

**ТИЕТАНСОДЕРЖАЩИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИМИДИН-2,4-(1H,3H)-ДИОНА –
КОРРЕКТОРЫ НАРУШЕНИЙ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ,
ВЫЗВАННЫХ ОКСИДАТИВНЫМ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫМ СТРЕССОМ**

**Петрова И.В.¹, Катаев В.А.¹, Фархутдинов Р.Р.¹, Мочалов К.С.¹, Баймурзина Ю.Л.¹,
Мещерякова С.А.¹, Мунасипова Д.А.¹**

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: cnilbgmu@yandex.ru

Исследовано влияние тиетансодержащих производных пиримидин-2,4-(1H,3H)-диона на лейкоциты крови экспериментальных животных в норме и под действием физического и психоэмоционального стресса. Для создания психоэмоционального напряжения и оксидативного стресса животных подвергали плавательной нагрузке. Производили подсчет количества лейкоцитов крови, исследовали функциональную активность фагоцитирующих клеток в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ). Оценивали спонтанный и индуцированный тест-НСТ посредством подсчета числа активированных фагоцитов. Фагоцитарную активность лейкоцитов также оценивали по фагоцитарному числу и фагоцитарному индексу. С помощью хемилюминесцентного метода была оценена относительная емкость функционального резерва фагоцитов крови. Показано, что тяжелая мышечная работа вызывает угнетение кислородзависимого метаболизма в фагоцитах и генерацию ими активных форм кислорода. Обнаружено, что введение новых пиримидиновых производных в организм животных, испытывающих окислительный стресс вследствие физической нагрузки, восстанавливает окислительные процессы фагоцитарной защиты.

Ключевые слова: тиетансодержащие производные пиримидин-2,4-(1H,3H)-диона, фагоцитарная активность, оксидативный стресс.

**THIETHANE-CONTAINING DERIVATIVES OF PYRIMIDINE-2,4-(1H, 3H)-DIONE -
CORRECTORS PHAGOCYtic ACTIVITY VIOLATIONS OF BLOOD, CAUSED BY
OXIDATIVE AND PSYCHOEMOTIONAL STRESS**

**Petrova I.V.¹, Kataev V.A.¹, Farkhutdinov R.R.¹, Mochalov K.S.¹, Baimurzina Y.L.¹,
Mesheryakova S.A.¹, Munasipova D.A.¹**

¹Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: cnilbgmu@yandex.ru

The effect of thiethane-containing derivatives of pyrimidine-2,4-(1H, 3H)-dione on blood leukocytes of experimental animals in normal and under the influence of physical and psychoemotional stress was investigated. The animals were swimming load to create emotional and oxidative stress. The number of white blood cells was counted. The functional oxidative activity of phagocytic cells was determined by the Nitro Blue Tetrazolium test (NBT). Spontaneous and induced NBT were assessed by counting the number of activated phagocytes. The phagocytic activity of leukocytes was assessed by phagocytic number and phagocytic index. Relative blood functional reserve capacity of phagocytes was assessed using a chemiluminescent method. It is shown that heavy muscular work causes oppression of oxygen-dependent metabolism in phagocytes and the generation of active oxygen species by them. It was found that introduction of new thiethane-containing derivatives of pyrimidine-2,4-(1H, 3H)-dione into the living organism, that experiences oxidative stress due to physical exertion, restores the oxidative processes of phagocytic defense.

Keywords: thiethane-containing derivatives of pyrimidine-2,4-(1H, 3H)-dione, phagocytic activity, oxidative stress.

Актуальной задачей современной медицины является поиск новых высокоэффективных лекарственных препаратов, обладающих способностью корректировать нарушения фагоцитарной активности крови, вызванные оксидативным и психоэмоциональным стрессом. Известно, что стрессорная реакция сопровождается психофизическим напряжением всего организма [1; 2] и направлена на сохранение

многоуровневого гомеостаза [3]. При интенсивной физической нагрузке возникает синдром перетренированности, в развитии которого важное место принадлежит усилению образования активированных форм кислорода и интенсификации реакций перекисления липидов, а также снижению энергообеспечения клеток при окислительном фосфорилировании [4; 5].

