1,2^*$	$48,7 \pm 3,9^*$	$51,1 \pm 6,3^*$	$56,0 \pm 2,1$
L-19	$52,7 \pm 2,1$	0*	$0,8 \pm 0,3^*$	$2,8 \pm 1,2^*$	$23,1 \pm 3,4^*$	$39,2 \pm 3,1^*$
L-28	$67,0 \pm 2,6$	0*	0*	$17,1 \pm 3,3^*$	$33,3 \pm 3,8^*$	$65,3 \pm 2,1$
L-31	$73,6 \pm 2,8$	0*	$13,8 \pm 3,2^*$	$31,7 \pm 4,9^*$	$49,8 \pm 4,2^*$	$61,8 \pm 3,4^*$
L-34	$73,8 \pm 2,2$	$7,6 \pm 5,1^*$	$16,2 \pm 7,2^*$	$34,6 \pm 2,0^*$	$55,1 \pm 5,5^*$	$62,5 \pm 1,7^*$
L-36	$65,7 \pm 3,1$	$2,8 \pm 1,5^*$	$3,5 \pm 1,3^*$	$3,8 \pm 1,1^*$	$10,0 \pm 1,8^*$	$54,1 \pm 3,0$
L-37	$62,1 \pm 4,7$	0*	0*	0*	$2,4 \pm 0,8^*$	$46,3 \pm 2,9^*$
L-47	$67,2 \pm 2,3$	0*	0*	$4,0 \pm 1,7^*$	$62,1 \pm 3,5$	$61,9 \pm 4,0$

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

раций 0,05 – 0,5 мМ (при этом в максимальной исследованной дозе Н-30 ингибировало агрегацию в 2 раза больше по сравнению с исходной величиной). Сходные результаты были получены и при исследовании антиагрегационных свойств 1,3,4-тиадиазинов Н-35 и Н-46.

Остальные 1,3,4-тиадиазины отличались более высокой антиагрегационной способностью. Так, соединения L-19, L-28, L-31, L-34 и L-37 влияли на АК-индуцированную тромбоцитарную агрегацию в концентрациях 0,01 – 1 мМ. Следует отметить, что L-19, L-36 и L-37 в диапазоне концентраций 0,25 – 1 мМ практически полностью подавляли тромбоцитарное взаимодействие. L-37 обладал выраженным антиагрегационным влиянием и в дозе 0,1 мМ. В более низких концентрациях 0,01 мМ L-19 и L-37 уменьшали агрегацию в 2 и 1,3 раза соответственно.

1,3,4-Тиадиазины L-28 и L-31 действовали в диапазоне концентраций 0,05 – 1 мМ и 0,01 – 1 мМ соответственно. В максимальных исследованных концентрациях (0,25 – 1 мМ) соединение L-28 вызывало более значительное ингибирование тромбоцитарного взаимодействия, чем L-31. L-28 полностью подавляло АК-индуцированную агрегацию в концентрациях 1 мМ и 0,5 мМ, в концентрации 0,25 мМ уменьшало ее до $17,1 \pm 3,3\%$ (в то время как соединение L-31 в данной дозе снижало агрегацию тромбоцитов до $31,7 \pm 4,9\%$).

Таким образом, в случае АК-индуцированной агрегации наиболее высокую ингибирующую способность проявили 1,3,4-тиадиазины L-19, L-28, L-31 и L-37.

Полученные результаты позволяют заключить, что изученные 6-R-1,3,4-тиадиазин-2-амины являются перспективными соединениями, влияющими на тромбоцитарную агрегацию. Исследованные в данной работе вещества могут служить основой для дальнейшей разработки новых 6-R-1,3,4-тиадиазин-2-аминов. Также представляется целесообразной целенаправленная оптимизация химической структуры наиболее активных веществ (L-19, L-28 и L-31) с целью создания на их основе эффективных ингибиторов тромбоцитарной агрегации.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее активными соединениями среди изученных 1,3,4-тиадиазинов являются: L-19, L-28, L-31 и L-37, эффективно снижающие агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой и АДФ.

2. В связи с полученными результатами испытаний антиагрегационных свойств 1,3,4-тиадиазинов, как высокоактивных соединений, представляется перспективным поиск в этих рядах эффективных ингибиторов тромбоцитарной агрегации при исследовании *ex vivo*.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Медицина, Москва (1993).
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, Э. А. Тарахтий и др. Патент РФ № 2157210, *Изобретения. Полезные модели*, **28**, 188 (2000).
4. G. Born, *Nature (London)*, **194**, 927 – 929 (1962).
5. N. Campillo, C. Garcia, P. Goya, et al., *J. Med. Chem.*, **43**(22), 4219 – 4227 (2000).
6. N. Campillo, P. Goya, and J. A. J. Paez, *J. Med. Chem.*, **42**(17), 3279 – 3288 (1999).
7. Z. Y. Fang and J. Fontaine, *Zhongguo. Yao. Li. Xue. Bao.*, **18**(2), 101 – 104 (1997).
8. M. C. Forest, P. Lahouratate, M. Martin, et al., *J. Med. Chem.*, **35**(1), 163 – 172 (1992).
9. M. M. Hoffman and D. M. Monroe, *Curr. Hematol. Rep.*, **4**(5), 391 – 396 (2005).
10. B. S. Holla, P. M. Akberali, and M. K. Shivananda, *Farmaco.*, **56**(12), 919 – 927 (2001).
11. X. Ji, Z. Zhong, X. Chen, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**(15), 4275 – 4279 (2007).
12. P. Karegoudar, D. J. Prasad, M. Ashok, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **43**(4), 808 – 815 (2008).
13. A. B. Ozelik, S. Ersan, A. U. Ural, et al., *Arzneimittelforschung.*, **57**(8), 554 – 559 (2007).
14. B. Piroette, R. Ouedraogo, P. de Tullio, et al., *J. Med. Chem.*, **43**(8), 1456 – 1466 (2000).
15. K. Rehse, U. Brümmer, and E. Unsuld, *Pharmazie.*, **53**(12), 820 – 824 (1998).

Поступила 16.02.09

ANTIAGGREGANT PROPERTIES OF NEW 1,3,4-THIADIAZINE DERIVATIVES

T. M. Vasil'eva^{1*}, V. A. Makarov¹, O. N. Chupakhin^{2**}, 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 State Technical University, ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002, Russia
e-mail: *protein7@rambler.ru; **chupakhin@ios.uran.ru

A series of new 1,3,4-thiadiazine derivatives have been synthesized and their effect on the human platelet aggregation *in vitro* has been studied. All the tested substances inhibit the human platelet aggregation induced by ADP and arachidonic acid in a broad concentration range. The most active 1,3,4-thiadiazines (L-19, L-28 and L-31) effectively inhibit platelet aggregation at concentrations within 0.01 – 1 mM.

Key words: Platelet aggregation, 1,3,4-thiadiazines.