

REFERENCES

1. *Atyasov, N.I.* Novye tehnologii ispol'zovaniya venoznogo rusla kostei v ekstremal'noi medicine [New technologies of use of the venous course of bones in extreme medicine] / N.I. Atyasov, I.N. Atyasov. — Saransk, 2001. — S. 210—212.
2. *Atyasov, N.I.* Vnutrikostnye vlivaniya lekarstvennyh i drugih zhidkostei po ekstremnym pokazaniyam na dogospital'nom etape [Intra bone injections of medicinal and other liquids according to emergency indications at a pre-hospital stage] / N.I. Atyasov, V.G. Sharov, G.A. Boyarinov. — Saransk, 1998. — S. 67—68.
3. *Vsevolodov, G.F.* Vnutrikostnye veny trubchatykh kostei cheloveka [Intra bone veins of tubular bones of the person] / G.F. Vsevolodov // Arhiv anatomii, gistologii, embriologii. — 1953. — T. 4, № 4. — S. 77—81.
4. *Dolbneva, E.L.* Vnutrikostnyi dustup — sovremennoe reshenie problemy sosudistogo dostupa v kriticheskikh situatsiyah i pri serdechno-legochnoi reanimatsii [Intra bone access — a modern solution of the problem of vascular access in critical situations and at warm and pulmonary reanimation] / E.L. Dolbneva, E.S. Petrosyan // Medicina neotlozhnykh sostoyanii [Medicine of urgent conditions]. — 2012. — № 1 (40). — S. 124—130.
5. *Pikovskii, V.Yu.* Vnutrikostnoe vvedenie lekarstvennykh preparatov v komplekse intensivnoi terapii na dogospital'nom etape [Intra bone introduction of medicines in a complex of intensive therapy at a pre-hospital stage] / V.Yu. Pikovskii // Medicina kriticheskikh sostoyanii [Medicine of critical conditions]. — 2013. — № 5/6. — S. 49—53.
6. Prikaz Minzdravsocrazvitiya RF ot 31.03.2008 № 154n «O vnesenii izmenenii v prikaz Ministerstva zdravoohraneniya i social'nogo razvitiya Rossiiskoi Federatsii ot 1 dekabrya 2005 № 752 «Ob osnaschenii sanitarnogo transporta» [The order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of 31.03.2008 № 154n «About modification of the order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of December 1, 2005 № 752 «About equipment of sanitary transport»].
7. Prikaz Minzdrava RF ot 07.08.2013 № 549n «Ob utverzhdenii trebovaniy k komplektatsii lekarstvennymi preparatami i medicinskimi izdeliyami ukladok i naborov dlya skoroi medicinskoj pomoschi» [The order of Ministry of Health of the Russian Federation of 07.08.2013 № 549n «About the approval of requirements to a complete set medicines and medical products of laying and sets for an emergency medical service»].
8. *Shulyak, G.M.* Vnutrikostnyi metod obezbolivaniya i ego anatomicheskoe obosnovanie [Intra bone method of anesthesia and its anatomic justification of] / G.M. Shulyak, A.T. Akilova. — L.: Medgiz, 1953. — S. 153.
9. The circulation in the mammalian bone marrow / C. Drinker, K. Drinker, C. Lund // Am. J. Physiol. — 1922. — № 62. — S. 1—92.
10. Comparison of two intraosseous access devices in adult patients under resuscitation in the emergency department: A prospective, randomized study / B.A. Leidel, C. Kirchhoff, V. Braunstein [et al.] // Resuscitation. — 2010. — № 81 (8). — P. 994—999.

Поступила 05.09.2014

© М.М. Воронцова, Р.Г. Тураев, С.В. Киселев, Л.Е. Никитина, И.Г. Мустафин, Р.М. Набиуллина, 2014

УДК 615.015.4:612.11

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТИОТЕРПЕНОИДОВ ПИНАНОВОГО РЯДА НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

МАРИНА МИНЕТДИНОВНА ВОРОНЦОВА, зам. главного врача по контролю качества
ГАУЗ «Республиканский центр крови Минздрава Республики Татарстан», Казань, Россия,
тел. 8-987-297-78-34, e-mail: rspk@tatar.ru

РАМИЛЬ ГАБДЕЛЬХАКОВИЧ ТУРАЕВ, канд. мед. наук, главный врач ГАУЗ «Республиканский
центр крови Минздрава Республики Татарстан», Казань, Россия, тел. 8-987-400-57-84,
e-mail: rspk@tatar.ru

