

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ 2-МОРФОЛИНО-5-ФЕНИЛ-6Н-1,3,4-ТИАДИАЗИН ГИДРОБРОМИДА НА ИЗМЕНЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

© 2018 г. В. В. Емельянов², С. А. Бриллиант^{1,3}, И. Ф. Гетте¹, И. Г. Данилова^{1,2,3}, Ю. Н. Клюева², Л. П. Сидорова², Т. А. Цейтлер²

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

³ГАУЗ СО Институт медицинский клеточных технологий, Екатеринбург, Россия;

Поступила: 05.05.2018. Принята: 08.06.2018

В статье изложены данные о влиянии замещенных 1,3,4-тиадиазинов на изменение гематологических показателей крыс с аллоксановым диабетом. Установлено, что синтетическое соединение L-17 обладает способностью к коррекции гематологических нарушений у крыс с аллоксановым сахарным диабетом.

Ключевые слова: периферическая кровь, аллоксановый диабет, 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид (L-17)

DOI: 10.31857/S102872210002394-8

Адрес: 620049 г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, Бриллиант Светлана Александровна. Тел.: +79122070984, 8(343)3740070, E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Авторы:

Емельянов В. В., к.м.н., доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

Бриллиант С. А., м.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ИИФ УрО РАН, научный сотрудник ЦЭЛБ ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия;

Гетте И. Ф., к.б.н., г.н.с. лаборатории биохимии и морфологии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., заведующая лабораторией биохимии и морфологии ИИФ УрО РАН, главный научный сотрудник ЦЭЛБ ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия;

Клюева Ю. Н., ассистент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

Сидорова Л. П., к.х.н., ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Цейтлер Т. А., к.х.н., доцент кафедры органической и биомолекулярной химии ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач «Стратегии развития отечественной фармацевтической промышленности

РФ до 2020 года» является разработка инновационных лекарственных средств. Особый интерес исследователей вызывают новые синтетические соединения мультитаргетного действия — потенциальные лекарственные средства для лечения социально значимых заболеваний, таких как сахарный диабет. К числу перспективных для фармакологического изучения классов соединений следует отнести замещенные 1,3,4-тиадиазины. Исследования последних 15 лет позволили получить в этом классе новые соединения с уникальным комплексом гипотермического и гипометаболического действия [7], найти соединения с антиагрегантным и противовоспалительным эффектами [7]. Замещенные 1,3,4-тиадиазины обладают способностью к раскрытию и сужению гетерокольца с образованием тиольных производных [6], что имеет значение в проявлении ими антиоксидантной активности. В предыдущих исследованиях показана способность 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромида (соединение L-17), корректировать метаболические нарушения (гипергликемию, оксидативный стресс и активацию гликирования белков) при экспериментальном аллоксановом

сахарном диабете [3]. Непременным условием безопасного применения противодиабетических средств является отсутствие у них миелотоксического действия. В литературе имеются неоднозначные сведения о состоянии периферической крови при формировании аллоксанового сахарного диабета. Авторы отмечают развитие анемии (которая связана как с внутрисосудистым гемолизом, так и с угнетением секреции эритропоэтина), лейкоцитоза и активации тромбоцитов [1, 8]. На основании вышеизложенного, представляет интерес характеристика гематологических показателей у крыс при развитии аллоксанового сахарного диабета и его коррекции соединением из ряда замещенных 1,3,4-тиадиазинов.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромида (соединения L-17), на гематологические показатели крыс с аллоксановым сахарным диабетом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на крысах линии Вистар массой 250–300 г. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли с соблюдением этических норм и правил, описанных Международным Советом Медицинских Научных обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), а также в соответствии приказу Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Экспериментальных животных делили на 4 группы (n=40). 1 – интактная группа (n=10). 2 – крысы, которым вводили физиологический раствор (n=10). 3 – группа животных, которым моделировали аллоксановый сахарный диабет (n=10). 4 – крысы с аллоксановым сахарным диабетом, которым вводили соединение L-17 (n=10).

Моделирование аллоксанового сахарного диабета длительностью 30 сут (СД30) у крыс осуществляли согласно следующей методике [2]. 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (соединение L-17) был синтезирован по методу [5] на кафедре органической и биомолекулярной химии химико-технологического института УрФУ под руководством академика РАН О. Н. Чупахина. Соединение L-17 вводили крысам в дозе 40 мг/кг внутримышечно с периодичностью 3 раза в неделю в течение

4 недель. Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза спустя 30 суток.

Для анализа периферической крови совершали забор крови из хвостовой вены крысы. Измерения образцов крови осуществляли с помощью гематологического анализатора Celly 70 фирмы Biocode-Hucel (Франция), предназначенного для ветеринарии и адаптированного к гематологическим исследованиям на животных.

Для подтверждения развития аллоксанового диабета у крыс проводили оценку биохимических показателей: глюкозы, инсулина и гликозилированного гемоглобина. Концентрацию глюкозы в плазме крови животных определяли глюкозооксидазным методом Новоглюк-КМ, «Вектор-Бест» (Россия), содержание инсулина – иммуноферментным методом Insulin ELISA (Швеция). Содержание гликозилированного гемоглобина оценивали в цельной крови методом гель-хроматографии «Диабет-тест», Фосфосорб (Россия). Биохимические исследования выполняли на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США).

