

Е. В. Узикова, М. Ю. Милорадов, В. Н. Левин, С. В. Булаева, А. В. Муравьев, Ж. В. Чиркова

Исследование изменения агрегации эритроцитов при инкубации с замещенными 4-гидрокси-6,7-дициано-1,4-бензоксазин-3-онами

Исследования выполнены при поддержке РФФИ грант №09-04-00436-а.

В статье приводятся результаты исследования влияния синтезированных в Ярославском государственном техническом университете 4-гидрокси-6,7-дициано-1,4-бензоксазин-3-онов [5] на процесс объединения в агрегаты эритроцитов крови человека. Выявлено, что данные соединения способствуют значительному снижению агрегации эритроцитов по сравнению с контрольным образцом (суспензией эритроцитов в физиологическом растворе).

Ключевые слова: 4-гидрокси-6,7-дициано-1,4-бензоксазин-3-оны, агрегация эритроцитов, биологически активные составы, протеинфосфатазы.

E. V. Uzikova, M. Ju. Miloradov, V. N. Levin, S. V. Bulaeva, A. V. Muravyov, Zh. V. Chirkova

Research of Change of Red Blood Cell Aggregation during Incubation with 4-hydroxy-6,7-dicyano-benzoxazine-3-ones

The present study was designed to investigate the effect of 4-hydroxy-6,7-dicyano-benzoxazine-3-ones on the RBCs aggregation. It has been found that these compounds can significantly decrease the red blood cell aggregation.

Keywords: 4-hydroxy-6,7-dicyano-benzoxazine-3-ones, RBC aggregation, biologically active compounds, protein phosphatase.

Введение

Производные 1,4-бензоксазин-3-онов являются важными гетероциклическими системами. Входят в состав как природных, так и синтетических соединений. Они часто используются как основа для синтеза биологически активных составов в широких пределах от гербицидов, фунгицидов и пестицидов до терапевтически активных лекарственных средств [8, 10, 12].

В настоящее время в медицине применяются препараты, в состав которых входят бензоксазиновые фрагменты, например: Азасетрон, Бизоксатин. На основе 1,4-бензоксазин-3-онов разрабатывается новый класс потенциальных антитромбических составов, замедляющих образование тромбина, а также влияющих на активность фибриногена, и реологические свойства крови [13]. Производные 4-гидрокси-1,4-бензоксазин-3-она интенсивно исследуются, и за последние 50 лет опубликовано уже более 500 работ, касающихся различных аспектов химии и биологии этого класса соединений. Наиболее важными из производных 1,4-бензоксазин-3-онов являются N-гидроксипроизводные.

Путем скрининга было установлено, что полученные соединения способны ингибировать активность фосфатаз. Протеинфосфатазы – большая группа малоизученных ферментов, осуществляющих процесс дефосфорилирования субстратов и разносторонне влияющих на функциональную активность других ферментных систем и функцию клеток, в частности, эритроцитов. В связи с этим целью данной работы являлось исследование влияния замещенных 4-гидрокси-6,7-дициано-1,4-бензоксазин-3-онов на процесс объединения в агрегаты эритроцитов крови человека.

Материалы и методы исследования

Цельную кровь (в объеме 20 мл) получали венепункцией у здоровых лиц 20–25 лет (n=32), 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 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 аликутов и суспендировали при 37°C 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 %). Измерения агрегации проводили при комнатной температуре (21±1 °C).

Эритроциты инкубировали с веществами, представленными в таблице 1. В качестве растворителя использовали димексид.

