

## ВЛИЯНИЕ ПИРИМИДИНОВ БИДЖИНЕЛЛИ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ

© Ю. В. Шаталин,<sup>1,2,\*</sup> В. С. Шубина,<sup>1,2</sup> А. С. Фисюк<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Пуцунский государственный университет,

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино,

и <sup>3</sup> Омский государственный университет им. Ф. М. Достоевского;

\* электронный адрес: [it@rambler.ru](mailto:it@rambler.ru)

Исследовано влияние 6 синтетических пиримидинов Биджинелли на продукцию активных форм кислорода (АФК) полиморфноядерными лейкоцитами. Методом люминолзависимой хемилюминесценции показано, что исследуемые соединения в концентрации 10—100 мкМ стимулируют продукцию нейтрофилами АФК. Продукция АФК стимулированными ФМА нейтрофилами в присутствии 10 мкМ 1-(3,4-диметоксифенилэтил)-4-(алкил/арил) замещенных пиримидинов Биджинелли увеличивается на 50—90 %. Показано увеличение праймирующего влияния пиримидинов Биджинелли на продукцию АФК нейтрофилами при замене фурильного радикала на фенильный и изопропильный заместители при С(4) пиримидинового цикла и замене бензильного заместителя при N(1) на 3, 4-диметоксифенилэтильный. Установлена высокая ингибирующая активность 1-(3, 4-диметоксифенилэтил)-4-(алкил/арил) замещенных пиримидинов Биджинелли в концентрации 0.01—0.10 мкМ. Обнаружено, что 1-(2-[3,4-диметоксифенил]-этил)-4-фенил-5-карбэтокси-6-метил-3, 4-дигидро-2(1H)-пиримидинтион при высоких концентрациях (1 мМ и более) способен вызывать респираторный взрыв нейтрофилов без дополнительной стимуляции.

Ключевые слова: нейтрофилы, продукция активных форм кислорода, пиримидины Биджинелли, пуриновые (пиримидиновые) рецепторы.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ФМА — форбол-12-меристат-13-ацетат; ЛХЛ — люминолзависимая хемилюминесценция; ДНРМ — пиримидинтион, пиримидин Биджинелли (dihydropyrimidine).

На протяжении многих лет производные пиримидина рассматриваются как потенциальные биологически активные вещества. Это связано с широким спектром биологических эффектов, которые проявляют соединения данного класса, включая антивирусную, противоопухолевую, антибактериальную и противовоспалительную активности (Карре, 2000; Huang et al., 2005). Наиболее перспективным способом получения производных пиримидинов являются различные модификации синтеза Биджинелли, в ходе которого получают пиримидиноны и пиримидинтионы различного состава, называемые по способу их получения пиримидинами Биджинелли (Вдовина, 2008). Недавние исследования производных пиримидина показали, что данные соединения способны усиливать образование активных форм кислорода (АФК) в условиях окислительного стресса (Sajewicz, 2007), сопровождающего целый ряд патологических состояний, таких как воспаление, канцерогенез и др. (Sies, 1991; Зенков и др., 2001).

Хорошо известно, что фагоцитирующим клеткам принадлежит важная роль в иммунном ответе на чужеродные клетки. Тем не менее открываются все новые факты в исследовании механизмов таких важных процессов, как хемотаксис, фагоцитоз, генерация АФК и дегрануляция специфических гранул нейтрофилов. Недавно показано, что

в процессе поляризации нейтрофила в ответ на чужеродный антиген наблюдается перераспределение рецепторов пуринового (пиримидинового) ряда на поверхности плазматической мембраны (Junger, 2008).

Рецепторы А3 располагаются прежде всего во внутриклеточных депо, где они, по-видимому, связываются с гранулами. При возбуждении клетки хемоаттрактантом наблюдаются поляризация клетки и быстрая мобилизация рецепторов А3 на переднем крае поверхности нейтрофила (Chen et al., 2006). Напротив, рецепторы А2а однородно распределены по всей поверхности клетки и при поляризации клетки это распределение не изменяется. Предполагается, что действие рецепторов А2а направлено на подавление формирования псевдоподий по всей поверхности клетки, кроме переднего края, где рецепторы А3 противодействуют подавляющему действию рецепторов А2а (Junger, 2008). Таким образом, возможно, что рецепторы А2а могут играть роль в усилении сигналов, подавляя действие Fc-рецептора, сигнализирующего в наиболее удаленной от переднего края части мембраны клетки. Совместная работа рецепторов А2а и А3 реализуется посредством большого различия в аффинности лигандов к данным рецепторам. Так, например, рецепторы А2а на несколько порядков более чувствительны к аденозину, чем рецепторы А3 (Ralevic et al., 1998), что говорит о возмож-

ности дозозависимого регулирования функциональных ответов клетки посредством активации (ингибирования) данных рецепторов.