СЕРГЕЙ ВАСИЛЬЕВИЧ КИСЕЛЕВ, докт. мед. наук, профессор кафедры общей и органической
химии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Казань, Россия, тел. 8-960-040-10-34, e-mail: svkiselev08@mail.ru

ЛИЛИЯ ЕВГЕНЬЕВНА НИКИТИНА, докт. хим. наук, зав. кафедрой общей и органической химии
ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань,
Россия, тел. 8-903-307-50-70, e-mail: nikitl@mail.ru

ИЛЬШАТ ГАНИЕВИЧ МУСТАФИН, докт. мед. наук, зав. кафедрой биологической химии
ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Казань, Россия, тел. 8-919-624-96-24, e-mail: ilshat64@mail.ru

РОЗА МУЛЛАЯНОВНА НАБИУЛЛИНА, аспирант кафедры биологической химии
ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Казань, Россия, тел. 8-917-898-72-50, e-mail: nabiuullina.rosa@yandex.ru

Реферат. Цель исследования — определить влияние синтезированных тиотерпеноидов на гемокоагуляционную активность плазмы человека и функциональную активность тромбоцитов. *Материал и методы.* Сульфиды и сульфоксиды пинанового ряда синтезированы на основе β-пинена. Сульфиды получены реакцией электрофильного присоединения тиолов по двойной связи β-пинена. Окисление сульфидов до сульфоксидов осуществляли методом асимметрического окисления. Структуры полученных соединений устанавливались при помощи ЯМР ¹H и ¹³C, хроматомасс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа. Острую токсичность тиотерпеноидов определяли на беспородных белых мышах, а их гемокоагуляционную активность устанавливали по скорости агрегации тромбоцитов, тромбодинамики и стандартным коагуляционным тестам. Функциональное состояние хранящихся тромбоцитов оценивалось проточной цитометрией путем подсчета количества микровезикул в препаратах тромбоцитарной массы. В определениях спонтанной агрегации тромбоцитов и коагуляционной активности плазмы использовалась венозная кровь больных ишемической болезнью сердца и выраженными изменениями в системе гемостаза, а индуцированная агрегация тромбоцитов и их микровезикуляция исследовалась на плазме, полученной от здоровых доноров. *Результаты и их обсуждение.* Все полученные

соединения обладали антиагрегационной и антикоагуляционной активностью. Пинанилсульфид в отличие от сульфоксида показал более выраженное ингибирующее действие на активацию коагуляционных факторов, которая зависела от присутствия в плазме микровезикул. Наиболее водорастворимый сульфоксид полностью ингибировал спонтанную и индуцированную коллагеном и арахидоновой кислотой агрегацию тромбоцитов, снижал их микровезикуляцию, а также коагуляционную способность плазмы человека. Сульфид и в большей степени сульфоксид пинанового ряда повышали устойчивость тромбоцитов при хранении тромбоконцентратов.

Заключение. Гемокоагуляционная активность полученных веществ обусловлена селективным ингибированием агрегации тромбоцитов, уменьшением выброса микровезикул и подавлением их активности. Учитывая низкую токсичность тиотерпеноидов, серосодержащие соединения пинанового ряда можно использовать в трансфузиологии для стабилизации тромбоцитарных препаратов крови, а также рассматривать в качестве потенциального лекарственного средства для лечения и профилактики тромбофилии.

Ключевые слова: β -пинен, сульфиды и сульфоксиды, тромбоциты, тромбоцитарные микровезикулы, антиагрегационная и антикоагуляционная активность.

A STUDY OF THE INFLUENCE OF PINANE THIOTERPENOIDS ON HUMAN HEMOSTASIS AND PLATELETS FUNCTIONAL ACTIVITY

MARINA M. VORONTSOVA, Deputy Chief of Quality Control of «Republican hemotransfusion center of Tatarstan Ministry of Health», Kazan, Russia, tel. 8-987-297-78-34, e-mail: rspk@tatar.ru

RAMIL G. TURAYEV, PhD, Chief medical officer of «Republican hemotransfusion center of Tatarstan Ministry of Health», Kazan, Russia, tel. 8-987-400-57-84, e-mail: rspk@tatar.ru

SERGEI V. KISELEV, MD, Professor of the General and Organic Chemistry Department of SBEI HPE «Kazan State Medical University» of Russian Ministry of Health, Kazan, Russia, tel. 8-960-040-10-34, e-mail: svkiselev08@mail.ru

LILIA E. NIKITINA, Chief of General and Organic Chemistry Department of SBEI HPE «Kazan State Medical University» of Russian Ministry of Health, Kazan, Russia, tel. 8-903-307-50-70, e-mail: nikitl@mail.ru