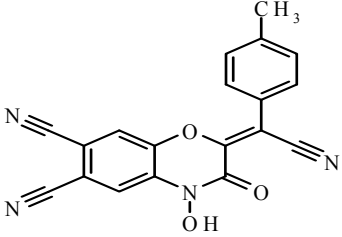
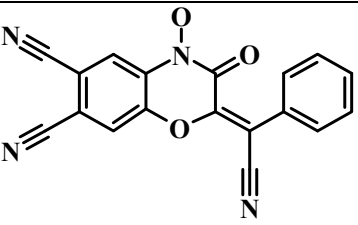
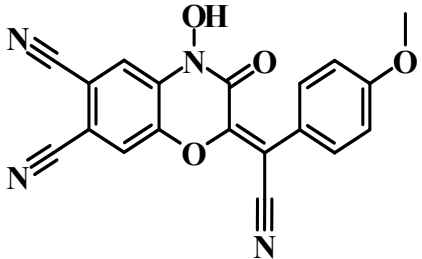
Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью метода оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным

анализом изображения [2]. 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 ЧА, который характеризует процент проагрегировавших клеток.

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

Некоторые сведения о веществах, применяемых в эксперименте

№ п/п	Формула	Название	Концентрация, М
Препарат 1		(2E)-2-[циано(метилфенил)-метилен]-4-гидрокси-3-оксо-3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-6,7-дикарбонитрил	0,1 μмоль
Препарат 2а		(2E)-2-[циано(фенил)-метилен]-4-гидрокси-3-оксо-3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-6,7-дикарбонитрил	100μмоль
2б			0,1 μмоль
2с			0,1 μмоль
Препарат 3		(2E)-2-[циано(метоксифенил)-метилен]-4-гидрокси-3-оксо-3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-6,7-дикарбонитрил	0,1 μмоль

Результаты и обсуждение

По полученным данным с помощью статистических методов обработки было установлено влияние препарата в среднем на процесс агрега-

ции. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2

Таблица 2

Показатели агрегации эритроцитов при введении раствора препарата по сравнению с контролем ($M \pm m$)

Показатели \ Препараты	ПА, отн. ед.	ЧА, отн. ед.	ИИА, отн. ед.
Контроль для 1	0,054±0,015	4,875±0,244	0,275±0,082
Препарат 1	0,040±0,006	4,736±0,184	0,194±0,036
Контроль для 2	0,066±0,014	4,762±0,209	0,329±0,08
Препарат 2a	0,040±0,008*	4,526±0,162	0,191±0,042
Препарат 2b	0,026±0,004**	4,342±0,179	0,112±0,017**
Препарат 2c	0,033±0,005**	4,706±0,219	0,159±0,029**
Контроль для 3	0,066±0,012	4,704±0,202	0,315±0,062
Препарат 3	0,045±0,009	4,271±0,311	0,272±0,070

* – различия достоверны при $p < 0,05$.

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

В ходе исследований было установлено, что присутствие в исследуемых образцах замещенных 4-гидрокси-6,7-дициано-1,4-бензоксазин-3-онов способствовало значительному снижению агрегации по сравнению с контролем (суспензией эритроцитов в физиологическом растворе).

При инкубации эритроцитов с соединениями 1 и 3 наблюдалась тенденция к снижению агрегации на 26 % и 32 % соответственно (рис. 1).