В настоящее время практическое здравоохранение нуждается в создании новых препаратов с восстановительным типом действия не однократного, а курсового применения [6; 7]. Новые тиапиримидинсодержащие производные пириимидин-2,4-(1Н,3Н)-диона (ТПП), синтезируемые в Башкирском государственном медицинском университете под руководством д. фарм. н. В.А. Катаева [8], в перспективе могут быть отнесены к таковым средствам.

Некоторые особенности производных пириимидина необходимы для особых задач: они способны к стэкинг-взаимодействию с остатками ароматических аминокислот в составе ферментов (рецепторов), а также могут образовывать связи посредством заместителей пириимидинового цикла или атомов кислорода карбонильных фрагментов [7]. Пириимидиновые нуклеотиды являются структурными составляющими ДНК и РНК, а также многих ферментов. Тем самым определенные участки макромолекул способны к взаимодействию с нуклеотид-подобными точками фиксации молекул [7].

Как следует из данных литературы, пириимидиновые производные при введении в организм могут включаться в ДНК и РНК различных тканей (мышцы, мозг и др.), при наличии соответствующих ферментов фосфорилирования [7; 9]. Эта способность определяется функциональным состоянием тканей, например состоянием мышечной ткани, при высокой физиологической активности. Предполагается, что в механизме действия пириимидиновых производных на белковый обмен важное значение имеет снижение активности протеолиза в тканях организма [6; 7; 9].

Ранее нами на модели физической нагрузки была исследована способность ТПП корректировать нарушения поведенческих реакций и процессы оксидативного стресса в гомогенатах мозга и печени лабораторных животных. Было показано, что введение исследуемых препаратов лабораторным животным на фоне физической нагрузки сохраняет поведенческую активность и замедляет интенсивность оксидативного стресса [10].

Существенным компонентом развития стрессорной реакции являются изменения и нарушения клеточного – фагоцитарного звена иммунитета, в первую очередь их окислительного метаболизма. В этой связи представляет интерес изучение влияния ТПП на фагоцитарную функцию лейкоцитов при действии стрессорных агентов (интенсивная физическая нагрузка).

Можно предположить, что за счет присущей пиримидинам способности стимулировать клеточный метаболизм, активировать восстановительные процессы в клетках, стимулировать регенерацию поврежденных элементов клетки вероятны расширение функциональных возможностей организма и коррекция нарушений фагоцитарной активности крови после стрессового воздействия [6; 7; 11].

Целью данного исследования явилось изучение влияния новых ТПП на баланс свободнорадикального окисления фагоцитов крови лабораторных животных в норме и при стрессе, обусловленном интенсивной физической нагрузкой.

Материал и методы

Исследования проводили на 50 белых нелинейных крысах-самцах (190-240 г), которых содержали в виварии в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum* по 10 особей в клетке при естественном световом режиме, в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ Минздравсоцразвития России № 708Н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Животным в течение 24 дней вводили тиетансодержащие производные пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-диона внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг в виде суспензии на 2% крахмальной слизи. Животных разделили на 5 групп: (К) - группа контроля (интактная), первая группа получала интенсивную физическую нагрузку (ИФН) без препаратов, вторая, третья и четвертая группы подвергались ежедневно ИФН и получали соединения ТПП под лабораторными шифрами 1, 9 и 10 соответственно: 1 – препарат сравнения 5-гидрокси-6-метилурацил (ОМУ, Иммурег), применяемый в медицинской практике, 9 - 5-гидрокси-6-метил-1-(тиетан-3-ил)пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-дион, 10 - 6-метил-5-морфолинометил-1-(тиетан-3-ил)пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-дион.

На фоне введения препаратов все экспериментальные животные (исключая контрольную) подвергались ИФН по методике Рыловой М.Л. [12]. В качестве бассейна использовалась емкость 1,7 м в диаметре, высота краев - 50 см, которая наполнялась водой на 30 см. Температура воды поддерживалась на уровне 25 ± 1 °С. Лабораторных крыс помещали в бассейн на 25 мин по 5 особей. Плавание продолжительной длительности приводит к интенсивной мышечной работе и вместе с другими физическими и химическими факторами используется для моделирования в эксперименте у животных состояния психоэмоционального перенапряжения и оксидативного стресса [12].

Животные были выведены из эксперимента посредством декапитации под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии согласно Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и правилам проведения работ с экспериментальными животными.