ILSHAT G. MUSTAFIN, MD, Chief of biochemistry Department of SBEI HPE «Kazan State Medical University» of Russian Ministry of Health, Kazan, Russia, tel. 8-919-624-96-24, e-mail: ilshat64@mail.ru

ROSA M. NABIULLINA, postgraduate student of biochemistry Department of SBEI HPE «Kazan State Medical University» of Russian Ministry of Health, Kazan, Russia, tel. 8-917-898-72-50, e-mail: nabiullina.rosa@yandex.ru

Abstract. *Aim of the study* — investigation the influence of new sulfur-containing derivatives of β -pinene on the functional activity of human platelets and blood clotting activity in human plasma. *Material and methods.* A number of sulfides and sulfoxides of pinane series have been synthesized based on β -pinene. Sulfides have been obtained by the electrophilic addition reaction of thiols to the double bond of β -pinene in the presence of $ZnCl_2$. Oxidation of sulfides into corresponding sulfoxides has been conducted with the $Ti(O-i-Pr)_4/R-C_6H_5CH(OH)COOH/t-BuOOH$ oxidative system. The structures of compounds obtained have been established by the use of IR and $^1H/^{13}C$ NMR spectroscopy, mass spectrometry and X-ray analysis. The acute toxicity of the compounds studied was determined by parenteral (intraperitoneal) route on outbred white mice of both sexes. Blood coagulating activity of obtained compounds has been established by platelet aggregation rate using G. Born method, thrombotic dynamics and surface-dependent coagulation tests. Functional condition of stored platelets was assessed by flow cytometry by counting the number of microvesicles in platelet preparations. In spontaneous aggregation of platelets and plasma coagulating activity assessment we used venous blood of patients with coronary artery disease and marked changes in the hemostatic system. Induced platelet aggregation and its micro vesiculation have been investigated on plasma obtained from healthy donors. *Results and discussions.* All obtained compounds possessed anti-aggregating and anti-coagulating activity. Unlike sulfoxide, pinanyl sulfide showed a more pronounced inhibitory effect on coagulation factors activation, which depended on the presence of microvesicles in the plasma. The most water-soluble compound — sulfoxide almost completely inhibits spontaneous and collagen and arachidonic acid induced aggregation of thrombocytes as well as coagulating ability. Sulfide and increasingly sulfoxide of pinane series increased stability of platelets in platelet concentrate storage. *Conclusions.* In current study we demonstrated that blood coagulating activity of obtained substances is conditioned by the selective inhibition of platelet aggregation, decrease of microvesicles emission and suppression of their activity. Taking into account low toxicity of thioterpenoids, sulfur-containing monoterpenoids of pinane series are promising potential drugs for preventive measures and medical treatment of thrombophilia and as agents for blood stabilization.

Key words: β -pinene, sulfides and sulfoxides, platelets, platelet microvesicles, antiaggregatory and anticoagulating activity.

Введение. Одним из приоритетных направлений в трансфузиологии является введение препаратов крови, без которых в ряде случаев невозможно восстановление процессов жизнедеятельности у больных с самыми различными заболеваниями. Для этого в основном используют плазму крови, эритроцитарные и тромбоцитарные клеточные массы.

При заборе донорской крови повреждается сосудистая стенка и повышается уровень стрессового гормона — адреналина. Эти изменения вызывают активацию тромбоцитов, и они приобретают способность к адгезии, агрегации, а также к связыванию и активации плазменных факторов свертывания. Данные процессы обусловлены возбуждением специфических клеточных

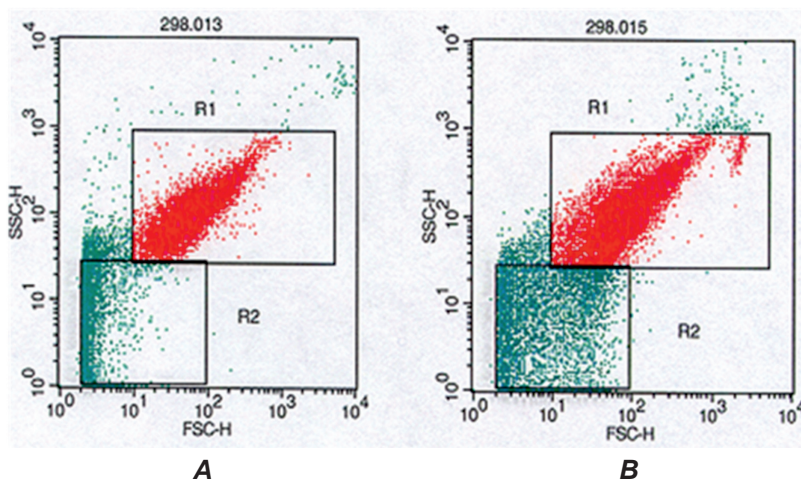
рецепторов, трансформацией клеточной мембраны в виде нарушения ее асимметричности, что приводит к появлению мезоморфных структур и, как следствие, к поступлению в кровотоки тромбогенных частиц — микровезикул [2]. Поэтому при получении препаратов крови необходимо заблокировать возможность развития этих событий. С этой целью в основном используются цитрат натрия или гепарин. Однако, как показывают результаты проточной цитометрии, стабилизирующий эффект этих веществ недостаточен — тромбоцитарные микровезикулы появляются в кровотоке как при использовании цитрата, так и гепарина (рисунк). Поэтому целью нашего исследования был поиск новых средств, которые позволили бы повысить качество и сохранность препаратов крови.

