

УДК 542

А.С. Гильмутдинова, В.А. Ермохин, П.П. Пурыгин, Н.А. Кленова¹

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 1-АДАМАНТАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Осуществлено изучение вновь синтезированных производных 1-адамantanкарбонoвой кислоты: анилид 1-адамantanкарбонoвой кислоты (N-адамантил-1-карбоксамид), 4-броманилид 1-адамantanкарбонoвой кислоты (N-(4-бромфенил)-адамантил-1-карбоксамид) на индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*. Установлено достоверное влияние на агрегацию тромбоцитов анилида 1-адамantanкарбонoвой кислоты, для 4-броманилида 1-адамantanкарбонoвой кислоты отмечалась лишь тенденция к увеличению ее интенсивности. Способность влиять на агрегацию тромбоцитов коррелирует с наличием брома в бензольном кольце. По возрастанию влияния на агрегацию можно расположить в ряд исследуемые растворители: ацетон, 2-пропанол, этанол, метанол, диметилсульфоксид.

Ключевые слова: 1-адамantanкарбонoвая кислота, индуцированная агрегация, бензольное кольцо, кровь, ацетон, этанол, метанол, диметилсульфоксид.

Введение

Лечение патологий системы свёртывания крови — тромбоцитозалиботромбоцитопении, возникающей при патологическом увеличении либо уменьшении числа тромбоцитов в крови, является важной задачей современной медицины. Как отмечают исследователи, увеличение агрегации тромбоцитов проявляется при таких заболеваниях, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, диабет и др., которые усугубляют течение болезни [1; 2]. Фармакологическим воздействием избирательного действия можно по необходимости снижать либо повышать патологические гиперагрегации тромбоцитов.

Интересные результаты были получены при исследовании физиологической активности производных 1-адамantanкарбонoвой кислоты, содержащих фрагмент

¹© Гильмутдинова А.С., Ермохин В.А., Пурыгин П.П., Кленова Н.А., 2015

Гильмутдинова Альфия Султангалиевна (alfia.90.12@mail.ru), Ермохин Владимир Анатольевич (ermochin@mail.ru), Пурыгин Петр Петрович (puryginpp2002@mail.ru), кафедра органической, биоорганической и медицинской химии, Самарский государственный университет, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Кленова Наталья Анатольевна (klenovassu@yandex.ru), кафедра биохимии, Самарский государственный университет, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

адамантана — углеводорода каркасного строения. Часть этих хорошо изученных соединений сегодня уже применяются в клинической практике, хотя имеются сотни производных, которые ждут своих исследователей [3].

В работе [4] изложены результаты изучения амидов *N*-[(адамантоил-1)-фенил]-антралиновой кислоты. Они показывают ярко выявленное подавление серотонинового отёка. Там же предположили, что происходит блокирование амидами серотониновых рецепторов сосудистой стенки.

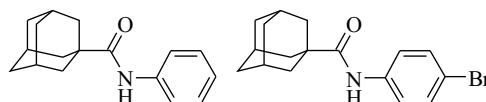
В данной работе изучено влияние производных 1-адамантанкарбоновой кислоты с различными заместителями на индуцированную агрегацию тромбоцитов человека.

Целью исследования стало изучение механизмов влияния вновь синтезированных производных 1-адамантанкарбоновой кислоты на индуцированную агрегацию тромбоцитов человека.

Исследовалось влияние синтезированных производных 1-адамантанкарбоновой кислоты на адреналин-индуцированную, АДФ-индуцированную, серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Материалы и методы исследования

Исследование влияния на индуцированную агрегацию тромбоцитов человека проведено на производных 1-адамантанкарбоновой кислоты, различающихся структурой и свойствами заместителей: анилид 1-адамантанкарбоновой кислоты (*N*-адамантил-1-карбоксамид) (I), 4-броманилид 1-адамантанкарбоновой кислоты (*N*-(4-бромфенил)-адамантил-1-карбоксамид) (II).