Далее производили подсчет количества лейкоцитов крови, исследовали функциональную активность фагоцитирующих клеток в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ). Оценивали спонтанный и индуцированный тест-НСТ посредством подсчета числа активированных фагоцитов [13]. Количество лейкоцитов оценивали общепринятым способом в камере с сеткой Горяева. Проводили морфологическую оценку состава клеток периферической крови с определением различных видов лейкоцитов в окрашенных азуром и эозином мазках (лейкограмма). Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали по методу Л.З. Клечикова, высчитывались фагоцитарное число и фагоцитарный индекс [14].

Исследовали хемилюминесценцию, усиленную люминолом (ХЛ), на приборе хемилуминомер ХЛ-003 (Россия) [15]. Для определения емкости резерва функциональной активности фагоцитарных клеток крови использовали формулу:

$$X = (I_{\max \text{ инд}} - I_{\max \text{ сп}}) / I_{\max \text{ сп}},$$

где X – соотношение резерва функциональной активности к спонтанной хемилюминесценции фагоцитарных клеток крови; $I_{\max \text{ инд}}$ – максимальная интенсивность свечения индуцированной зимозаном крови; $I_{\max \text{ сп}}$ – максимальная интенсивность спонтанного уровня свечения фагоцитов крови.

Результаты оценивали с использованием пакета программ Statistica v. 10 (StatSoft). Высчитывали критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни; результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Одним из ответов на стрессорную реакцию, вызванную физической нагрузкой, является изменение общего количества лейкоцитов крови лабораторных животных.

На рисунке 1 представлено влияние мышечной работы на морфологический состав крови крыс: после воздействия ИФН в крови возрастало количество лимфоцитов и эозинофильных лейкоцитов, увеличивалась доля палочкоядерных нейтрофилов, но уменьшалась доля сегментоядерных. Число моноцитов существенно не менялось. После курсового применения ТПП на фоне ИФН значительно увеличивалось число сегментоядерных нейтрофилов. Другие параметры клеточного состава крови в целом оставались в пределах контрольных значений.

