

Е. В. Узикова, М. Ю. Милорадов, С. В. Булаева, А. В. Муравьев, Ж. В. Чиркова, Л. Г. Зайцев

**Исследование изменения агрегации эритроцитов при инкубации с вновь синтезированными химическими соединениями**

*Работа выполнена в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.*

В статье приводятся результаты исследования вновь синтезированных в Ярославском государственном педагогическом университете соединений 1, 2, 3, 4-тетрагидропиримидинтионового (онового) ряда на процесс объединения в агрегаты эритроцитов крови человека. Установлено, что соединения проявляют биологическую активность, угнетают агрегацию эритроцитов по сравнению с контрольным образцом. Выявлено, что наибольшее снижение агрегации эритроцитов (на 55 %) произошло при инкубации эритроцитов с 3-(4-метилбензоил)-2-(2-оксо-4-фенил-1, 2, 3, 4-тетрагидро-пиримидин-5-ил)-бензофуран-5, 6-дикарбонитрилом.

**Ключевые слова:** агрегация эритроцитов, биологическая активность, текучесть крови.

E. V. Uzikova, M. Ju. Miloradov, S. V. Bulaeva, A. V. Muravyov, Zh. V. Chirkova, L. G. Zaitsev

**Research of Red Blood Cell Aggregation Change at the Incubation with Newly Synthesized Chemical Compounds**

The present study examined the influence of unknown before some chemical compounds on the RBCs aggregation. It was investigated the biological activity of 1,2,3,4-tetrahydropyrimidinbenzofuran-5,6-dicarbonitriles. The addition of those compounds led to statistically significant decrease of the RBCs aggregation by 14–55 %.

**Keywords:** RBCs aggregation, biological activity, blood flow.

**Введение**

Развитие и совершенствование химии и химической технологии, наряду с последними достижениями микробиологии, способствует бурному развитию фармацевтической индустрии. В последнее время синтезу производных бензофурана уделяется большое внимание, что связано с определением их биологической роли и проявляемой физиологической активностью. Эта гетероциклическая система входит в состав многих природных и синтетических лекарственных препаратов [6, 10–12, 15]. Также известно, что соединения пиримидинового ряда находят применение в фармакологии как противовирусные, бактерицидные, противоопухолевые, антигипертонические и противовоспалительные препараты [15].

Вышеизложенное позволяет предположить, что сочетание бензофуранового и пиримидинового фрагментов в одной молекуле открывает широкие возможности в области исследования реологии крови. Такие соединения могут быть использованы как сигнальные молекулы, кото-

рые, попав в кровоток, оказывают влияние на микрореологические свойства клеток крови, и в том числе на агрегацию и текучесть эритроцитов. Поскольку на уровне обменных капилляров эффективность кровотока в основном определяется реологическими свойствами эритроцитов и, в первую очередь, их деформируемостью и агрегацией, то изменение их текучести будет влиять не только на степень оксигенации тканевого микрорайона, но и на доставку самого лекарственного препарата клеткам-мишеням.

Целью данного исследования было изучение микрореологических свойств эритроцитов при инкубации с синтезированными соединениями 1,2,3,4-тетрагидропиримидинтионового(онового) ряда.

**Материалы и методы исследования**

Цельную кровь (в объеме 20 мл) получали венепункцией у здоровых лиц 20–25 лет (n = 40), в донорском пункте. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 МЕ/мл). Все измерения

и манипуляции с кровью проводились в течение 4 часов после ее забора.

Для регистрации агрегации эритроцитов кровь отделяли от плазмы центрифугированием цельной крови в течение 15 минут при 3000 об/мин. Концентрированную суспензию эритроцитов (Hct = 95 %) отмывали три раза в изотоническом растворе NaCl (Hct = 40 %). Затем разделяли их на несколько аликвот и суспендировали при 37 °С в различных инкубационных средах при гематокрите равном, 40 %, в течение 15 минут. После этого исследуемые эритроциты ресуспендировали в аутологичной плазме (доводя до гематокрита 0,5 %) при комнатной температуре (21±1 °С).

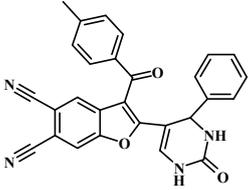
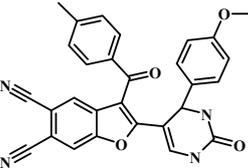
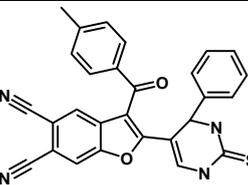
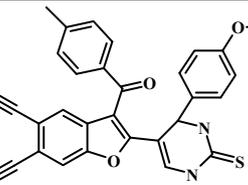
Эритроциты инкубировали с веществами, представленными в табл. 1 в концентрации 0,1 мМ. В качестве растворителя использовали димексид.