Данные соединения синтезированы в лаборатории кафедры органической, биоорганической и медицинской химии СамГУ [5-8]. Строение синтезированных соединений доказано данными ЯМР ^1H и ИК спектроскопии. ИК спектры соединений снимали на спектрофотометре ИКС-29 в таблетках KBr. Спектры ЯМР получены на приборе Bruker WP-200 SY (рабочая частота 200, 13 МГц). В качестве растворителя применяли DMCO-d_6 , CD_3CN , CDCl_3 . Отсчёт химических сдвигов проводили относительно сигнала ТМС. Для подтверждения индивидуальности всех полученных соединений проводили тонкослойную хроматографию на пластинках Silufol UV в этилацетате.

Биологический материал для выделения тромбоцитов предоставлен Самарской областной станцией переливания крови. Кровь, взятую из локтевой вены, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия (9:1).

Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 минут. Изучаемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде.

В качестве индуктора агрегации использовались:

- адреналина гидрохлорид в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М,

- динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) фирмы "Merck" в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М,
- растворённый в 0,154 М NaCl pH 7,2 5-гидрокситриптамин-креатин сульфат (серотонин) $1 \cdot 10^{-5}$ М.

Из источников известно, что данные концентрации соединений являются наиболее эффективными в отношении АДФ-, серотонин- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов человека [9].

Конечные концентрации всех соединений составляли 0,32–0,55 мг/мл.

Агрегация тромбоцитов исследована фотометрическим методом Борна [10]. Принцип метода основан на регистрации снижения оптической плотности исследуемой плазмы после введения в нее тромбоцитагрегирующего агента. Изменение оптических свойств исследуемой системы в процессе агрегации тромбоцитов происходит за счет уменьшения общей рассеивающей поверхности клеток в результате их склеивания друг с другом.

Оптическую плотность измеряли анализатором агрегации тромбоцитов AP 2110 (Беларусь). Стандартную статистическую обработку проводили с применением критерия Стьюдента, при этом выборка проверялась на нормальность распределения. Данные считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [11].

Результаты исследований и их обсуждение

Природа заместителей, входящих в состав молекулы производного изучена для соединения анилид 1-адамантанкарбоновой кислоты и 4-броманилид 1-адамантанкарбоновой кислоты. Было исследовано действие этих соединений на агрегацию тромбоцитов человека.

К настоящему моменту в литературе отсутствует информация о возможных механизмах влияния анилида и 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на функционирование тромбоцитарных рецепторов. Влияние веществ на скорость агрегации тромбоцитов может быть обусловлена их способностью воздействовать на серотониновые рецепторы или блокировать доступ лиганда к своему рецептору. Также возможным является агонистическое влияние на рецептор с малой константой ассоциации агониста с рецепторной молекулой.

Для проверки данных предположений были поставлены эксперименты с отобранными для дальнейших исследований соединениями без индуцирования агрегации известными агрегантами.

Установлено достоверное влияние на агрегацию тромбоцитов анилида 1-адамантанкарбоновой кислоты, для 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты отмечалась лишь тенденция к увеличению ее интенсивности. В ходе эксперимента нами было предположено, что способность влиять на агрегацию тромбоцитов коррелирует с наличием брома в бензольном кольце.

По возрастанию влияния на агрегацию можно расположить в ряд исследуемые растворители: ацетон, 2-пропанол, этанол, метанол, диметилсульфоксид.

Возрастание агрегации в данном ряду коррелирует с токсичностью данных растворителей. Для испытаний исследуемых соединений на агрегацию тромбоцитов более логично было взять ацетон (из-за его наименьшего воздействия на агрегацию или спирты). Но из-за возможности их взаимодействия с индукторами агрегации (адреналин, серотонина адипинат, АДФ) нами был использован в качестве растворителя более инертный диметилсульфоксид.

Адреналин, связываясь с α -адренорецепторами мембраны тромбоцитов, ингибирует аденилатциклазу. Предполагается, что ускоряющий агрегацию тромбоцитов эффект адреналина связан с модуляцией мембран при его взаимодействии с α -адренорецепторами и изменением её проницаемости к ионам Ca^{2+} . Показано, что антагонисты α -адренорецепторов способны блокировать агрегацию, а агонисты усиливают её, поскольку активированные G_i -белки ингибируют аденилатциклазу.

Для проверки данных предположений были поставлены эксперименты с отобранными для дальнейших исследований соединениями с индуцированием агрегации адреналином.

