

haemoblock for local topical use haemoblock in different surgical situations. Multicenter clinical trials. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2015; 8 (1): 56–61. (In Russ.)]

3. Пфафф В.Ф. Опыт клинического применения нового гемостатического средства Гемоблок в хирургической практике. — М., 2014. — 56 с. [Pfaff V.F. *Opyt klinicheskogo primeneniya novogo gemostaticheskogo sredstva Gemoblok v khirurgicheskoy praktike*. (Clinical experience of using «haemoblock» hemostatic in surgery.)

Moscow. 2014; 56 p. (In Russ.)]

4. Якупов А.Ф., Сангаджиев С.Б., Мустафин Р.Р., Анисимов А.Ю. Сравнительная оценка эффективности диагностики и хирургического лечения больных портальной гипертензией // *Вестн. соврем. клин. мед.* — 2013. — Т. 6, № 5. — С. 11–17. [Yakupov A.F., Sangadzhiev S.B., Mustafin R.R., Anisimov A.Y. Comparative evaluation of diagnosis and surgical treatment of portal hypertension. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2013; 6 (5): 11–17. (In Russ.)]

УДК 612.115.3: 612.085.2: 616.151.5: 616.12-009.72: 615.273.53

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КАМФЕНА НА ПРОЦЕССЫ СвёрТЫВАНИЯ КРОВИ

Аделя Анваровна Рахматуллина^{1,2*}, Рамиль Габдельхакович Тураев^{2,3},
Сергей Васильевич Киселёв¹, Лилия Евгеньевна Никитина¹, Андрей Вениаминович Бодров¹

¹Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

²Республиканский центр крови, г. Казань, Россия;

³Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, Россия;

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-455

Цель. Определить влияние синтезированных серосодержащих производных камфена на функциональную активность тромбоцитов и коагуляционную способность плазмы крови человека в условиях *in vitro*.

Методы. Реакцией электрофильного присоединения тиолов получили сульфид и сульфен камфена. Структуры полученных соединений устанавливали при помощи данных ядерно-магнитного резонанса на ядрах ¹H и ¹³C, хроматомасс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа. Гемокоагуляционную активность синтезированных соединений оценивали по определению спонтанной агрегации тромбоцитов и коагуляционной активности плазмы, полученной из венозной крови пациентов с ишемической болезнью сердца, а индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали на плазме, полученной от здоровых доноров.

Результаты. Полученные соединения показали антиагрегационную и антикоагуляционную способность: подавляли спонтанную и индуцированную агрегацию тромбоцитов, а также снижали коагуляционные свойства плазмы крови человека. Как камфеновый сульфен, так и в большей степени камфеновый сульфид (в отличие от ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела) полностью ингибировали активацию тромбоцитов, индуцированную адреналином, аденозиндифосфатом, коллагеном, арахидоновой кислотой, и снижали воздействие ристоцетина. Антикоагулянтная активность полученных веществ обусловлена их свойством ингибировать активацию тромбоцитов и подавлять каталитическую способность фосфолипидной поверхности, участвующей в формировании коагуляционных комплексов факторов свёртывания.

Вывод. Низкая токсичность терпеноидов и выявленная антиагрегационная и антикоагуляционная способность серосодержащих соединений камфена делает их весьма перспективными веществами с возможностью создания на их основе новых лекарственных средств для лечения и профилактики тромбофилии различной этиологии.

Ключевые слова: сульфид и сульфен камфена, тромбоциты, антиагрегационная и антикоагуляционная активность.

CLOTTING ACTIVITY OF CAMPHENE DERIVATIVES

A.A. Rakhmatullina^{1,2}, R.G. Turaev^{2,3}, S.V. Kiselev¹, L.E. Nikitina¹, A.V. Bodrov¹

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

²Republican Blood Centre, Kazan, Russia;

³Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Aim. To study of the influence of new synthesized sulfur-containing derivatives of camphene on the thrombocytes aggregating ability and clotting activity of human blood plasma *in vitro*.

Methods. Sulfides and sulphones of camphene were synthesized by thiols electrophilic addition reaction. The structures of the synthesized compounds were clarified by using of ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance, chromatomass spectrometry and X-ray analysis. Clotting activity of the synthesized compounds was assessed by studying the spontaneous platelet aggregation and plasma coagulating activity of the venous blood of patients with ischemic heart disease. The induced platelets aggregation was studied on plasma obtained from healthy donors.