Недавно было показано, что при аппликации на Маутнеровские нейроны золотой рыбки соединения 1-(2-[3, 4-диметоксифенил]-этил)-4-фенил-5-карбэтокси-6-метил-3, 4-дигидро-2(1H)-пиримидинтиона наблюдаются увеличение размеров актинсодержащих десмосомоподобных контактов, увеличение числа актиновых мостиков в щели десмосомоподобных контактов и появление пучков актиновых волокон в их цитоплазме (Павлик и др., 2007). Эти данные вошли в основу настоящего исследования влияния синтетических 5-карбэтокси-3, 4-дигидропиримидин-2(1H)-тионов (пиримидинов Биджинелли) на АФК-генерирующую активность полиморфноядерных лейкоцитов.

Мы исследовали изменение продукции АФК стимулированными и нестимулированными нейтрофилами крови в присутствии 6 пиримидинов Биджинелли (пиримидинтионов, ДНРМ) с различными заместителями в 1-м и 4-м положениях.

### Материал и методика

Использовали следующие реактивы: изобутаналь, бензальдегид, уксусный альдегид, фурфурол, 2-(3,4-диметоксифенил)этиламин, бензиламин, диметилсульфоксид (DMSO), NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> и глюкоза (Реахим, Россия); урографин (Schering, Германия); НЕРЕС, люминол, декстран-500, фикола-400 и зимозан А (Sigma, США). Из фикола и урографина готовили смесь с плотностью 1.077.

Среда для регистрации АФК содержала 150 мМ NaCl, 5 мМ НЕРЕС, 5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1 мМ MgCl<sub>2</sub> (рН 7.4) при 37 °С. Для выделения и суспендирования клеток использовали аналогичную среду, но при рН 7.2.

Синтез пиримидинов Биджинелли. В лаборатории органического синтеза Омского государственного университета им. Ф. М. Достоевского синтезировали 6 замещенных пиримидинов (ДНРМ) (структуры приведены на рис. 1). Исследуемые ДНРМ синтезировали по модифицированному методу синтеза Биджинелли с использованием соответствующих альдегидов (изобутаналь, бензальдегид, уксусный альдегид, фурфурол), аминов (2-(3,4-диметоксифенил)этиламин, бензиламин) и ацетоуксусного эфира (Srinivas et al., 2004). Структуры ДНРМ подтверждены данными элементного анализа с помощью инфракрасной и ядерномагнитной (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) спектроскопии.

Для выделения клеток использовали кровь здоровых самцов крыс линии Вистар (нормальные нейтрофилы) и крыс с индуцированным зимозаном А асептическим воспалением (индуцированные нейтрофилы). Клетки использовали в концентрации 1 · 10<sup>6</sup> кл./мл. Асептическое воспаление вызывали введением в брюшную полость животного 0.5 мл раствора зимозана А (5 мг/мл) ежедневно в течение 7 сут (Doherty, 1985). Через 3 сут после окончания введения зимозана крыс забивали методом декапитации и отбирали кровь для выделения нейтрофилов.

Полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) выделяли из цельной крови по стандартному методу (Лобашевский, 1983): гепаринизированную кровь перемешивали в соотношении 5:1 с 9%-ным раствором декстрана-500 в 0.15 М NaCl и выдерживали в течение 60 мин при 37 °С для седиментации эритроцитов. Затем на раствор фикола-урографина (4 мл) осторожно наслаивали 7 мл плазмы

обогащенной лейкоцитами, и центрифугировали в течение 30 мин при 400 g. После центрифугирования к осадку, содержащему гранулоциты, добавляли 1 мл дистиллированной воды и перемешивали в течение 20 с для гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов, после чего восстанавливали осмотическую среду добавлением 1 мл 0.3 М NaCl. Клетки дважды отмывали раствором 0.15 М NaCl, центрифугируя 10 мин при 400 g. Полученную фракцию суспендировали в среде регистрации (рН 7.2). В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96 %.

Продукцию АФК фагоцитами исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ). Измерения проводили на микропланшетном ридере Tecan Infinite F200 (Швейцария) в стандартных 96-луночных планшетах. Для изучения влияния ДНРМ на развитие респираторного взрыва фагоцитами использовали суспензию ПМЯЛ, стимулированных ФМА (форбол-12-миристетат-13-ацетат, 0.56 мкМ), в среде регистрации (200 мкл), содержащей люминол (250 мкМ).

Исходные растворы ДНРМ готовили в DMSO. Конечные концентрации веществ в среде составляли 10<sup>-3</sup>—10<sup>-8</sup> М. Концентрация DMSO в среде регистрации АФК не превышала 1 % от общего объема пробы (210 мкл).