Для создания новых соединений в качестве исходного соединения использовали один из терпенов — β -пинен. Терпены представляют собой обширный класс веществ, содержащихся во всех живых организмах. Одной из функций терпеновых соединений является придание механических свойств клеточным мембранам. Их молекулы жесткие, амфифильные и обеспечивают *ван-дер-ваальсовы* взаимодействия с фосфолипидами клеточных мембран. Они участвуют и в ключевых процессах, протекающих в мембранах: фарнезол — в алкилирование протеинов на стадии их созревания, убихиноны — в электронных переносах, доликолы участвуют в образовании протеиновых гликозидов. Все это играет важную роль в формировании и стабилизации мембран [6]. В свою очередь, синтез серосодержащих терпеноидов был обусловлен тем, что сера относится к биогенным элементам, а сульфиды, сульфоксиды и сульфоны природных углеводородов 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 [3].

Материал и методы. Сульфиды получали реакцией электрофильного присоединения тиолов по двойной связи β -пинена в присутствии хлористого цинка [5]. Реакции протекали с сохранением пинановой структуры молекулы и образованием аддуктов против правила

Марковникова. При окислении полученных сульфидов до сульфоксидов такими окислителями, как периодат натрия, мета-хлорнадбензойная кислота, диоксид селена с перекисью водорода и сульфурил хлорид в комбинации с этиловым спиртом, было установлено, что наилучший результат достигается при применении метода асимметричного окисления с использованием окислительной системы $Ti(O-i-Pr)_4/(R)$ -миндальная кислота/*t*-BuOOH [1, 4]. Структуры полученных соединений устанавливались при помощи данных ЯМР 1H и ^{13}C (Bruker Avance, Germany), хроматомасс-спектрометрии (Turbo Mass Gold (Perkin Elmer)) и рентгеноструктурного анализа (Smart Apex II automatic diffractometer). Острую токсичность изучаемых соединений определяли при парентеральном (внутрибрюшинном) пути введения на 760 беспородных белых мышах обоего пола массой 18—20 г.

Возможность использования полученных веществ для коррекции гемостаза определяли *in vitro* на плазме крови человека. Венозную кровь 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. Верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами, которая использовалась для разведения богатой тромбоцитами плазмы до фиксированной объемной концентрации тромбоцитов и определения коагуляционного гемостаза. Плазму, обедненную микровезикулами, готовили путем фильтрации бесклеточной плазмы через мембрану с фильтрами пор 0,1 мкм (Millipore). Тромбоконцентрат получали от здоровых доноров методом автоматического цитофереза на аппарате «Haemonetics corporation MSC+» (США) и хранили в мешках из специального пластика в течение 5 сут при температуре +22—24°C и постоянном помешивании в тромбомиксере. В качестве стабилизатора препарата использовался 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Отбор проб для анализа производился в пробирки типа «Вакутейнер», которые перед подсчетом микровезикул разводили фосфатным буфером (Becton Dickinson) 1:100.



Микровезикулы в пробах плазмы по данным проточной цитометрии: **A** — на цитрате натрия, **B** — на гепарине. Dot-plot цитограмма — дифференциация микровезикул и тромбоцитов по FSC SSC по логарифмической шкале: R1 — регион тромбоцитов, R2 — регион микровезикул

Для оценки системы гемостаза применяли определение скорости агрегации тромбоцитов, тромбодинамики и поверхностно зависимых стандартных коагуляционных тестов: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое и тромбиновое время с расчетом Международного нормализованного отношения (МНО). Агрегационную активность тромбоцитов устанавливали с помощью анализатора «Chronolog Corporation» (США) по методу G. Worn. Оптическим контролем служил такой же объем плазмы, не содержащий тромбоциты. О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции по сравнению с исходной величиной. Тромбодинамика плазмы оценивалась по скорости фибринообразования на приборе «Регистратор тромбодинамики Т-2» (Россия) путем видеорегистрации роста фибринового сгустка в пространстве при активации свертывания от поверхности с иммобилизованным тканевым фактором. Коагуляционную активность определяли на коагулометре «Минилаб-7001» (Россия). Тромбоцитарные микровезикулы находили с помощью проточного цитометра FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). Абсолютное количество микровезикул в 1 мкл определяли по светорассеиванию за фиксированное время (60 с) с использованием программы Cell Quest [2, 9].