Установлено достоверное снижение агрегации тромбоцитов при воздействии анилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на индуцированную агрегацию адреналином на 64 %, для 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты отмечалась лишь уменьшение интенсивности агрегации на 58 %. В ходе эксперимента нами было предположено, что способность влиять на агрегацию тромбоцитов коррелирует с возможностью воздействовать на α -адренорецепторы.

Влияние веществ на скорость агрегации тромбоцитов может быть обусловлено их способностью воздействовать на α -адренорецепторы или каким-либо образом блокировать доступ лиганда к своему рецептору. Также возможным является агонистическое влияние на рецептор с малой константой ассоциации агониста с рецепторной молекулой.

Аденозин-5'-дифосфат, связываясь с α -адренорецепторами мембраны тромбоцитов, ингибирует аденилатциклазу. Предполагается, что ускоряющий агрегацию тромбоцитов эффект аденозин-5'-дифосфата связан с модуляцией мембран при его взаимодействии с α -адренорецепторами и изменением её проницаемости к ионам Ca^{2+} .

Для проверки данных предположений были поставлены эксперименты с отобранными для дальнейших исследований соединениями с индуцированием агрегации аденозин-5'-дифосфатом.

Установлено достоверное снижение агрегации тромбоцитов при воздействии анилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на индуцированную агрегацию аденозин-5'-дифосфатом на 60 %, для 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты отмечалась лишь уменьшение интенсивности агрегации на 56 %.

В ходе эксперимента нами было предположено, что способность влиять на агрегацию тромбоцитов коррелирует с возможностью воздействия на α -адренорецепторы.

Влияние веществ на скорость агрегации тромбоцитов может быть обусловлено их способностью воздействовать на α -адренорецепторы или каким-либо образом блокировать доступ лиганда к своему рецептору. Также возможным является агонистическое влияние на рецептор с малой константой ассоциации агониста с рецепторной молекулой.

Влияние веществ на скорость агрегации тромбоцитов может быть обусловлено их способностью усиливать сродство серотонина к рецепторам (синергисты) или каким-либо образом блокировать доступ лиганда к своему рецептору. Также возможным является агонистическое влияние на рецептор с малой константой ассоциации агониста с рецепторной молекулой.

Для проверки данных предположений были поставлены эксперименты с отобранными для дальнейших исследований соединениями с индуцированной агрега-

цией серотонином. Исследования показали, что все выбранные производные адамантана являются агонистами агрегации.

Установлено достоверное влияние на агрегацию тромбоцитов, отмечалась лишь тенденция к увеличению ее интенсивности. В ходе эксперимента нами было предположено, что способность 4-броманилида и анилида 1-адамантанкарбоновой кислоты влиять на серотонин-индуцируемую агрегацию тромбоцитов связана с геометрией молекулы.

Тромбоциты играют исключительную роль в осуществлении сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, а благодаря высокой способности адсорбировать на своей поверхности биологически активные соединения, факторы свертывания и фибринолиза, активно реагировать на изменение состава и физико-химических свойств плазмы, они участвуют в регуляции процессов и функций, осуществляемых кровью при разнообразных воздействиях на организм. Агрегацию тромбоцитов и сильное сужение сосудов индуцирует серотонин, который также синергически увеличивает эффекты тромбоксана А₂, ангиотензина II, аденозин-5'-дифосфата и коллагена [5]. Поскольку эта активность проявляется через связывание с 5-НТ₂-рецепторами в тромбоцитах и тканях сосудов [12], антагонисты периферических 5-НТ₂-рецепторов могут быть использованы при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Выводы

Анилид и 4-броманилид 1-адамантанкарбоновой кислоты оказывают различное действие на агрегацию тромбоцитов человека, что является следствием их способности влиять на функционирование разных тромбоцитарных рецепторов. Влияние анилида и 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на агрегацию тромбоцитов человека определяется их структурой. Анилид 1-адамантанкарбоновой кислоты имеет свойства агониста, для 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты отмечалась лишь тенденция к увеличению интенсивности агрегации.