Results. The synthesized compounds demonstrated anti-aggregating and anti-coagulating activity: they inhibited spontaneous and induced thrombocyte aggregation as well as reduced coagulating ability of human plasma. Both camphene sulphone and mainly camphene sulfide (in contrast with acetylsalicylic acid and clopidogrel) totally inhibited thrombocytes aggregation induced by adrenaline, adenosine diphosphate, collagen and arachidonic acid, and decreased the influence of ristocetin. Anticoagulant activity of the synthesized substances is associated to their potential to inhibit thrombocyte activation and to reduce the catalyst activity of phospholipid surface participating in coagulating complexes and clotting factors formation.

Conclusion. Low toxicity of terpenoids together with discovered anticoagulant activity of sulfur-containing derivatives

of camphene revealing the promising potential of these drugs for further development of novel medical treatments for treating and prevention of different types of thrombophilia.

Keywords: camphene sulphone, camphene sulfide, platelets, antiplatelet activity, anticoagulant activity.

Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной смертности во всём мире. Развитие этих заболеваний определяется атеросклеротическим поражением кровеносных сосудов, приводящим к образованию тромба и прекращению кровотока в жизненно важных органах. Артериальный тромбоз обусловлен адгезией, агрегацией тромбоцитов и последующей активацией коагуляционного гемостаза. Именно поэтому идёт активное изучение препаратов, угнетающих активность тромбоцитов.

Нами было сделано предположение, что подобными свойствами могут обладать соединения, полученные на основе терпенов. В качестве исходного соединения был выбран монотерпен — камфен.

Терпены представляют собой обширный класс веществ, содержащихся во всех живых организмах. Одна из функций терпеновых соединений — придание механической стойкости клеточным мембранам [6]. Известно, что поверхность клеток, контактирующих с кровью, атромбогенна, но при действии различных физиологических и патологических агентов она приобретает способность связывать и активировать факторы свёртывания. Эти индукторы, воздействуя на специфические клеточные рецепторы или просто повреждая клетки, приводят к трансформации поверхности мембраны, и она приобретает тромбогенные свойства [1, 2]. Использование полученных представлений позволило провести целенаправленный синтез соединений, обладающих способностью повлиять на эти процессы.

Цель исследования — определить влияние синтезированных серосодержащих производных камфена на функциональную активность тромбоцитов и коагуляционную способность плазмы крови человека в условиях *in vitro*.

Реакцией электрофильного присоединения тиолов получали сульфид и сульфен монотерпена — камфена. Структуры полученных соединений устанавливали при помощи данных ядерно-магнитного резонанса на ядрах ^1H и ^{13}C , хроматомасс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа.

Синтез тиоловых терпенов обусловлен тем, что сера относится к биогенным элементам, а сульфиды, сульфоксиды и сульфены природных углеводов зачастую обладают фармакологической активностью, поэтому объединение в одной молекуле двух фармакофорных фрагментов — терпенового скелета и серосодержащей функции — является предпосылкой для получения новых биологически активных соединений с низкой токсичностью.

Возможность применения полученных веществ для коррекции гемостаза определяли в условиях *in vitro*, используя кровь человека. Кровь

получали путём пункции кубитальной вены и стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия. Затем центрифугированием выделяли богатую и бедную тромбоцитами плазму.

Для оценки гемокоагуляционной активности полученных веществ определяли скорость агрегации тромбоцитов и проводили поверхностно-зависимые стандартные коагуляционные тесты: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое и тромбиновое время. Агрегационную способность тромбоцитов устанавливали с помощью анализатора «Chrono-Log Corporation» (США) по методу G. Born [5]. Коагуляционную активность определяли на коагулометре «Минилаб-7001» (Россия).

Гемокоагуляционную активность синтезированных соединений устанавливали путём определения спонтанной агрегации тромбоцитов и коагуляционной активности плазмы, полученной из венозной крови пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и выраженными изменениями в системе гемостаза, а индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали на плазме, полученной от здоровых доноров.

С этой целью к 0,45 мл плазмы добавляли 0,05 мл раствора, содержащего 36 мМ препарата в растворе этилового спирта, и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при температуре 37 °С. В контрольных опытах к плазме добавляли растворитель, используемый для приготовления препарата (30% водный раствор этилового спирта). Для индукции агрегации тромбоцитов применяли растворы аденозиндифосфата (АДФ, 5 мкМ), эпинефрина (адреналина, 10 мкМ), коллагена (2 мкг/мл), арахидоновой кислоты (0,5 мМ) и ристомидина (1 мг/мл).