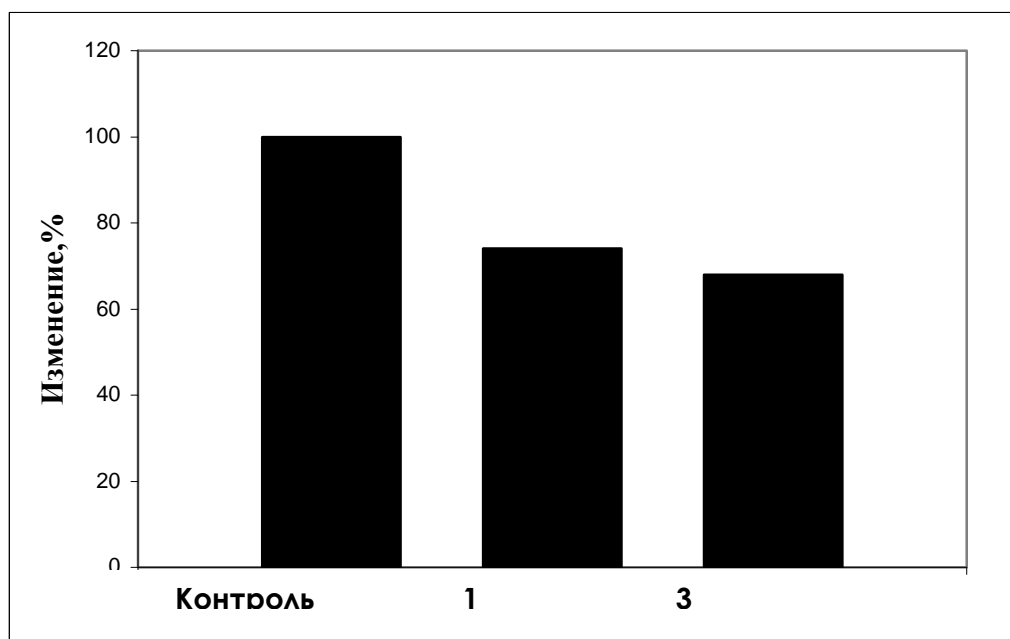


Рис. 1. Изменение агрегации эритроцитов под влияние инкубации с соединениями 1 и 3 (в % к данным контроля)

При исследовании соединения **2 (а-с)** получено достоверное снижение агрегации эритроцитов, которое составило от 39 до 61 % (рис. 2).

Наибольшее снижение агрегации наблюдалось при концентрации 0,1 μ моль.

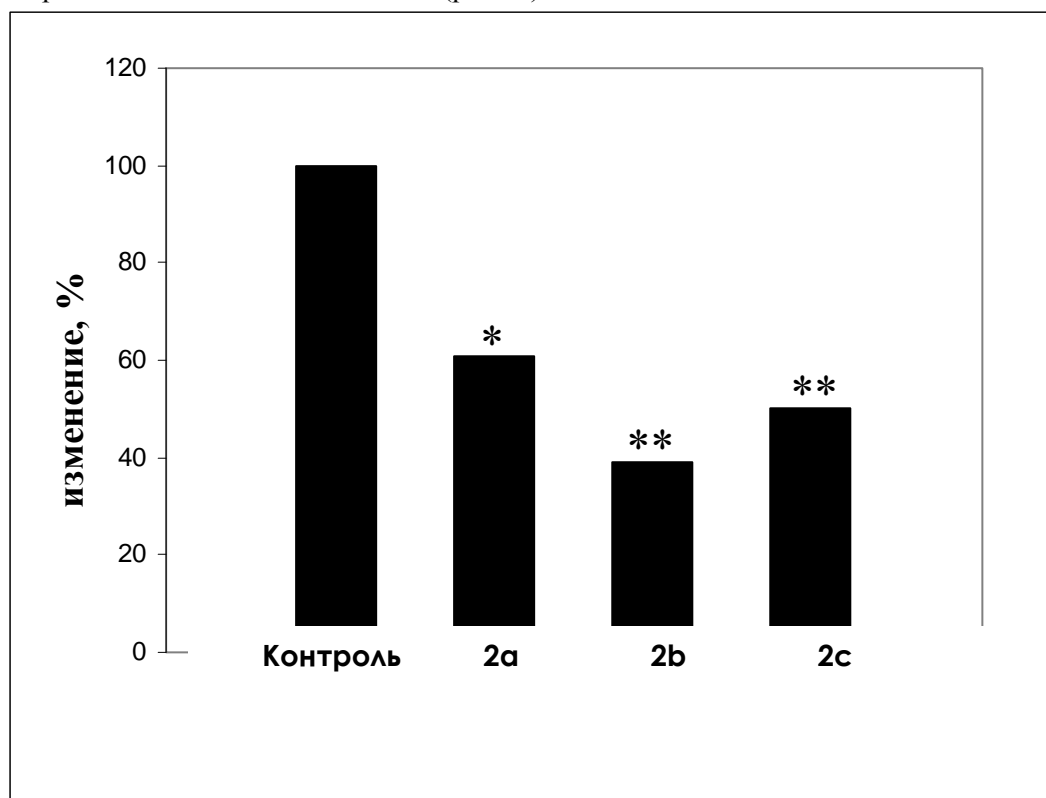


Рис. 2. Изменение агрегации (в % к контролю) эритроцитов под влиянием инкубации с (2E)-2-[циано(фенил)метил]-4-гидрокси-3-оксо-3,4-дигидро-2H-1,4-бензоксазин-6,7-дикарбонитрилом

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 сдвиги реологической картины крови: ее текучести и транспортного потенциала.