В определениях спонтанной агрегации тромбоцитов и коагуляционной активности плазмы использовалась венозная кровь больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и выраженными гиперкоагуляционными изменениями в системе гемостаза, а индуцированная агрегация тромбоцитов исследовалась на плазме, полученной от здоровых доноров. С этой целью к 0,45 мл плазмы добавляли 0,05 мл раствора, содержащего 17 мМ препарата в растворе этилового спирта, и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при температуре 37°C. В контрольных опытах к плазме добавляли растворитель, используемый для приготовления препарата (8—32,45% водного раствора этилового спирта). Для индукции агрегации тромбоцитов применяли растворы: АДФ (5 мкМ), адреналина (10 мкМ), коллагена (2 мкг/мл), арахидоновой кислоты (0,5 мМ) и ристомидина (1 мг/мл). Результаты исследо-

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

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты показали, что исходное вещество (β -пинен) не влияет на состояние системы гемостаза у больных ИБС, а у синтезированных на его основе соединений была обнаружена высокая антиагрегационная активность: спонтанная скорость и показатель агрегации значительно уменьшаются и достигают в некоторых случаях нормальных значений (не более 0,05 отн.ед/мин и 1,35 отн.ед/мин, соответственно) (табл. 1). Кроме того, они также снижают коагуляционную активность плазмы: нормализуется АЧТВ, увеличивается протромбиновое время и МНО. Однако при этом наши соединения не влияют на активность тромбина (тромбиновое время не изменяется). Это означает, что полученные вещества ингибируют активацию коагуляционных факторов и не изменяют их ферментативную активность.

Результаты определения влияния полученных веществ на процесс тромбодинамики также свидетельствуют об ингибировании активации коагуляционных факторов: уменьшались скорости роста фибринового сгустка (V — скорость задержки роста, V_i — начальная скорость, V_{st} — стационарная скорость), его размер (CS) и плотность (D) (табл. 2). Эти процессы в большей степени были выражены при добавлении в плазму пинанилсульфида (III) и в меньшей степени у сульфоксида (VI), которые становились более заметны при внесении его в плазму с гиперкоагуляционными свойствами, исчезали спонтанные сгустки фибрина (T_{sp}). Вместе с тем во всех случаях время задержки роста фибринового сгустка (T_{lag}) сокращалось, что, по-видимому, свидетельствует о повышении активности тканевого фактора. Наблюдаемый гипокоагуляционный эффект, очевидно, обусловлен снижением активности присутствующих в растворе микровезикул, так как подобные изменения происходят при удалении их из исследуемой плазмы, в присутствии сульфида III ($p < 0,05$) уменьшалась скорость роста фибринового сгустка (V , V_i , V_{st}).

Таблица 1

Влияние производных тиотерпеноидов пинанового ряда на агрегацию тромбоцитов и показатели коагуляционного гемостаза *in vitro* у пациентов с ИБС

Соединение в растворе C_2H_5OH	Скорость агрегации, отн.ед/мин	Показатель агрегации, отн.ед	АЧТВ, с	Протромб. время, с	МНО	Тромбинб. время, с
Без препарата (I) в 38,8% спирта, $n=14$	0,265±0,185 0,261±0,21	2,01±0,6 2,0±0,5	26,5±4,21 26,1±3,91	15,0±3,6 15,2±3,8	1,54±0,2 1,52±0,4	16,4±0,3 16,3±0,2
Без препарата (II) в 29,8% спирта, $n=14$	0,265±0,185 0,012±0,02*	2,01±0,6 1,37±0,02*	26,5±4,21 30,1±5,1*	15,0±3,6 19,2±3,4*	1,54±0,2 1,82±0,3*	15,5±0,3 15,3±0,4
Без препарата (III) в 32,6% спирта, $n=14$	0,94±0,54 0,073±0,022*	3,46±0,94 2,21±0,24*	25,96±2,9 28,34±3,6*	16,1±1,5 17,8±2,1*	1,52±0,33 1,71±0,32*	14,7±0,4 14,9±0,2
Без препарата (IV) в 21,5% спирта, $n=10$	0,723±0,495 0,031±0,022*	3,21±0,97 1,25±0,37*	27,5±5,12 29,2±5,72*	17,0±2,5 18,19±2,4*	1,74±0,41 1,91±0,29*	15,6±0,2 15,9±0,3
Без препарата (V) в 28,1% спирта, $n=8$	0,295±0,08 0,16±0,032*	2,28±0,29 1,73±0,25*	24,96±3,1 26,34±4,2*	17,22±1,11 18,5±2,21*	1,42±0,43 1,54±0,42*	16,1±0,3 16,2±0,1
Без препарата (VI) в 8,0% спирта, $n=19$	0,718±0,587 0,042±0,0091*	3,32±0,87 1,29±0,24*	25,83±2,21 30,6±1,51*	19,02±1,1 24,8±1,81*	1,22±0,14 1,54±0,11*	15,1±0,98 15,3±0,66