Полученные вещества по химической природе не имеют аналогов среди антиагрегационных препаратов, поэтому для сравнения выбрали ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел (плавикс) как наиболее клинически значимые лекарственные средства. Для этого использовали плазму крови больных ИБС, которые получали соответствующие лекарственные препараты.

Результаты исследования обработаны с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel. Статистическую значимость различий параметров определяли регрессионным и вариационным анализами по критерию Стьюдента при уровне значимости менее 0,05.

Полученные данные показали, что у синтезированных на основе камфена соединений обнаружена высокая антиагрегационная активность: спонтанная скорость и показатель агрегации значительно уменьшались и достигали нормальных значений (не более 0,05 отн.ед./мин и

Таблица 1

Влияние производных тиотерпеноидов камфенового ряда на агрегацию тромбоцитов и показатели коагуляционного гемостаза *in vitro* у пациентов с ишемической болезнью сердца

Плазма	Скорость агрегации, отн.ед./мин	Показатель агрегации, отн.ед.	АЧТВ, с	Протромбиновое время, с	Тромбиновое время, с
Без препарата	0,265±0,185	2,01±0,6	24,4±0,44	8,95±0,26	15,5±0,3
Сульфид, n=10	0,012±0,02*	1,27±0,02*	28,5±2,4*	9,93±0,74*	15,3±0,4
Сульфид, n=10	0,053±0,02*	1,41±0,24*	27,9±2,25*	9,85±0,68*	14,9±0,2

Примечание: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; n — количество измерений; *p < 0,05 по сравнению с показателями без препарата.

Таблица 2

Влияние производных камфена на индуцированную *in vitro* агрегацию тромбоцитов по сравнению с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом

Препарат-индуктор	Контроль, %	Сульфид, %	Сульфид, %	Ацетилсалициловая кислота, %	Клопидогрел, %
Аденозиндифосфат	54,41±1,56	0*	20±5,6*	46,3±9,1*	35,1±3,2*
Эпинефрин (адреналин)	66,5±2,50	0*	0*	36,3±3,1*	51,3±0,7*
Арахидоновая кислота	65,5±3,50	0*	0*	24,6±2,4*	64,6±2,8*
Коллаген	63,33±10,21	0*	10±4,2*	38,4±14,6*	33,1±10,7*
Ристомицин	66,66±6,31	40±10,2*	20±6,4*	48,2±19,1*	56,4±9,8*

Примечание: контроль — плазма без препаратов, количество измерений в каждом случае соответствовало 5; *p < 0,05 по отношению к показателям без препарата.

1,35 отн.ед./мин соответственно, табл. 1).

Кроме того, они также снижали и коагуляционную активность плазмы: нормализовали АЧТВ и увеличивали протромбиновое время. Однако при этом исследуемые соединения не влияли на активность тромбина (тромбиновое время не изменялось). Следовательно, полученные вещества ингибируют активацию как тромбоцитов, так и коагуляционных факторов, и эта способность при сравнении сульфида и сульфидона различалась незначительно (p > 0,05). Таким образом, изменение состава серосодержащих групп камфена существенным образом не сказывалось на наблюдаемых показателях.

Активация тромбоцитов индуцируется посредством специфических рецепторов при воздействии различных физиологических или патологических факторов — коллагена, адреналина, АДФ и др. [4]. Наше исследование показало, что как камфеновый сульфид, так и в большей степени камфеновый сульфид (в отличие от ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела) обладают значительной ингибирующей способностью: практически полностью подавляют индуцированную адреналином, АДФ, коллагеном, арахидоновой кислотой агрегацию тромбоцитов и снижают воздействие ристоцетина (табл. 2).

Из полученных данных следует, что особенность синтезированных соединений — их способность подавлять активацию тромбоцитов путём ингибирования рецепторов, которые отвечают за передачу импульса, запускающего внутриклеточные процессы. Эти процессы приводят к изменению структуры клеточной мембраны тромбоцитов, и они приобретают как способность к адгезии и агрегации, так и тромбогенные

свойства, что в свою очередь приводит к активации плазменного гемостаза.