Исходя из химической структуры данных соединений, можно предположить, что снижение агрегации обусловлено ингибированием фосфатаз, что соответственно приводит к активации протеинкиназ [9].

Известно несколько типов протеинкиназ, активируемых различными эффекторами. Например, протеинкиназа А, стимулируемая при помощи цАМФ [4, 6, 7], и протеинкиназа С, которая, являясь подмембранным белком, осуществляет фосфорилирование по остаткам серина и треонина [3, 14]. В эритроцитах представлены также и тирозиновые протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование белков, в частности, белка полосы 3 по тирозиновым остаткам, которые можно активировать ги-

пертоническим раствором или повышением внутриклеточного Ca^{2+} [11, 14].

Протеинфосфатазы – большая группа малоизученных ферментов, осуществляющих процесс дефосфорилирования субстратов (то есть возвращение белковой молекулы в исходное состояние). Известно, что ингибирование активности тирозиновых протеинфосфатаз должно приводить к повышению активности тирозиновых протеинкиназ [9]. Большинство протеинкиназ клетки, осуществляя процесс фосфорилирования ключевых белков мембраны, сопровождающийся мгновенным изменением их конфигурации и свойств, могут участвовать в изменениях микрореологических свойств крови, и в частности, агрегации и эластичности мембраны эритроцитов [1, 6, 7,].

Сходный эффект был обнаружен при инкубации эритроцитов с ортованадатом натрия и эритропозитином, которые являются активаторами тирозиновых протеинкиназ [1].

Таким образом, синтез соединений 4-гидрокси-6,7-дициано-1,4-бензоксазин-3-онового ряда дает возможность изучать молекулярные механизмы изменения микрореологических ха-

рактеристик клеток крови, а также проводить дальнейшие доклинические исследования данных соединений.

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. Муравьев, А. В. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином [Текст] / А. В. Муравьев // Мат. научно-практическая конференции «Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике». – СПб., 2003. – С. 78–80
3. Andrews D.A., Lu Yang, Low P.S. Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, N 9. – P. 3392–3399.
4. Boivin P., Garbarz M., Dhemy D., Galand C. In vitro phosphorylation of the red blood cell cytoskeleton complex by cyclic AMP-dependent protein kinase from erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1981. – Vol. 21. – P. 1–6.
5. Chirkova Zh. V., Filimonov S. I., Abramov. I. G. et al. Synthesis of novel substituted 4-hydroxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-6,7-dicarbonitriles // *Heterocycles*. – 2011. - Vol. 83, № 4. – P 755 - 763.
6. Eder P.S., Soong C.J., Tao M. Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin // *Biochemistry*. – 1986. – Vol. 25. – P. 1764–1770.
7. Ling E., Danilov Y.N., Cohen C.M. Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 15. – P. 2209–2216.
8. Macas F.A., Marn D., Oliveros-Bastidas A. // *Nat. Prod. Rep.*, 2009, 26, 478–489.
9. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 7581–7587.
10. Martindale The Complete Drug Reference, /Thirty-sixth edition. / Edited by Sean C Sweetman, Pharmaceutical Press, 2009.
11. Minetti G., Ciana A., Balduini C. Differential sorting of tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases acting on band 3 during vesiculation of human erythrocytes // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 377. – P. 489–497.
12. Oeztuerk S., Ozturk A.M., Hakan G., Nurten A. // *IL Farmaco*, 2000, 55, 715–718.
13. Stefanic Anderluh P., Anderluh M., Ilas J. // *J. Med. Chem.*, 2005, 48 (9), 3110-3113.
14. Zipser Y., Piade A., Barbul A., Korenstein R., Kosower N.S. Ca²⁺ promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3 // *Biochem. J.* – 2002. – Vol. 15, N 368. – P. 137–144.