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете «Statistica 8.0». Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сопоставлении результатов гематологических и биохимических исследований животных контрольной группы (1) с введением физиологического раствора и интактной группы (2) не было отмечено статистически значимых различий. На основании этого, дальнейшее сравнение полученных экспериментальных данных – групп 3 и 4 осуществляли только с группой 1 (интактных животных).

Изменения биохимических показателей плазмы и цельной крови крыс спустя 30 суток после введения аллоксана свидетельствовали о развитии сахарного диабета. Это подтверждалось статистически значимым увеличением уровня глюкозы в 4,6 раза, возрастание содержания гликозилированного гемоглобина на 39% и снижением концентрации инсулина в 2,8 раза (**таблица 1**).

Со стороны красного ростка кроветворения при СД30 выявили увеличение средней кон-

центрации гемоглобина в эритроцитах (МСНС) и показателя ширины распределения эритроцитов (RDW) по сравнению с группой интактных животных. Указанные изменения вероятнее всего обусловлены развитием анизоцитоза эритроцитов, появлением аномальных форм клеток вследствие нарушения водно-электролитного обмена и мембранодеструктивных процессов в условиях резко выраженной гипергликемии и гиперосмолярности плазмы [4].

При введении L-17 крысам с СД30 наблюдали достоверное увеличение количества гемоглобина (Hb) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН), что может свидетельствовать об активации эритропоэза (таблица 2).

В отличие от группы экспериментальных животных СД30 у крыс в группе СД30+L-17, показатели МСНС и RDW не отличались от группы интактных животных, что свидетельствует о возможности L-17 корригировать в состоянии красной крови при аллоксановом сахарном диабете (таблица 2).

Исследуя показатели белой крови, в группе с СД30 регистрировали статистически значимое снижение содержания лейкоцитов на 12%,

в сравнении с группой интактных животных, преимущественно за счет гранулоцитов. Данный феномен может свидетельствовать о нарушении в системе кроветворения при СД30. Остальные показатели белой крови при моделировании аллоксанового диабета 30 сут достоверно не изменялись. Изменения в группе СД30 на фоне введения L-17 были обусловлены статистически значимым снижением общего количества лейкоцитов на 35% за счет снижения числа гранулоцитов (Г/л) на 53%. Содержание клеток в смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток (Mid, Г/л), где моноциты составляли большую часть, а также содержание лимфоцитов достоверно не изменялись (таблица 3). Полученные данные свидетельствуют, что введение соединения L-17 не позволило скорректировать изменения состава белой крови при развитии аллоксанового сахарного диабета у крыс, однако и не усугубило их.

Со стороны тромбоцитарного звена в группе СД30 наблюдали снижение общего числа тромбоцитов (Plt), тромбокрит (Pct) и среднего объема тромбоцитов (MPV) по сравнению с интактными животными. При введении L-17+СД30 отмечали

Таблица 1. Изменение биохимических показателей крови крыс при СД30

Показатели	Глюкоза, ммоль/л	Концентрация инсулина, мкг/л	Содержание гликозилированного гемоглобина, %
Интактная группа	6,0±0,3	1,28±0,19	5,1±0,2
СД 30	27,8±3,5*	0,45±0,07*	7,1±0,6*

Примечание: * – достоверные различия от группы интактных животных ($p < 0,05$).

Таблица 2. Изменение показателей красной крови крыс с СД30 и после введения L-17

	RBC, Т/л	Hb, г/дл	Hct, %	MCV, фл	МСН, пг	МСНС, г/дл	RDW, %
Интактная группа	8,38±0,27	14,06±0,2	42,03±0,76	48,63±4,33	16,51±0,45	34,7±0,49	15,76±0,41
СД 30	8,34±0,28	14,24±0,39	39,25±1,27	47,11±0,51	17,13±0,29	36,37±0,51*	16,81±0,24*
СД30+L-17	8,74±0,2	15,24±0,45*	45,0±1,29	51,44±0,62#	17,8±0,13*	33,86±0,51#	16,62±0,16

Примечание: * – достоверные различия от группы интактных животных ($p < 0,05$); # – достоверные отличия между группами СД30 и СД30+L-17.

Таблица 3. Изменение показателей белой крови крыс с СД30 и после введения L-17

	WBC, Г/л	Lym, Г/л	Mid, Г/л	Grn, Г/л	Lym, %	Mid, %	Grn, %
Интактная группа	10,76±0,79	5,0±0,74	0,81±0,27	5,18±0,84	45,9±4,81	8,9±3,25	46,0±7,14
СД 30	8,48±0,53*	4,64±0,49	0,73±0,17	3,1±0,53	55,36±4,1	8,36±1,88	36,27±2,14
СД30+L-17	7,0±1,42*	3,8±0,8	0,72±0,16	2,48±0,45*	53,4±2,15	10,0±0,71	36,6±2,8

Примечание: * – достоверные различия от группы интактных животных ($p < 0,05$); # – достоверные отличия между группами СД30 и СД30+L-17.