Примечание. I — β -пинен; II — пинанилсульфид с фрагментом меркаптоэтанола; III — пинанилсульфид с метилмеркаптоацетатным фрагментом; IV — пинанилсульфоксид с фрагментом меркаптоэтанола; V — пинанилсульфоксид с метилмеркаптоацетатным фрагментом; VI — пинанилсульфоксид с фрагментом меркаптоуксусной кислоты; n — количество измерений; * p — достоверность $< 0,05$ по сравнению с показателями без препарата.

Результаты изменения тромбодинамики в присутствии сульфида III и сульфоксида VI пинанового ряда

Раствор, n=3	Параметры						
	V, мкм/мин	Tlag, мин	V _i , мкм/мин	Vst, мкм/мин	CS, мкм	D, усл. ед.	Tsp, мин
Контроль-1 (III) в плазме	29,3±2,18	1,9±0,11	53,5±1,8	29,3±2,18	1154±25,2	24981±243	Отсутст.
(III) без MB	23,5±1,2*	1,5±0,15*	42,4±2,8*	23,5±1,2*	979±45,4*	22505±344*	Отсутст.
(VI) в плазме	20,8±1,1*	1,5±0,18*	38,6±1,2*	20,8±1,1*	862±34,3*	23704±288*	Отсутст.
(VI) в плазме	28,0±0,9	1,6±0,12*	50,9±0,8	28,0±0,9	1132±32,1	24777±228	Отсутст.
Контроль-2 (VI) в плазме	39,4±4,1	1,8±0,1	56,4±0,7	39,4±4,1	1390±35,4	31871±293	26,8±2,1
(VI) в плазме	34,7±2,1*	1,2±0,3*	58,0±0,9	34,7±2,1*	1312±29,2*	31002±340*	Отсутст.*

Примечание. Контроль-1 — плазма, полученная от здоровых доноров без препарата; контроль-2 — плазма, полученная от больных ИБС с выраженными гиперкоагуляционными проявлениями; MB — плазма, обедненная микровезикулами, n — количество измерений, *p < 0,05 по сравнению с показателями без препарата.

Наиболее растворимый в воде пинанилсульфоксид (VI) продемонстрировал высокую антиагрегационную активность — практически полностью ингибировал агрегацию тромбоцитов человека, вызываемую арахидоновой кислотой и коллагеном, а также снижал АДФ и в большей степени адреналиндуцированную агрегацию (табл. 3). Следовательно, отличительной особенностью этого соединения является его способность избирательно блокировать агрегацию тромбоцитов, вызываемую коллагеном и арахидоновой кислотой.

Таблица 3

Влияние пинанилсульфоксида с фрагментом меркаптоуксусной кислоты на индуцированную *in vitro* агрегацию тромбоцитов

Индуктор	Плазма без препарата, n=19, %	Плазма с препаратом, n=19, %
АДФ	54,41±1,56	49,33±1,31*
Нормальный показатель	50—75	50—75*
Адреналин	66,5±2,50	40,33±7,31*
Нормальный показатель	60—71	60—71#
Арахидоновая кислота	65,5±3,50	1,2±0,9*
Нормальный показатель	62—69	62—69#
Коллаген	63,33±10,21	9,8±4,1*
Нормальный показатель	50—75	50—75#
Ристомидин	66,66±6,31	70,66±1,32
Нормальный показатель	50—75	50—75

Примечание: * p < 0,05 по отношению к показателям без препарата, #p < 0,05 по отношению к норме.