Действие ДНРМ оценивали следующим образом: фагоцитирующие клетки (1 млн/мл) инкубировали в течение 5 мин при 37 °С в среде регистрации с добавлением ДНРМ. Затем к суспензии ПМЯЛ добавляли раствор ФМА (0.56 мкМ) и регистрировали ЛХЛ при 425 нм. Изменение интенсивности ЛХЛ под действием ДНРМ оценивали по отношению к контрольным значениям ЛХЛ суспензии фагоцитов (без добавки ДНРМ):  $I_{\text{ЛХЛ}} = \frac{I_{\text{ДНРМ+ФМА}}}{I_{\text{DMSO+ФМА}}} \cdot 100\%$ , где  $I_{\text{ЛХЛ}}$  — регистрируемое значение ЛХЛ,  $I_{\text{ДНРМ+ФМА}}$  — интенсивность ЛХЛ суспензии ПМЯЛ в присутствии ДНРМ и ФМА,  $I_{\text{DMSO+ФМА}}$  — интенсивность ЛХЛ суспензии ПМЯЛ в присутствии DMSO (в объеме, эквивалентном ДНРМ) и ФМА.

Оценку влияния ДНРМ на АФК-генерирующую активность фагоцитов без дополнительной стимуляции (в отсутствие ФМА) определяли аналогичным образом:  $I_{\text{ЛХЛ}} = \frac{I_{\text{ДНРМ}}}{I_{\text{DMSO+ФМА}}} \cdot 100\%$ , где  $I_{\text{ДНРМ}}$  — интенсивность ЛХЛ суспензии ПМЯЛ в присутствии ДНРМ. Фоновым значением ЛХЛ во всех экспериментах служило значение ЛХЛ суспензии ПМЯЛ в присутствии DMSO (в объеме, эквивалентном ДНРМ).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы MS Excel 2003. На рисунках представлены средние значения величин и их стандартные отклонения. Различия считали достоверными при  $P \leq 0.05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследуемые пиримидины Биджинелли (ДНРМ) были разделены на две группы. В первую вошли четыре пиримидина (ДНРМ01, ДНРМ02, ДНРМ03 и ДНРМ04), имеющие в 1-м положении 2-(3, 4-диметоксифенил)-этильный фрагмент и различные заместители в 4-м положении (изопропильный, фенильный, метильный и фурильный). Во вторую группу вошли два пиримидина (ДНРМ05 и ДНРМ06), имеющие в 1-м положении бензильный и в 4-м положении изопропильный и фенильный заместители (рис. 1).

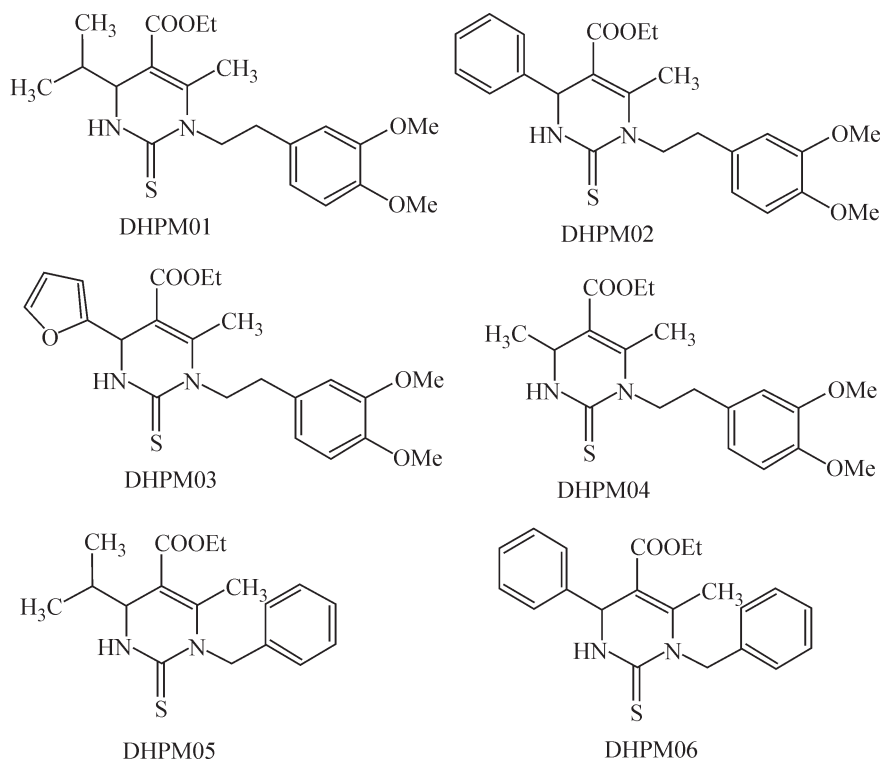


Рис. 1. Структура синтетических пиридинов Биджинелли (DHPM).