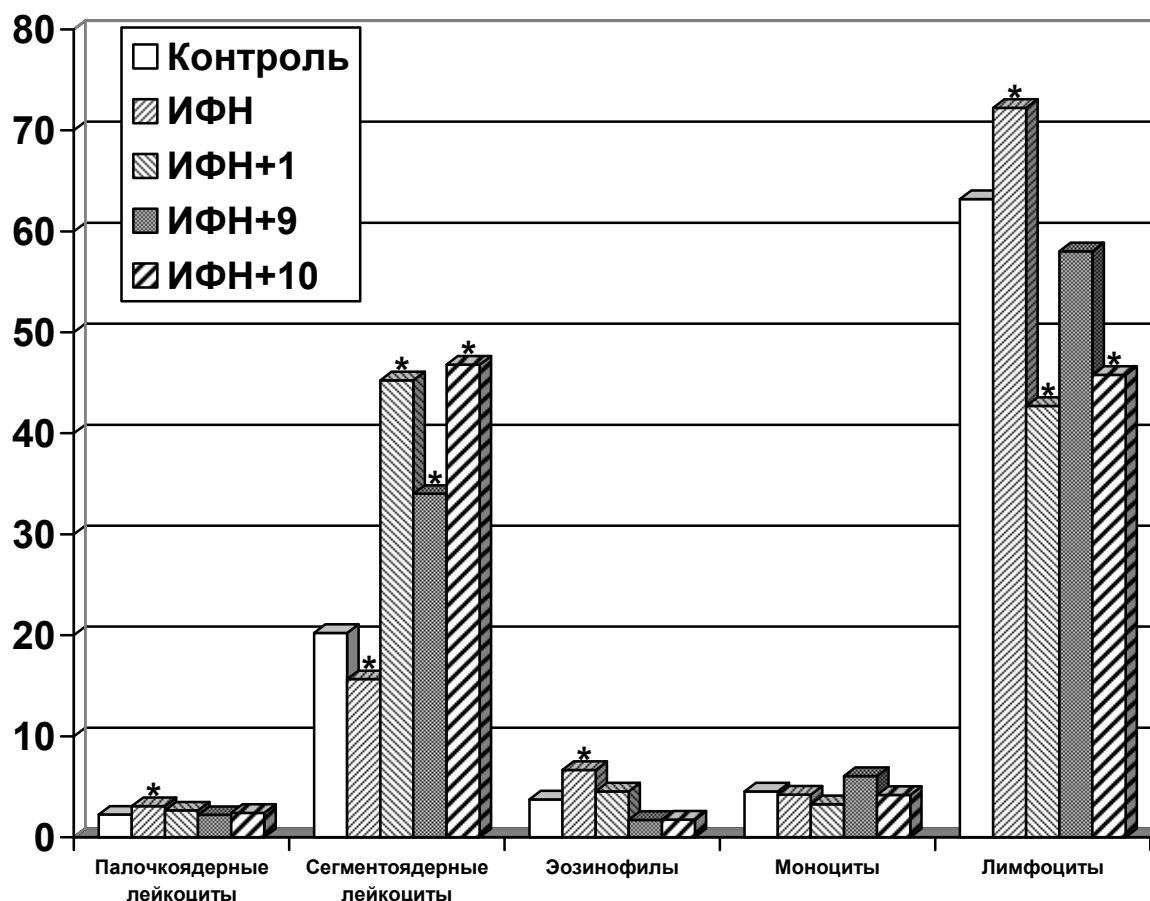


Рис. 1. Параметры морфологического состава крови экспериментальных животных: на фоне интенсивной физической нагрузки - ИФН и введения титансодержащих производных пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-диона

Примечание. Статистические показатели представлены в виде $M \pm m$ для 10 измерений в группе.
*Достоверное различие при $p < 0,05$.

Для оценки функционально-метаболического состояния фагоцитарных клеток (нейтрофилы, моноциты) определяли их поглотительную способность и уровень активации кислородзависимого метаболизма циркулирующих фагоцитов (преимущественно нейтрофилов) в тесте восстановления нитросинего тетразолия.

На рисунке 2 представлены показатели фагоцитарной активности лейкоцитов: фагоцитарное число и фагоцитарный индекс при введении ТПП на фоне физической нагрузки.

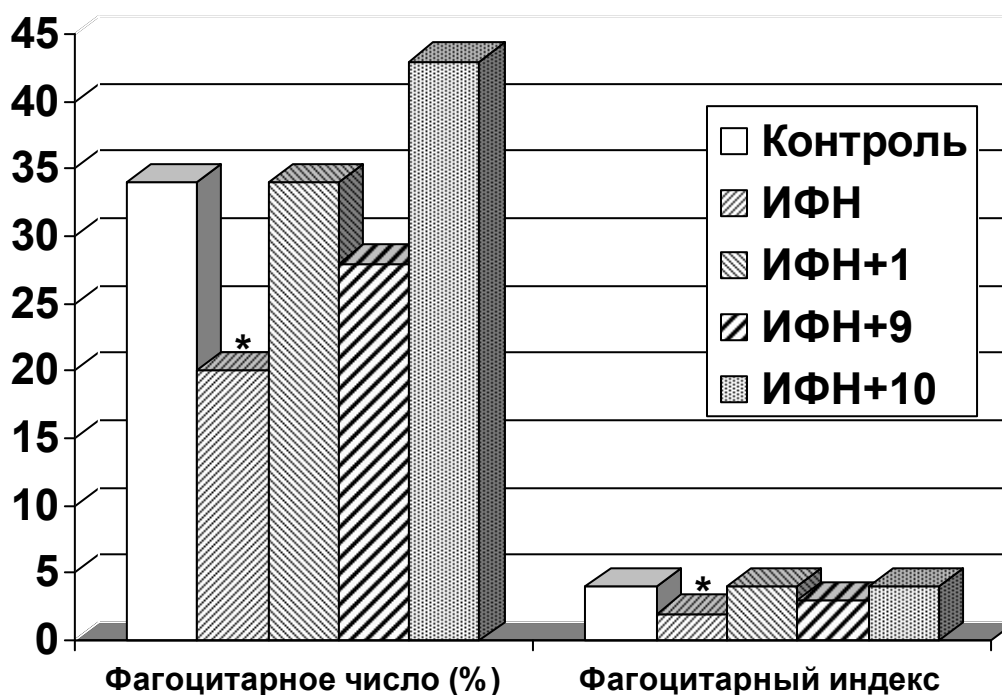


Рис. 2. Параметры функциональной активности циркулирующих фагоцитов: фагоцитарное число и фагоцитарный индекс на фоне ИФН и введения тиагансодержащих производных пиримидин-2,4-(1H,3H)-диона

Примечание. Статистические показатели представлены в виде $M \pm m$ для 10 измерений в группе.