Коллагенндуцированная активация тромбоцитов осуществляется в основном через их P2X₁-рецепторы [11]. В настоящее время считается, что роль P2X₁-рецепторов не столь значима для полноценной активации тромбоцитов, так как при фармакологической блокаде P2Y₁- и P2Y₁₂-рецепторов стимуляция P2X₁-рецепторов приводит лишь к изменению формы тромбоцитов [13]. Кроме того, генетически дефицитные

по P2X₁-рецепторам мыши не имели видимых проблем с точки зрения физиологического гемостаза и были устойчивы к системному тромбозу, вызываемому смесью коллагена и адреналина [7]. Однако мыши с генетически увеличенным содержанием P2X₁-рецепторов по сравнению с обычными особями более склонны к системному тромбозу [12], что и подтверждают эксперименты с селективным антагонистом P2X₁-рецепторов NF449, который угнетал активацию тромбоцитов и замедлял тромбообразование *in vivo* [8]. Все это свидетельствует о том, что потенциальные блокаторы P2X₁-рецепторов могут иметь клиническое значение.

Способность полученных веществ ингибировать активацию тромбоцитов подтверждают и результаты определения тромбоцитарных микровезикул в плазменных тромбоконцентратах. В присутствии как пинанилсульфида (III), так и в большей степени сульфоксида (VI) количество микровезикул по мере хранения увеличилось в меньшей степени, чем в контрольных образцах (табл. 4).

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, не обладают мутагенными свойствами и не являются репродуктивными ядами [10]. Наши данные также показали, что синтезированные вещества обладают низкой острой токсичностью (LD₅₀ от 2200 до 4100 мг/кг). Руководствуясь ГОСТ 12.1.007-76, изученные соединения относятся к умеренным или малотоксичным веществам и соответствует III—IV классам опасности.

Заключение. Из проведенного исследования следует, что гемокоагуляционная активность полученных веществ обусловлена селективным ингибированием агрегации тромбоцитов, уменьшением выброса микровезикул и подавлением их активности. Учитывая низкую токсичность тиотерпеноидов, серосодержащие

Таблица 4

Изменение количества микровезикул при хранении тромбоконцентрата в присутствии сульфида III и сульфоксида VI пинанового ряда

Раствор, n=3	Время			
	1 ч	2 ч	48 ч	96 ч
Контроль, число частиц в 1 мкл	55991±3228	112687±18643	380266±19458	622658±20662
Пинанилсульфид (III)	165833±16628*	170456±15674*	213583±18476*	419466±16765*
Пинанилсульфоксид (VI)	27567±4134*	45074,8±7254*	152106±10765*	249063±18897*

Примечание: n — количество измерений, *p — < 0,01 по сравнению с показателями без препарата.

соединения пинанового ряда можно использовать в трансфузиологии для стабилизации тромбоцитарных препаратов крови, а также рассматривать в качестве потенциального лекарственного средства для лечения и профилактики тромбофилии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арефьев, А.В. Разработка синтетического подхода к диастереомерночистым сульфоксидам пинанового ряда / А.В. Арефьев, В.А. Старцева, Л.Е. Никитина // Химия в интересах устойчивого развития. — 2012. — № 2. — С. 249—252.
2. Зубаиров, Д.М. Микровезикулы в крови, функции и их роль в тромбообразовании / Д.М. Зубаиров, Л.Д. Зубаирова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 167 с.
3. Никитина, Л.Е. Природные и тиомодифицированные монотерпеноиды / Л.Е. Никитина, Н.П. Артемова, В.А. Старцева. — Саарбрюккен: Изд-во «LAPLAMBERT», 2012. — 176 с.
4. Preparation and Properties of Two Polymorphic Modifications of β -Hydroxysulfoxide of the Pinane Series / A.V. Aref'ev, V.A. Startseva, L.E. Nikitina [et al.] // Russian Journal of General Chemistry. — 2012. — Vol. 82, № 3. — P. 440—445.
5. Synthesis and antifungal activity of sulfides, sulfoxides and sulfones based on (1S)-(-)- β -pinene / V.V. Gavrilov, V.A. Startseva, L.E. Nikitina [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2010. — Vol. 44, № 3. — P. 126—129.
6. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil softthree species of Artemisia onsome soil-borne phytopathogens / M. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, J. Hadian [et al.] // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. — 2006. — Vol. 71, iss. 3. — P. 1327—1333.
7. A role of the fast ATP-gated P2X₁ cation channel in thrombosis of small arteries in vivo / B. Hechler, N. Lenain, P. Marchese [et al.] // J. Exp. Med. — 2003. — Vol. 198. — P. 661—667.
8. Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-[carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino))] tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt / B. Hechler, S. Mangenat, M.L. Zighetti [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2006. — Vol. 314. — P. 232—243.
9. A heparin-based method for flow cytometric analysis of microparticles directly from platelet-poor plasma in calcium containing buffer / L.V. Iversen, O. Ostergaard, Ch.T. Nielsen [et al.] // J. Immunol Methods. — 2013. — Vol. 388 (1—2). — P. 49—59.
10. Synthesis and antifungal activity of compounds of the pinane series / L.E. Nikitina, V.A. Startseva, I.A. Vakulenko [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2009. — Vol. 43, № 5. — P. 251—254.
11. The ATP-gated P2X₁ ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen / C. Oury, E. Toth-Zsamboki, C. Thys [et al.] // Thromb. Haemost. — 2001. — Vol. 86. — P. 1264—1271.
12. Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype / C. Oury, M.J. Kuijpers, E. Toth-Zsamboki [et al.] // Blood. — 2003. — Vol. 101. — P. 3969—3976.
13. Effects of enhanced P2X₁ receptor Ca²⁺ signals functional responses in human platelets / M.G. Rolf, M.P. Mahaut-Swih // Thromb. Haemost. — 2002. — Vol. 88. — P. 495—502.