DHPM01 — этил-1-[2-(3, 4-диметоксифенил)этил]-6-метил-4-изопропил-3, 4-дигидро-2(1H)- пиридин-5-карбоксилат; DHPM02 — этил-1-[2-(3, 4-диметоксифенил)этил]-6-метил-4-фенил-3, 4-дигидро-2(1H)-пиридин-5-карбоксилат; DHPM03 — этил-1-[2-(3, 4-диметоксифенил)этил]-6-метил-4-(2-фурил)-3, 4-дигидро-2(1H)-пиридин-5-карбоксилат; DHPM04 — этил-1-[2-(3, 4-диметоксифенил)этил]-6-метил-4-метил-3, 4-дигидро-2(1H)-пиридин-5-карбоксилат; DHPM05 — этил-1-бензил-6-метил-4-изопропил-3, 4-дигидро-2(1H)- пиридин-5-карбоксилат; DHPM06 — этил-1-бензил-6-метил-4-фенил-3, 4-дигидро-2(1H)-пиридин-5-карбоксилат.

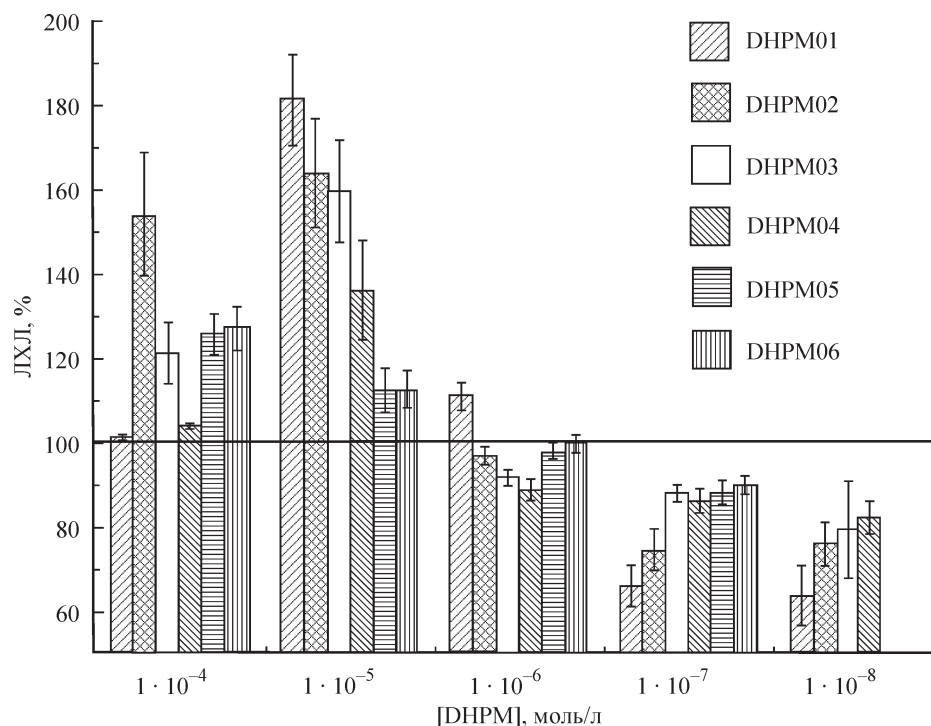


Рис. 2. Изменение продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами крови здоровых крыс при действии форболового эфира (ФМА, 0.56 мкМ) в присутствии пиридинов Биджинелли в разной концентрации.

Продукцию АФК оценивали по изменению люминолзависимого хемилюминесцентного ответа (ЛХЛ) по отношению к контролю.

Для того чтобы исключить влияние ДНРМ на ЛХЛ, сначала провели исследования на бесклеточной биохимической модельной системе, содержащей перекись водорода, люминол и пероксидазу хрена (Шаталин, и др., 2008). Выяснили, что в данных условиях исследуемые ДНРМ не влияют на ЛХЛ-ответ. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что данные вещества и их возможные метаболиты, образующиеся в процессе окисления, не являются прооксидантами или антиоксидантами, которые влияли бы на хемилюминесценцию (данные не представлены).

Исследование влияния ДНРМ на АФК-генерирующую активность ПМЯЛ показало, что все исследуемые соединения в концентрации 10–100 мкМ оказывают праймирующее влияние на продукцию АФК, тогда как ДНРМ в более низких концентрациях либо не влияли на продукцию фагоцитами АФК, либо ингибировали ее (рис. 2). Наиболее сильное праймирующее влияние на генерацию АФК клетками оказали соединения, содержащие в 1-м положении диметоксифенилэтильный фрагмент (ДНРМ01, ДНРМ02 и ДНРМ03), тогда как вещества с бензильным фрагментом (ДНРМ05 и ДНРМ06) в данном положении проявили значительно меньшую активность. Продукция АФК в присутствии ДНРМ01 в концентрации 10 мкМ увеличивалась на  $82 \pm 9\%$ , тогда как для ДНРМ05 и ДНРМ06 данное увеличение не превышало  $37 \pm 12\%$  (10 мкМ) и  $26 \pm 8\%$  (100 мкМ) соответственно.