*Достоверное различие при $p < 0,05$.

Как видно из рисунка 2, тяжелая мышечная работа приводила к снижению числа фагоцитов в крови и активности процессов фагоцитоза в крови экспериментальных животных. Снижалось фагоцитарное число, отражающее степень вовлеченности клеток в процессы фагоцитоза, и уменьшался фагоцитарный индекс, характеризующий интенсивность поглотительной активности каждой клетки.

Введение ТПП оказывало корригирующее действие на изменения, вызванные физической нагрузкой. Восстанавливались показатели фагоцитарной активности клеток крови к показателям нормы. При этом отмечалось восстановление как фагоцитарного числа, так и фагоцитарного индекса. Способность к коррекции последствий физической нагрузки, отражаемых в показателях активности фагоцитарной системы, была выявлена для всех исследуемых соединений.

Интенсивная мышечная работа вызывает снижение эффективности кислородзависимого метаболизма, определяющего степень генерации активных форм

кислорода фагоцитами. Из данных исследования спонтанной активации кислородзависимого метаболизма фагоцитарных клеток (тест НСТ) следует, что под действием ИФН количество активированных клеток НСТ-реакции также значительно снижалось. И кроме того, после ИФН уменьшалась относительная емкость функционального резерва фагоцитов крови, исследуемого посредством регистрации хемилюминесценции клеток (рис. 3).

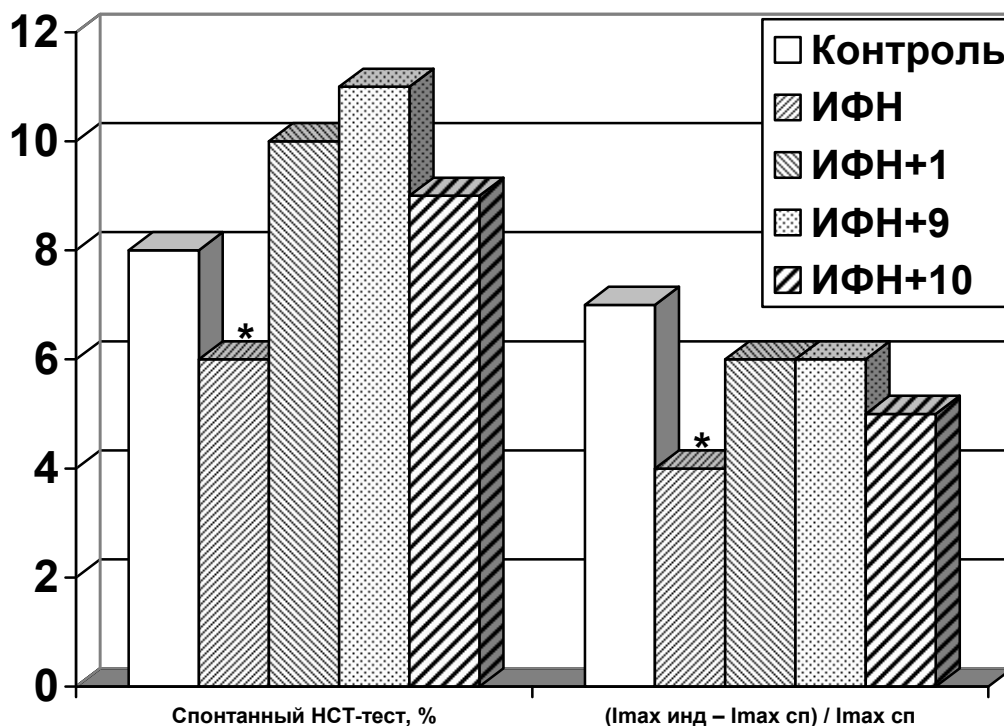


Рис. 3. Параметры кислородзависимого метаболизма циркулирующих фагоцитов: функционального резерва на фоне ИФН и введения тиадансодержащих производных пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-диона

Примечание. Статистические показатели представлены в виде $M \pm m$ для 10 измерений в группе.

*Достоверное различие при $p < 0,05$.

Введение же ТПП лабораторным животным приводило значения фагоцитарного резерва и показатели НСТ-теста в крови животных к исходному уровню.