Антикоагуляционные свойства производных камфена, вероятно, обусловлены способностью терпенов стабилизировать клеточные мембраны за счёт ван-дер-ваальсовых взаимодействий с их фосфолипидами [6]. Об этом свидетельствуют результаты изменения агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой. Арахидоновая кислота в отличие от других использованных индукторов не активирует тромбоциты через рецепторы, а непосредственно инициирует внутриклеточные процессы, проникая через плазматическую мембрану [4]. Следовательно, потеря этого свойства в присутствии камфеновых производных обусловлена изменением проницаемости мембраны тромбоцитов за счёт образования дополнительных межмолекулярных взаимодействий. Очевидно, связывание серосодержащих производных камфена с модельными фосфолипидными поверхностями объясняет и изменение функционирования комплексов факторов свёртывания в поверхностно-зависимых стандартных коагуляционных тестах.

Всесторонние экотоксикологические исследования монотерпенов, включающие испытания на острую токсичность для человека, животных и растений, а также тесты на генотоксичность, тератогенную токсичность и влияние на репродуктивные функции организмов, показали, что терпены относятся к малотоксичным соединениям (LD₅₀ от 2000 до 10000 мг/кг), не обладают мутагенными свойствами и не являются репродуктивными ядами [3]. Эти свойства и обнаруженные антиагрегационные и антикоагуляционные способности серосодержащих производных

камфена делают их перспективными веществами с возможностью создания на их основе новых лекарственных средств для лечения и профилактики тромбофилии различной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зубаиров Д.М., Тимербаев В.Н.* Функциональная концепция инициирования свёртывания крови клеточными мембранами // Гематол. и трансфузиол. — 1991. — Т. 36, №4. — С. 5–9. [Zubairov D.M., Timerbaev V.N. Functional conception of initiating the blood clotting by cell membranes. *Gematologiya i transfuziologiya*. 1991; 36 (4): 5–9. (In Russ.)]

2. *Киселёв С.В., Зубаиров Д.М., Тимербаев В.Н.* Взаимодействие фактора X человека с тканевым тромбопластином // Биомед. хим. — 2003. — Т. 49, №5. — С. 443–450. [Kiselev S.V., Zubairov D.M., Timerbaev V.N. Human factor X interaction with thromboplastin. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2003; 49 (5): 443–450. (In Russ.)]

3. *Старцева В.А., Никитина Л.Е., Сиразиева Е.В. и др.* Синтез и биологическая активность монотерпеноидов ментанового ряда // Химия в интересах устойчивого развития. — 2009. — Т. 17, №5. — С. 539–545. [Startseva V.A., Nikitina L.E., Sirazieva E.V. Synthesis and Biological activity of monoterpenoids of menthane series. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*. 2009; 17 (5): 539–545. (In Russ.)]

4. *Шутикова А.С.* Тромбоцитарный гемостаз. — СПб.: Изд-во. СПб ГМУ, 2000. — 227 с. [Shitikova A.S. *Trombotsitarnyy gemostaz*. (Thrombocytic hemostasis.) Saint Petersburg: Publishing house of Saint Petersburg State Medical University. 2000; 227 p. (In Russ.)]

5. *Born G.* Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature*. — 1962. — Vol. 194. — P. 927–929.

6. *Farzaneh M., Ahmadzadeh M., Hadian J. et al.* Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens // *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* — 2006. — Vol. 71, iss. 3. — P. 1327–1333.

Уважаемые читатели!

***С 1 сентября начинается подписка на 2016 год
на «Казанский медицинский журнал»***

Первоочередная задача «Казанского медицинского журнала», как и в предшествующие годы, — удовлетворение запросов врачей самых различных специальностей, научных работников и студентов. Актуальные статьи по терапии, хирургии, акушерству и гинекологии, педиатрии, рентгенологии и радиологии, невропатологии, оториноларингологии, офтальмологии, стоматологии, урологии, дерматовенерологии и другим дисциплинам представляют интерес для всех специалистов и врачей широкого профиля. Освещаются вопросы гигиены и организации здравоохранения, истории медицины. Помещаются обзоры и лекции на актуальные темы, информация о съездах и конференциях, новых лечебных методах и препаратах, новых книгах. С журналом сотрудничают крупнейшие учёные России. С 1996 г. «Казанский медицинский журнал» представлен в международной электронной информационной сети Интернет (адрес сайта: <http://www.kazan-medjournal.ru>). С 2002 г. все статьи нашего журнала представлены в научной электронной библиотеке: <http://www.elibrary.ru>.

Статьи от авторов принимаются только при наличии ксерокопий квитанций о подписке.

Подписные индексы журнала:

годовая подписка: 48073 – Агентство Роспечать, 83076 – Почта России.

подписка на полгода: 73205.