В то же время существенные изменения в праймирующем действии ДНРМ наблюдались при замене заместителя в 4-м положении пиримидинового кольца. При этом заместители располагаются в следующий ряд: изопропильный (ДНРМ01, увеличение ЛХЛ на  $81 \pm 11\%$ ) > фенильный (ДНРМ02, увеличение ЛХЛ на  $63 \pm 13\%$ ) > фурильный (ДНРМ03, увеличение ЛХЛ на  $59 \pm 12\%$ ) > метильный (ДНРМ04, увеличение ЛХЛ на  $35 \pm 12\%$ ).

Механизм действия данных ДНРМ до конца неясен, тем не менее можно предположить, что исследуемые соединения подобно природным пиримидинам (пуринам) влияют на разные подтипы пиримидиновых (пуриновых) рецепторов ( $P_1$  и  $P_2$ ), оказывая противоположное влияние на функции фагоцитирующих клеток крови (Cronstein, 1994; Bullough et al., 1995; Liang et al., 1995; Fredholm, 1997; Seil et al., 2008). Например, аденозин в низких концентрациях стимулирует АФК-генерирующую активность клеток, усиливает фагоцитоз, а также адгезию фагоцитов к эндотелию посредством активации рецепторов  $A_1$  и  $A_3$ , в то время как при высоких концентрациях аденозин действует на рецептор  $A_{2a}$ , в результате чего вышеперечисленные функции ингибируются (Liang et al., 1995). Рядом авторов показано, что функциональные изменения фагоцитов крови в результате действия как на семейство рецепторов  $P_1$  (включая  $A_1$  и  $A_3$ ), так и на семейство  $P_2$  сопровождаются полимеризацией актинового цитоскелета клеток (Seifert et al., 1989; Verghese et al., 1996; Zalavary et al., 1996a). Влияние на актиновый цитоскелет клетки одного из исследуемых пиримидинов мы наблюдали ранее (Павлик и др., 2007).

Активация различных подтипов пиримидиновых (пуриновых) рецепторов одним и тем же агонистом может вызывать различные эффекты, что было продемонстрировано при исследовании продукции АФК нейтрофилов в присутствии тромбоцитов (Bengtsson et al., 1996). Авторы показали незначительное ингибирование ЛХЛ-ответа при соотношении нейтрофилы : тромбоциты в диапазоне

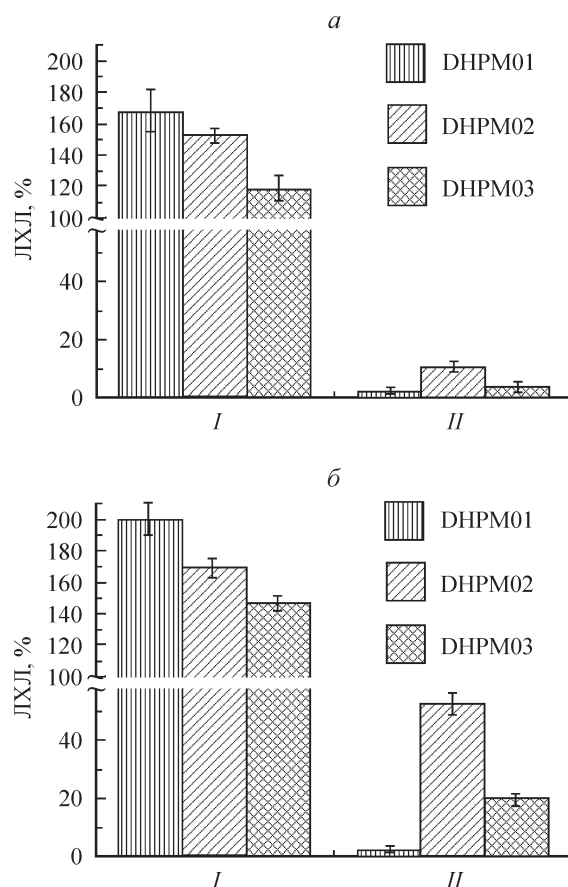


Рис. 3. Влияние пиримидинов Биджинелли (1 мМ) на продукцию АФК покоящимися (а) и индуцированными (б) нейтрофилами крысы.