Установлено достоверное снижение агрегации тромбоцитов при воздействии анилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на индуцированную агрегацию адреналином на 64 %, для 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на 58 %, при воздействии анилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на индуцированную агрегацию аденозиндифосфатом на 60 %, для 4-броманилида 1-адамантанкарбоновой кислоты на 56 %.

Анилид (I) и 4-броманилид (II) 1-адамантанкарбоновой кислоты усиливают агрегацию тромбоцитов, индуцируемую серотонином (являются агонистами агрегации). Усиливающее влияние веществ I и II при серотонин-индуцируемой агрегации тромбоцитов, по-видимому, обусловлено их способностью усиливать сродство серотонина к своим рецепторам со свойствами ионных каналов, почти не влияя на сродство к гликопротеиновым рецепторам (синергист серотонина).

Литература

- [1] Белушкина Н.Н., Северина И.С. Торможение АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов гуанидиногиолами — новым классом активаторов гуанилатциклазы и субстратов NO-синтазы // Биохимия. 1996. Т. 61. № 12. С. 2140–2146.

- [2] Изменения в активности гуанилатциклазы тромбоцитов человека при АДФ-индуцируемой агрегации / Ю.Ю. Чирков [и др.] // Бюллетень экспериментальной биол. и медицины. 1991. Т. 52. № 2. С. 152–154.
- [3] Багрий Е.И. Адамантаны: получение, свойства, применение. М.: Наука, 1989. 264 с.
- [4] Даниленко Г.И., Мохорт М.А., Триус Ф.П. Синтез и биологическая активность производных адамантана N-(адамантоил-1)антраниловой кислоты // Хим.-фарм. журн. 1973. Т. 17. № 10. С. 15–17.
- [5] Ермохин В.А. Синтез и биологическая активность адамантилпроизводных гетерофункциональных ароматических аминов и азотсодержащих гетероциклов: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Самара, 2007. 22 с.
- [6] Синтез и антибактериальная активность N-(нитрофенил)-адамантил-1-карбоксамидов и адамантансодержащих иодидов N-метилпиридиния / В.А. Ермохин [и др.] // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2007. № 6(56). С. 378–384.
- [7] Ермохин В.А., Пурьгин П.П., Зарубин Ю.П. Адамантановые производные эфиров и амидов 4-аминобензойной кислоты // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2006. 49. № 9. С. 92–96.
- [8] Ермохин В.А., Пурьгин П.П., Клёнова Н.А. Синтез и гемолитическая активность N-адамантоилзамещённых гетероциклических аминов и анилинов // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2004. № 4(34). С. 138–144.
- [9] Самаль А.Б., Черенкевич С.И., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. М.: Университетское, 1990. 104 с.
- [10] Лабораторные методы исследования системы гемостаза / В.П. Балуда [и др.]. Томск, 1980. 84 с.
- [11] Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование. Самара: Изд-во "Самарский университет", 1997. 265 с.
- [12] Marlar R.A., Kleiss A.J., Griffin J.H. An alternative extrinsic path way of human blood coagulation // Blood. 1982. V. 15. № 60. P. 13–53.

References

- [1] Belushkina N.N., Severina I.S. Inhibition of ADP-induced platelet aggregation guanidinotiolam - a new class of guanylate cyclase activators and substrates of NO-synthase. *Biokhimiia* [Biochemistry], 1996, Vol.61, no. 12, pp. 2140–2146 [in Russian].
- [2] Chirkov Y.Y., Belushkina N.N., Tkachuk I.A., Severina I.S. Changes in the activity of guanylate cyclase in human platelet aggregation induced by ADP. *Biulleten' eksperimental'noi biol. i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 1991, Vol. 52, no. 2, pp. 152–154 [in Russian].
- [3] Bagriy E.I. Adamantane: preparation, properties and application. M., Nauka, 1989, 264 p. [in Russian].
- [4] Danilenko G.I., Mokhort M.A., Trius F.P. Synthesis and biological activity of adamantane derivatives N-(1-adamantoyl)anthranilic acid. *Khim.-farm. zhurn.* [Chemical and Pharmaceutical journal], 1973, Vol. 17, no. 10, pp. 15–17 [in Russian].
- [5] Ermokhin V.A. *Sintez i biologicheskaya aktivnost' adamantilproduzvodnykh getero-funktional'nykh aromaticheskikh aminov i azotsoderzhashchikh geterotsiklov: avtoref. dis. ... kand. khim. nauk* [Synthesis and biological activity of the adamantyl derivatives heterofunctional aromatic amines and nitrogen-containing heterocycles: Extended abstract of Candidate's of Chemical Sciences thesis]. Samara, 2007, 22 p. [in Russian]