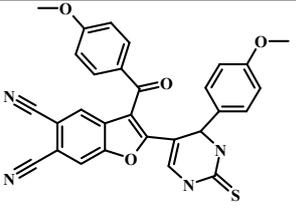
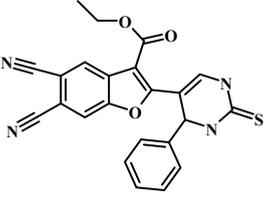
Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью метода оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения [3]. При регистрации рассчитывали показатель агрегации (ПА) как отношение числа агрегатов к количеству эритроцитов; среднее число клеток, приходящееся на один агрегат (ЧА), и интегральный индекс агрегации (ИИА), равный произведению ПА на размер агрегата (число клеток в агрегате – ЧА), который характеризует две стороны агрегации – ее интенсивность и величину.

Статистическую обработку полученных цифровых материалов и все виды анализа результатов проводили на PC IBM, используя табличный редактор Microsoft Excel и программу “Statistica” (версия 6.0).

Таблица 1

Сведения о химических соединениях, применяемых в эксперименте

Номер соединения	Формула	Название
a		3-(4-метилбензоил)-2-(2-оксо-4-фенил-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-бензофуран-5,6-дикарбонитрил
b		2-[4-(4-метоксифенил)-2-оксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]-3-(4-метил-бензоил)-1-бензофуран-5,6-дикарбонитрил
c		3-(4-метилбензоил)-2-(4-фенил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-1-бензофуран-5,6-дикарбонитрил
d		3-(4-метилбензоил)-2-(4-(4-метоксифенил)-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-1-бензофуран-5,6-дикарбонитрил

e		3-(4-метоксибензоил)-2-[4-(4-метоксифенил)-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]-бензофуран-5,6-дикарбонитрил
f		этиловый эфир 5,6-дициано-2-(4-фенил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-1-бензофуран-3-карбоновой кислоты

**Результаты исследования и их обсуждение**

По полученным данным с помощью статистических методов обработки было установлено

влияние препарата в среднем на процесс агрегации. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

*Показатели агрегации эритроцитов при инкубации эритроцитов с соответствующими 1,2,3,4-тетрагидропиримидин-2-онами(тионами) по сравнению с контролем (M±m)*

Показатели Препараты	ПА, отн. ед.	ЧА, отн. ед.	ИИА, отн. ед.
Контроль для <b>a</b>	0,040±0,008	4,722±0,261	0,209±0,042
<b>a</b>	0,018±0,003**	4,096±0,219	0,074±0,018**
Контроль для <b>b</b>	0,066±0,011	4,762±0,209	0,329±0,080
<b>b</b>	0,044±0,005*	4,534±0,189	0,199±0,047*
Контроль для <b>c</b>	0,060±0,010	4,881±0,243	0,293±0,066
<b>c</b>	0,044±0,007	4,893±0,202	0,215±0,049
Контроль для <b>d</b>	0,056±0,009	4,826±0,208	0,270±0,059
<b>d</b>	0,047±0,006	4,625±0,207	0,217±0,036
Контроль для <b>e</b>	0,052±0,011	4,761±0,185	0,248±0,056
<b>e</b>	0,044±0,008	4,719±0,226	0,214±0,048
Контроль для <b>f</b>	0,057±0,013	4,774±0,211	0,269±0,056
<b>f</b>	0,048±0,008	4,756±0,206	0,228±0,043

\* – различия достоверны при p<0,05.

\*\* – различия достоверны при p<0,01.

В ходе исследований было установлено, что присутствие в исследуемых образцах замещенных 2-[2-оксо(тиоксо)-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]бензофуран-5,6-ди-карбонитрилов приводит к заметному снижению агрегации по сравнению с

контролем (суспензией эритроцитов в физиологическом растворе) (рис. 1). Так, в случае введения раствора препарата **a** наблюдалось достоверное снижение агрегации на 55 %, **b** – на 33 %.