I — на фоне стимуляции нейтрофилов форболовым эфиром (ФМА, 0.56 мкМ); II — без стимуляции нейтрофилов ФМА. Индуцированные нейтрофилы получали от крыс, которым в течение 7 сут вводили зимозан А. Контролем служила интенсивность ЛХЛ-ответа нейтрофилов здоровых животных при стимуляции 0.56 мкМ ФМА (см. раздел «Материал и методика»).

1 : 1—1 : 10, а при дальнейшем увеличении этого соотношения ЛХЛ-ответ увеличивался вдвое. Также отмечалось 2-кратное возрастание фагоцитарной активности и 1.5-кратное увеличение содержания интринтектинного полимерного актина. При этом в другой серии экспериментов этих авторов присутствие тромбоцитов вызывало только ингибирование респираторного взрыва нейтрофилов (Zalavary et al., 1996b). Противоречивость полученных авторами данных, по-видимому, связана с различием функционального состояния выделяемых нейтрофилов, а именно с различным уровнем экспрессии пуриновых (пиримидиновых) рецепторов. На модели асептического воспаления, индуцированного введением в брюшную полость животного раствора зимозана А, нами была предпринята попытка объяснить подобные данные.

Так, в процессе активации нейтрофилов наблюдается перераспределение пуриновых (пиримидиновых) рецепторов (Junger, 2008), что должно приводить к изменению ЛХЛ в присутствии агонистов (антагонистов) рецепторов  $A_{2a}$  и  $A_3$ . При исследовании влияния синтетических ДНРМ на продукцию АФК нейтрофилами нами были обнаружены существенные различия в ЛХЛ-ответах клеток, выделенных из здорового животного и животного с индуцированным зимозаном хроническим воспалением.

Из пиримидинов Биджинелли только ДНРМ02 в высокой концентрации (1 мМ) увеличивал продукцию АФК (ЛХЛ-ответ) нейтрофилами, выделенными из крови здорового животного без дополнительной стимуляции ФМА (рис. 3). Однако индуцированные нейтрофилы, выделенные из крови животного с индуцированным зимозаном воспалением, усиливали продукцию АФК в отсутствие стимуляции ФМА при действии не только ДНРМ02, но и ДНРМ03 (рис. 3). На фоне стимуляции ФМА интенсивность ЛХЛ возрастала при действии ДНРМ01, ДНРМ02 и ДНРМ03 на 32, 16 и 28 % соответственно. Обнаруженные изменения, по-видимому, связаны с активацией пуриnergических рецепторов  $A_{2a}$ ,  $A_3$  и  $P_2Y_2$ , которые преимущественно экспрессируются в нейтрофилах (Junger, 2008).

Активация рецептора  $A_{2a}$  в противоположность активации рецептора  $A_3$  приводит к увеличению концентрации внутриклеточного цАМФ, ингибирует протеинкиназу С и респираторный взрыв нейтрофилов. Активация рецептора  $P_2Y_2$  приводит к стимуляции фосфолипазы  $C_{\beta 2}$ , формированию инозитолтрифосфата, мобилизации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и активации различных сигнальных путей, включая фосфолипазу  $PLA_2$ ,  $Ca^{2+}$ -зависимый  $K^+$ -канал и РКС (Ralevic et al., 1998). Таким образом, дозозависимая активация (ингибирование) пиримидиновых (пуриновых) рецепторов может приводить к усилению или ослаблению продукции АФК нейтрофилами. В пользу данного утверждения говорит то, что в процессе воспаления покоящиеся нейтрофилы претерпевают ряд изменений в результате активации (Поцелуева и др., 2005), при этом, по-видимому, существенно изменяется экспрессия пиримидиновых (пуриновых) рецепторов (Junger, 2008).

С другой стороны, действие пиримидинов Биджинелли может быть обусловлено связыванием и с другими рецепторами. Среди структурных аналогов исследуемых встречаются антагонисты адоренорецепторов (Nagarathnam et al., 1999; Barrow et al., 2000). Последние присутствуют на поверхности фагоцитирующих клеток (Barrow et al., 2000) и могут быть мишенями ДНРМ. Похожую структуру имеют пиримидины — блокаторы кальциевых каналов (Atwal et al., 1991; Rovnyak et al., 1992; Grover et al., 1995), которые участвуют в регуляции уровня внутриклеточного кальция и, следовательно, являются важным звеном в формировании АФК-генерирующего ответа клеток. Стоит обратить внимание и на тот факт, что максимальное стимулирующее влияние на АФК-генерирующую активность ПМЯЛ оказывают наиболее гидрофобные соединения в высоких концентрациях, и, следовательно, в этом случае нельзя исключать неспецифическое действие исследованных соединений, например их влияние на вязкость мембраны, что может приводить к изменению ее проницаемости и конформации рецепторов.