REFERENCES

1. Aref'ev, A.V. Razrabotka sinteticheskogo podhoda k diastereomernochistym sul'foksidam pinanovogo ryada [Development of synthetic approach to diastereomerically pure sulfoxides of pinane series] / A.V. Aref'ev, V.A. Starceva, L.E. Nikitina // Himiya v interesah ustoichivogo razvitiya [Chemistry for Sustainable Development]. — 2012. — № 2. — S. 249—252.
2. Zubairov, D.M. Mikrovezikuly v krovi, funkcii i ih rol' v tromboobrazovanii [Microvesicles in the blood, functions and their role in thrombus] / D.M. Zubairov, L.D. Zubairova. — M.: GEOTAR-Media, 2009. — 167 s.
3. Nikitina, L.E. Prirodnye i tiomodifitsirovannye monoterpenoidy [Natural and Thio-modified Monoterpenoids] / L.E. Nikitina, N.P. Artemova, V.A. Starceva. — Saarbrücken: Izd-vo «LAPLAMBERT», 2012. — 176 s.
4. Preparation and Properties of Two Polymorphic Modifications of β -Hydroxysulfoxide of the Pinane Series / A.V. Aref'ev, V.A. Startseva, L.E. Nikitina [et al.] // Russian Journal of General Chemistry. — 2012. — Vol. 82, № 3. — P. 440—445.
5. Synthesis and antifungal activity of sulfides, sulfoxides and sulfones based on (1S)-(-)- β -pinene / V.V. Gavrilov, V.A. Startseva, L.E. Nikitina [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2010. — Vol. 44, № 3. — P. 126—129.
6. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil softthree species of Artemisia onsome soil-borne phytopathogens / M. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, J. Hadian [et al.] // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. — 2006. — Vol. 71, iss. 3. — P. 1327—1333.
7. A role of the fast ATP-gated P2X₁ cation channel in thrombosis of small arteries in vivo / B. Hechler, N. Lenain, P. Marchese [et al.] // J. Exp. Med. — 2003. — Vol. 198. — P. 661—667.
8. Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-[carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino))] tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt / B. Hechler, S. Mangenat, M.L. Zighetti [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2006. — Vol. 314. — P. 232—243.
9. A heparin-based method for flow cytometric analysis of microparticles directly from platelet-poor plasma in calcium containing buffer / L.V. Iversen, O. Ostergaard, Ch.T. Nielsen [et al.] // J. Immunol Methods. — 2013. — Vol. 388 (1—2). — P. 49—59.
10. Synthesis and antifungal activity of compounds of the pinane series / L.E. Nikitina, V.A. Startseva, I.A. Vakulenko [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. — 2009. — Vol. 43, № 5. — P. 251—254.
11. The ATP-gated P2X₁ ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen / C. Oury, E. Toth-Zsamboki, C. Thys [et al.] // Thromb. Haemost. — 2001. — Vol. 86. — P. 1264—1271.
12. Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype / C. Oury, M.J. Kuijpers, E. Toth-Zsamboki [et al.] // Blood. — 2003. — Vol. 101. — P. 3969—3976.
13. Effects of enhanced P2X₁ receptor Ca²⁺ signals functional responses in human platelets / M.G. Rolf, M.P. Mahaut-Swih // Thromb. Haemost. — 2002. — Vol. 88. — P. 495—502.

Поступила 28.08.2014