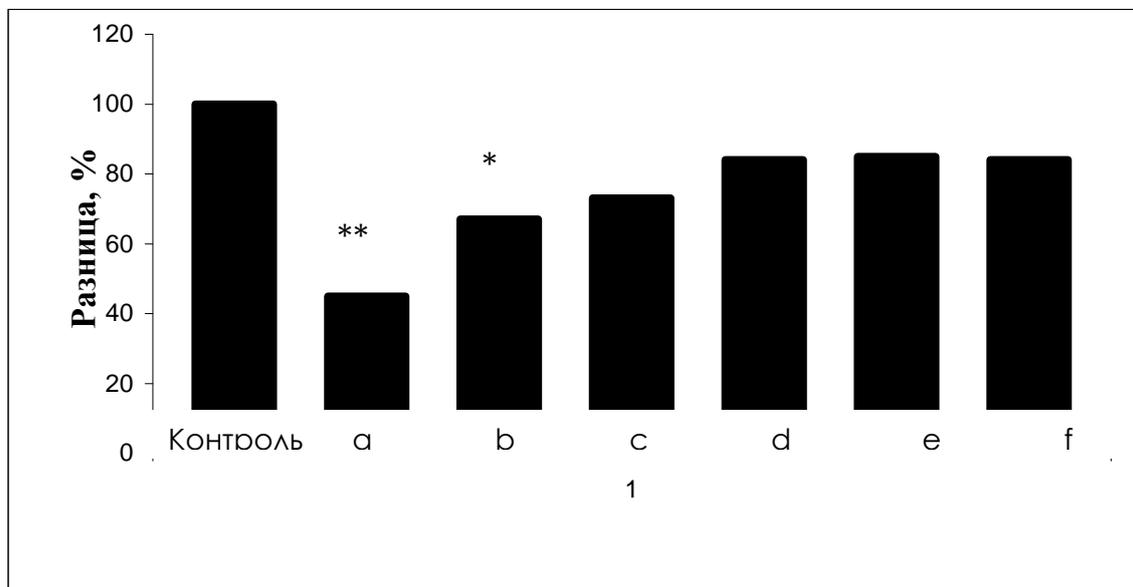


Рис. 1. Изменение агрегации (в % к контрольному раствору без препарата) эритроцитов под влияние инкубации с соединениями а – f

Снижение агрегации было статистически достоверным (табл. 2) по двум основным критериям: по показателю агрегации (ПА) и интегральному индексу агрегации (ИИА). Эти изменения следует расценивать как позитивные изменения реологической картины крови: ее текучести и транспортного потенциала. Остальные препараты также проявили тенденцию к снижению агрегации.

Исходя из химической структуры данных соединений, можно предположить, что снижение агрегации обусловлено связыванием  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке. Роль ионов кальция в процессах метаболизма клеток и регуляции их функций хорошо известна [9, 16, 18]. Ионизированный кальций участвует практически во всех физиологических процессах, и, в том числе, является основным элементом регуляторных каскадов при межклеточных взаимодействиях [8]. Около половины общего кальция плазмы находится в ионизированном состоянии, а следовательно, физиологически активно. Доля свободного кальция может изменяться при сдвигах кислотно-щелочного равно-

весия [2, 7]. Повышение содержания ионизированного кальция в плазме крови вызывает увеличение его мембранного пула, где он способен связываться с анионами (главным образом с карбоксильными группами белков и кислыми фосфолипидами). Подтверждением важной роли  $\text{Ca}^{2+}$  в клеточном взаимодействии служат данные, полученные при его связывании в среде инкубации эритроцитов. Был обнаружено снижение агрегации эритроцитов под влиянием хелатора кальция (ЭДТА) [1]. Блокатор кальциевых каналов верапамил тоже выраженно снижал агрегацию эритроцитов [1, 4, 5, 12]. Известно, что обработка хелаторами кальция почти полностью (до 90 %) удаляет мембраносвязанный кальций, локализованный на внешней стороне клеточной мембраны [6]. Ингибирование прироста агрегации после обработки соединениями 1,2,3,4-тетрагидропиримидинтионового(онового) ряда позволяет предположить участие мембраносвязанного кальция в отмеченной интенсификации процесса агрегатообразования эритроцитов.

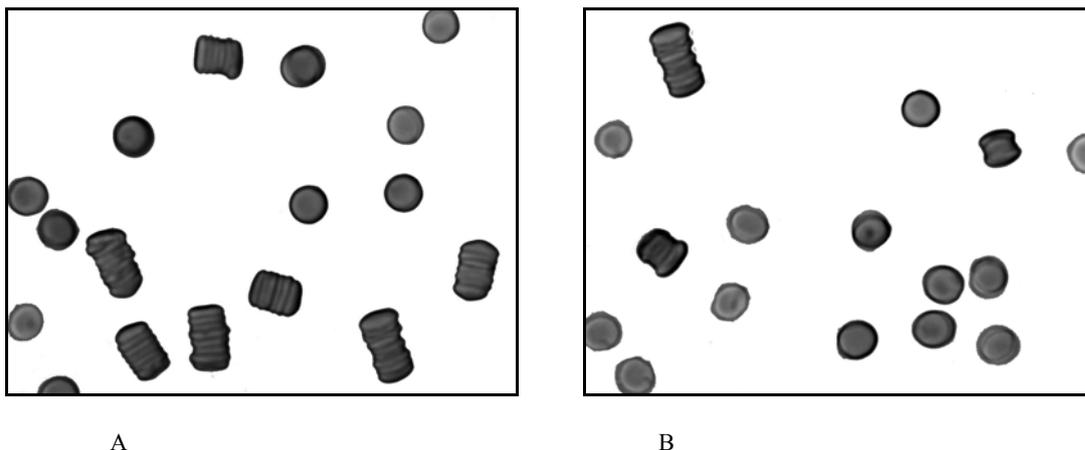


Рис. 2. Изменение агрегации эритроцитов под влиянием инкубации с а (А – без препарата, В – с препаратом а)