Таким образом, мышечная нагрузка снижает образование активных форм кислорода в клетках крови лабораторных животных. При этом уменьшается функциональный резерв фагоцитирующих клеток. Подавление защитной функции фагоцитов при стрессе выступает негативным фактором, приводящим к снижению адаптационных возможностей организма на системном уровне. Введение тиадансодержащих производных пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-диона восстанавливает подавляемую генерацию активных форм кислорода клетками крови и тем самым способствует поддержанию функционально-метаболической активности фагоцитирующих клеток крови на уровне значений нормы.

Выводы

Интенсивная физическая нагрузка снижает параметры фагоцитарной активности, в первую очередь кислородзависимого метаболизма фагоцитирующих клеток (преимущественно нейтрофилов), и приводит к снижению генерации активных форм кислорода. Введение тиетансодержащих производных пиримидин-2,4-(1Н,3Н)-диона в живой организм, испытывающий психоэмоциональный и оксидативный стресс, восстанавливает окислительные процессы фагоцитарной защиты крови.

Список литературы

1. Рожкова Е.А. Механизмы развития лимитирующей физической работоспособности при нарушениях гемодинамики в звене микроциркуляции / Е.А. Рожкова, Е.А. Турова, М.А. Рассулова и др. // Вестник спортивной науки. - 2014. - № 3. - С. 34-40.
2. Калашникова М.М. Взаимосвязь психофизиологии и стресса / М.М. Калашникова, Ю.В. Рысева // Новая наука: современное состояние и пути развития. - 2016. - № 4-4. - С. 60-63.
3. Черешнев В.А. Экспериментальные модели в патологии / В.А. Черешнев, Ю.И. Шилов, М.В. Черешнева и др. – Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2014. - 324 с.
4. Лосенок С.А. Иммунометаболические нарушения и их коррекция при синдроме перетренированности у спортсменов / С.А. Лосенок, И.Л. Бровкина, Л.Г. Прокопенко, Д.С. Наседкин // Военно-медицинский журнал. - 2008. - Т. 329. - № 2. - С. 70-71.
5. Green H.J. Time-dependent effects of short-term training on muscle metabolism during the early phase of exercise / H.J. Green, E. Bombardier, M.E. Burnett // American journal of physiology-regulatory integrative and comparative physiology. – 2009. – Vol. 297. - № 5. - P. 1383- 1391.
6. Олейник С.А. Фармакология спорта / С.А. Олейник, Л.М. Гунина, Р.Д. Сейфулла. - Киев: Олимп. лит-ра, 2010. - 640 с.
7. Зобов В.В., Назаров Н.Г., Выштакалюк А.Б. и др. Эффективность влияния новых производных пиримидина на физическую работоспособность крыс в условиях выполнения теста «плавание до отказа» // Экология человека. - 2015. - № 1. – С. 28-35.
8. Мещерякова С.А., Катаев В.А. Синтез новых производных тиетанилпиримидина и тиетанилимидазола // Журнал органической химии. - 2013. - Т. 49. - Вып. 9. - С. 1373-1375.
9. Каркищенко Н.Н., Хайтин М.И. Сравнительное изучение антидепрессантной активности калия оротата и пирацетама // Фармакология и токсикология. - 1985. - № 2. - С. 32–35.

10. Петрова И.В., Катаев В.А., Баймурзина Ю.Л. Мочалов К.С., Фархутдинов Р.Р. Влияние производных пиримидина и тиетанурацила на оксидативный и психоэмоциональный стресс у лабораторных животных // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - № 2.; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24332> (дата обращения 13.07.2017).
11. Pipe A. Drugs in sport: past, present and future I Symposium on Drugs and Sport: Issues and Perspectives RSC and UK Sport. - Manchester, 2002.
12. Рылова М.Л. Методы исследования хронического действия вредных факторов среды в эксперименте. – М.: Медицина, 1964. – 230 с.
13. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. - М.: Изд-во РАМН, 2009. - 208 с.
14. Клечиков Л.З. О некоторых методах исследования функциональной активности лейкоцитов крови // Лабораторное дело. – 1967. – № 3. – С. 157-160.
15. Байматов В.Н. Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в сельском хозяйстве, ветеринарной медицине и животноводстве / В.Н. Байматов, Р.Р. Фархутдинов, А.М. Багаутдинов. - Уфа, 2009. – 101 с.