Итак, нами обнаружено изменение АФК-генерирующей активности ПМЯЛ в присутствии пиримидинов Биджинелли в зависимости от их химической структуры. Показано наличие дозозависимого эффекта активации (ингибирования) АФК-генерирующей активности ПМЯЛ крови. Обнаружена способность синтетических пиримидинов вызывать индукцию респираторного взрыва у нейтрофилов, выделенных из кровеносного русла крыс с индуцированным зимозаном воспалением.

Полученные данные свидетельствуют о возможном влиянии синтетических пиримидинов на АФК-генерирующую активность фагоцитов крови в зависимости от их функционального состояния. Таким образом, использование препаратов пиримидинового ряда, например таких

как пентоксил, меброн и фторафур, на фоне воспаления может провоцировать усиление продукции АФК и приводить к различным патологическим состояниям. Тем не менее исследование механизмов действия синтетических пиримидинов позволит создавать эффективные иммуностимулирующие агенты, обладающие селективным действием на определенные типы пиримидиновых (пуриновых) рецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Рособразования в рамках аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (№ 2.1.1/791 и 2.1.1/6872).

### Список литературы

- Вдовина С. В., Мамедов В. А. 2008. Новые возможности классической реакции Биджинелли. Успехи химии. 77 (12): 1091—1128.
- Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. 2001. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М.: Наука. 340 с.
- Лобаевский А. Л. 1983. Выделение полиморфноядерных лейкоцитов из малых объемов крови после осаждения декстраном. Лаб. дело. 11 : 28—31.
- Павлик Л. Л., Безгина Е. Н., Шубина В. С., Шаталин Ю. В., Поцелуева М. М., Мошков Д. А. 2007. Влияние 3, 4-дигидро-2(1H)-пиримидинтиона на ультраструктуру и функцию Маутнеровских нейронов золотых рыбок. Морфология. 131 (1) : 31—36.
- Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Ковалева Е. В., Шаталин Ю. В., Евтюдиенко Е. В. 2005. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки *in vitro* и *in vivo*. Цитология. 47 (1) : 57—63.
- Шаталин Ю. В., Наумов А. А., Поцелуева М. М. 2008. Сравнительная характеристика антиоксидантных свойств гипоксена и дурохинона методом хемилюминесценции. Биофизика. 53 (1) : 100—107.
- Atwal K. S., Swanson B. N., Unger S. E., Floyd D. M., Moreland S., Hedberg A., O'Reilly B. C. 1991. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. J. Med. Chem. 34 : 806—811.
- Barrow J. C., Nantermet P. G., Selnick H. G., Glass K. L., Rittle K. E., Gilbert K. F., Steele T. G., Homnick C. F., Freidinger R. M., Ransom R. W., Kling P., Reiss D., Broten T. P., Schorn T. W., Chang R. S., O'Malley S. S., Olah T. V., Ellis J. D., Barrish A., Kassahun K., Leppert P., Nagarathnam D., Forray C. 2000. *In vitro* and *in vivo* evaluation of dihydropyrimidinone C-5 amides as potent and selective  $\alpha(1A)$  receptor antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia. J. Med. Chem. 43 : 2703—2718.
- Bengtsson T., Zalavary S., Stendahl O., Grenegard M. 1996. Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization. Blood. 87 (10) : 4411—4423.
- Bullough D. A., Magill M. J., Firestein G. S., Mullane K. M. 1995. Adenosine activates A2 receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated cardiac myocytes. J. Immunol. 155 (5) : 2579—2586.
- Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P. A., Junger W. G. 2006. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. Science. 314 : 1792—1795.
- Cronstein B. N. 1994. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. J. Appl. Physiol. 76 (1) : 5—13.
- Doherty N. S., Poubelle P., Borgeat P., Beaver T. H., Westrich G. L., Schrader N. L. 1985. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. Prostaglandins. 30 : 769—789.