- [6] Ermokhin V.A., Zarubin Yu.P., Purygin P.P., Zolotarev P.N. Synthesis and antibacterial activity of N-(nitrophenyl)-adamantyl-1-carboxamides and containing adamantane N-methylpyridinium iodide. *Vestnik SamGU. Estestvennonauchnaia seriia* [Vestnik of SSU. Natural Science Series], 2007, 56, no. 6, pp. 378–384 [in Russian].
- [7] Ermokhin V.A., Purygin P.P., Zarubin Yu.P. Adamantane derivatives are esters and amides of 4-aminobenzoic acid. *Vestnik SamGU. Estestvennonauchnaia seriia* [Vestnik of SSU. Natural Science Series], 2006, 49, no. 9, pp. 92–96 [in Russian].
- [8] Ermokhin V.A., Purygin P.P., Klenova N.A. Synthesis and hemolytic activity of N-adamantoyl of substituted anilines and heterocyclic amines. *Vestnik SamGU. Estestvennonauchnaia seriia* [Vestnik of SSU. Natural Science Series], 2004, 34, no. 4, pp. 138–144 [in Russian].
- [9] Samal A.B., Cherenkevich S.I., Khmara N.F. Platelet aggregation: methods of study and mechanisms. M., Universitetskoe, 1990, 104 p. [in Russian]
- [10] Baluda V.P., Barkagan Z.S., Goldberg E.D. [et al.]. Laboratory methods of study of hemostatic system. Tomsk, 1980, 84 p. [in Russian]
- [11] Frolov Yu.P. Mathematical methods in biology. Computers and programming. Samara, Samarskii universitet, 1997, 265 p. [in Russian].
- [12] Marlar R.A., Kleiss A.J., Griffin J.H. An alternative extrinsic path way of human blood coagulation. *Blood*, 1982, 15, no. 60, pp. 13–53 [in English].

*A.S. Gil'mutdinova, V.A. Ermokhin, P.P. Purygin, N.A. Klenova*²

**STUDY OF THE DERIVATIVES OF 1-ADAMANTANE
CARBOXYLIC ACID TO INDUCED PLATELET
AGGREGATION HUMAN *IN VITRO***

The study of newly synthesized derivatives of 1-adamantane carboxylic acid anilide, 1-adamantanecarboxylic acid (N-adamantyl-1-carboxamide) bromanilide 1-adamantanecarboxylic acid (N-(4-bromophenyl) adamantyl-1-carboxamide) on platelet aggregation induced of human *in vitro* is implemented. A significant effect on platelet aggregation anilide 1-adamantane carboxylic acid, 4-bromanilid 1-adamantanecarboxylic acid observed a tendency to increase its intensity. The ability to affect platelet aggregation correlates with the presence of bromine in the benzene ring. Ascending effect on aggregation can be positioned in a number of investigated solvents: acetone, 2-propanol, ethanol, methanol, dimethylsulfoxide.

Key words: 1-adamantanecarboxylic acid, induced aggregation, benzene ring, blood, acetone, ethanol, methanol, dimethylsulfoxide.

Статья поступила в редакцию 2/IX/2015.
The article received 2/IX/2015.

² *Gil'mutdinova Al'fija Sultangalievna* (alfia.90.12@mail.ru), *Ermokhin VladimirAnatol'evich* (ermochin@mail.ru), *Purygin Petr Petrovich* (puryginpp2002@mail.ru), Department of Organic Chemistry, Samara State University, 1, Acad. Pavlov Street, Samara, 443011, Russian Federation.

Klenova Natal'ja Anatol'evna (klenovassu@yandex.ru), Department of Biochemistry, Samara State University, 1, Acad. Pavlov Street, Samara, 443011, Russian Federation.