### Заключение

В результате исследования установлено, что соединения под шифрами «а – б» обладают биологической активностью: определен эффект влияния 2-[2-оксо(тиоксо)-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]бензофуран-5,6-дикарбонитрилов на агрегационные свойства эритроцитов. Показано, что указанные соединения угнетают агрегацию эритроцитов по сравнению с контрольным образцом. Выявлены структуры, которые в максимальной степени проявляют этот эффект, что сопровождается значитель-

ным улучшением кислородтранспортной функции крови, повышением ее текучести.

Установлено, что наибольшую биологическую активность проявил 3-(4-метилбензоил)-2-(2-оксо-4-фенил-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-бензофуран-5,6-дикарбонитрил, показавший в концентрации 0,1  $\mu\text{M}$  снижение агрегации эритроцитов на 55 %.

Таким образом, сочетание бензофуранового и пиримидинового фрагментов в одной молекуле открывает широкие возможности в области исследования реологии крови.

### Библиографический список

1. Маймистова, А. А. Роль внутриклеточных эффекторных путей эритроцитов в изменении их микрореологических свойств в норме и на фоне атеросклероза [Текст] автореф. дисс...канд. биол. наук / А. А. Маймистова. – Ярославль, 2009. – 24 с.
2. Матюшичев, В. Б., Шамратова, В. Г. Зависимость электрофоретической подвижности эритроцитов от состояния кислотно-щелочного равновесия крови [Текст] / В. Б. Матюшевич, В. Г. Шамратова // Вестник Санкт-Петербургского университета, серия 3, биология. – 2005. – Вып. 1. – С. 98–103.
3. Муравьев, А. В. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином [Текст] / А. В. Муравьев // Мат. научно-практической конференции «Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике». – СПб, 2003. – С. 78–80.
4. Орлов, С. Н. Транспорт кальция в эритроцитах, нагруженных высокоселективным хелатором  $\text{Ca}^{2+}$ . Характеристики, связанные с первичной гипертензией [Текст] / С. Н. Орлов, Н. И. Покудин, Ю. В. Постнов // Кардиология. – 1986. – Т. 26, № 11. – С. 90–96.
5. Орлов, С. Н., Новиков, К. Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение [Текст] / С. Н. Орлов // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 1996. – Т. 82, № 8–9. – С. 1–15.
6. Орлов, С. Н., Шевченко, А. С. О возможном механизме действия мембраносвязанного кальция на активность аденозинтрифосфатазы и проницаемость эритроцитов для одновалентных катионов [Текст] / С. Н. Орлов, А. С. Шевченко // Биохимия. – 1978. – Т. 43. – № 2. – С. 208–215.
7. Тихомирова, И. А. Роль экстрацеллюлярных мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов [Текст] : автореф. дисс...док. биол. наук / И. А. Тихомирова. – Ярославль, 2005. – 40 с.
8. Ткачук, В. А. Введение в молекулярную эндокринологию [Текст] / В. А. Ткачук. – М. : Изд-во МГУ, 1983. – 256 с.
9. Черницкий, Е. А., Воробей, А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран [Текст] / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск : Наука и техника, 1981. – 214 с.
10. Bakunova S. M., Bakunov S. A., Wenzler T., et al // J. Med. Chem., 50, 23, 5807.
11. Bang-Le Zhang, Fang-Dao Wang, Jian-Min Yue // Synlett, 2006, 4, 567.

12. Boykin D. W., Kumar A., Xiao G., *et al* // J. Med. Chem., 1998, 41, 124, 9.
13. Davtian T. K., Giul'khandanian A. V., Gambarov S. S. et al. The effect of adriamycin and ethidium bromide on the Ca<sup>2+</sup>-dependent K channel of human erythrocytes // Tsitologija. – 1996. – Vol. 38. – № 2. – P. 135–144.
14. Jauk B., Pernat T., Kappe C. O. // Molecules, 2000, 5, 227.
15. Kappe C. O. 100 Years of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Tetrahedron 1993, 49, 6937-6963.
16. Miller C. An overview of the potassium channel family // Genome Biology. –2000. – Vol. 1. – № 4. – P. 41–45.
17. Ohemeng K.A., Appollina M.A., Nguyen V.N., *et al* // J. Med. Chem., 1994, 37, 3663.
18. Wiley J.S., McCulloch K.E. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. Pharmacol. Ther. – 1982. – Vol. 18. – № 2. – P. 271–292.