- Fredholm B. B. 1997. Purines and neutrophil leukocytes. *Gen. Pharmacol.* 28 : 345—350.
- Grover G. J., Dzwonczyk S., McMullen D. M., Norman-Din D. E., Parham C. S., Sleph P. G., Moreland S. 1995. Pharmacologic profile of the dihydropyrimidine calcium channel blockers SQ 32,547 and SQ 32,926 [correction of SQ 32,946]. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 : 289—294.
- Huang Y., Yang F., Zhu C. 2005. Highly enantioselective Biginelli reaction using a new chiral ytterbium catalyst: asymmetric synthesis of dihydropyrimidines. *J. Amer. Chem. Soc.* 127 : 16 386—16 387.
- Junger W. G. 2008. Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 : 2528—2540.
- Kappe C. O. 2000. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type—a literature survey. *Eur. J. Med. Chem.* 35 : 1043—1052.
- Liang B. T., Haltiwanger B. 1995. Adenosine A2a and A2b receptors in cultured fetal chick heart cells. High- and low-affinity coupling to stimulation of myocyte contractility and cAMP accumulation. *Circ. Res.* 76 : 242—251.
- Nagarathnam D., Miao S. W., Lagu B., Chiu G., Fang J., Dhar T. G. M., Zhang J., Tyagarajan S., Marzabadi M. R., Zhang F., Wong W. C., Sun W., Tian D., Wetzel J. M., Forray C., Chang R. S. L., Broten T. P., Ransom R. W., Schorn T. W., Chen T. B., O'Malley S., Kling P., Schneek K., Bendesky R., Harrell C. M., Vyas K. P., Gluchowski C. 1999. Design and synthesis of novel  $\alpha$ 1a adrenoceptor-selective antagonists. 1. Structure—activity relationship in dihydropyrimidinones. *J. Med. Chem.* 42 : 4764—4777.
- Ralevic V., Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharm. Rev.* 50 : 413—492.
- Rovnyak G. C., Atwal K. S., Hedberg A., Kimball S. D., Moreland S., Gougoutas J. Z., O'Reilly B. C., Schwartz J., Malley M. F. 1992. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 4. Basic 3-substituted-4-aryl-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid esters. Potent antihypertensive agents. *J. Med. Chem.* 35 : 3254—3263.
- Sajewicz W. 2007. Toxicity of pyrimidine derivatives under oxidative stress conditions: chemiluminescence-based assays in systems containing erythrocytes, mitochondria or blood plasma. *Pharmacol. Rep.* 59 : 206—215.
- Seifert R., Burde R., Schultz G. 1989. Activation of NADPH oxidase by purine and pyrimidine nucleotides involves G proteins and is potentiated by chemotactic peptides. *Biochem. J.* 259 : 813—819.
- Seil M., Fontanils U., Etxebarria I. G., Pochet S., Garcia-Marcos M., Marino A., Dehaye J. P. 2008. Pharmacological evidence for the stimulation of NADPH oxidase by P2X(7) receptors in mouse submandibular glands. *Purinergic Signal.* 4 (4) : 347—355.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer. J. Med.* 91 : S31—S38.
- Srinivas K. V. N. S., Das B. 2004. Iodine catalyzed one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones and thiones: a simple and efficient procedure for the Biginelli reaction. *Synthesis.* 13 : 2091—2094.
- Vergese M. W., Kneisler T. B., Boucheron J. A. 1996. P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 271 (26) : 15 597—15 601.
- Zalavary S., Grenegard M., Stendahl O., Bengtsson T. 1996a. Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization. *J. Leukocyte Biol.* 60 : 58—68.
- Zalavary S., Grenegard M., Stendahl O., Bengtsson T. 1996b. Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *J. Leukocyte Biol.* 60 (1) : 58—68.

Поступила 6 X 2009

## INFLUENCE OF BIGINELLI PYRIMIDINE ON PRODUCTION REACTIVE OXYGEN SPECIES BY POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

Yu. V. Shatalin,<sup>1,2,\*</sup> V. S. Shubina,<sup>1,2</sup> A. S. Fisyyuk<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pushchino State University, <sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pyshchino, and <sup>3</sup> F. M. Dostoevsky Omsk State University;  
\* e-mail: it@rambler.ru

The effect of 6 synthetic Biginelli pyrimidines on production of reactive oxygen species by polymorphonuclear neutrophils was investigated. It has been shown by method of luminol-dependent chemiluminescence that test compounds in a concentrations of 10—100  $\mu$ M stimulate production of reactive oxygen species. An increase in the reactive oxygen species production by stimulated neutrophils in the presence of 10  $\mu$ M 1-(3, 4-dimethoxyphenyl)ethyl-4(alkyl/aryl) substituted Biginelli pyrimidines was 50—90 %. An increase in the priming effect of Biginelli pyrimidines on reactive oxygen species production by neutrophils was noted in the case of replacement of phuryl radical by phenyl and alkyl radicals at C(4) pyrimidine cycle and in the case of replacement benzyl radical at N(1) by 3, 4-dimethoxyphenyl radical. It has been revealed a high inhibitory effect of 1-(3, 4-dimethoxyphenylethyl)-4(alkyl/aryl) substituted Biginelli pyrimidine in concentration 0.01—0.10  $\mu$ M. It has been found that high concentration of ethyl-1-[2-(3, 4-dimethoxyphenyl)ethyl]-6- methyl-4-phenyl-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidine -5-carboxylate (1 mM and more) is able to cause respiratory burst of neutrophils without additional stimulation.

Key words: neutrophils, reactive oxygen species production, Biginelli pyrimidine, purine (pyrimidine) receptors.