Таблица 4. Изменение показателей тромбоцитарного звена крови крыс с СД30 и СД30+L-17

	Plt, Г/л	Pct,%	MPV, фл	PDW,%
Интактная группа	665,18±32,86	0,46±0,02	6,71±0,06	11,08±0,13
СД30	548,36 ±35,1*	0,33±0,02*	6,14±0,07*	11,2±0,12
СД30+L-17	538,6±38,45*	0,35±0,1	6,8±0,18*,#	12,16±0,11*,#

Примечание: *— достоверные различия от группы интактных животных ($p < 0,05$); #— достоверные отличия между группами СД30 и СД30+L-17.

уменьшение общего числа тромбоцитов в сравнении с интактной группой. Наряду с этим, MPV и показатель анизоцитоза тромбоцитов (PDW) достоверно увеличивались при введении соединения L-17 по сравнению с интактными животными и группой СД30. Возрастание показателя анизоцитоза тромбоцитов, скорее всего связано, с увеличением функциональной активности тромбоцитов в ответ на введение соединения L-17 (таблица 4).

ВЫВОДЫ

Таким образом, развитие аллоксанового сахарного диабета приводит к изменению картины периферической крови крыс, выражающейся в увеличении анизоцитоза эритроцитов, снижении числа лейкоцитов и тромбоцитов, тромбоцитоза и среднего объема тромбоцитов. Введение крысам соединения L-17 из ряда замещенных 1,3,4-тиадиазинов с частично корректирует гематологические нарушения при этой экспериментальной патологии, что проявляется преимущественно изменениями показателей красной крови (увеличение концентрации гемоглобина, нормализация среднего содержания гемоглобина в эритроците и показателя анизоцитоза), а также увеличением среднего объема и показателя анизоцитоза тромбоцитов. С учетом вышесказанного, можно сделать вывод, что соединение L-17 обладает способностью корректировать не только метаболические, но и гематологические нарушения при экспериментальном сахарном диабете.

Работа выполнена при поддержке государственного бюджетного финансирования, тема № АААА-А18—118020 590 1070.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Волчегорский И. А., Тишевская Н. В., Дементьева Е. В. Антианемическое действие реамберина в остром периоде аллоксанового диабета у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008, 71, 6, 23–27. [Volchegorskiy I. A., Tishevskaya N. V., Dementieva E. V. Antianemic effect of Reamberin in the acute period of alloxan diabetes in rats // Experimental and Clinical Pharmacology. 2008, 71, 6, 23–27].
2. Данилова И. Г., Гетте И. Ф., Булавинцева Т. С. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент РФ №2534411.2014. [Danilova I. G., Gette I. F., Bulavintseva T. S. Method of modeling alloxan diabetes. Patent RF №2534411. 2014].
3. Емельянов В. В., Саватеева Е. А., Сидорова Л. П., Цейтлер Т. А., Булавинцева Т. С., Гетте И. Ф., Данилова И. Г., Максимова Н. Е., Мочульская Н. Н., Чупахин О. Н., Черешнев В. А. Коррекция метаболических нарушений при аллоксановом сахарном диабете производными 1,3,4-тиадиазина // Российский иммунологический журнал. 2015, 9(18), 2(1), 487–489. [Emelyanov V. V., Savateeva E. A., Sidorova L. P., Tseitler T. A., Bulavintseva T. S., Gette I. F., Danilova I. G., Maksimova N. E., Mochulskaya N. N., Chupakhin O. N., Chereshev V. A. The correction of metabolic disorders in alloxan diabetes with 1,3,4-thiadiazine derivatives. Russian Immunological Journal, 2015, 9(18), 2(1), 487–489].
4. Емельянов В. В., Леонтьев Д. В., Ищенко А. В., Булавинцева Т. С., Саватеева Е. А., Данилова И. Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой // Биофизика. 2016, 61, 6, 922–926. [Emelyanov V. V., Leontiev D. V., Ishchenko A. V., Bulavintseva T. S., Savateeva E. A., Danilova I. G. Atomic force microscopy of erythrocytes and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and its correction with lipoic acid // Biophysics. 2016. T. 61. № 6. S. 922–926].
5. Казаков В. Я., Постовский И. Я. Синтезы и некоторые реакции 4-замещенных тиосемикарбазидов. Доклады Академии Наук СССР. 1960, 134, 4, 824–827. [Kazakov V. Ya., Postovskiy I. Ya. Syntheses and some reactions of 4-substituted thiosemicarbazides. Reports of the Science Academy of USSR, 1960, 134, 4, 824–827].
6. Сидорова Л. П., Перова Н. М., Егорова Л. Г., Новикова А. П. Изучение реакционной способности 1,3,4-тиадиазинов в кислой и щелочной средах при трансформации в пиразолы // Тезисы I Всесоюзной конференции по теоретической органической химии. Волгоград, 1991, 232. [Sidorova L. P., Perova N. M., Egorova L. G., Novikova A. P. Study of

reactivity of 1,3,4-thiadiazines in acidic and alkaline media in the transformation into pyrazoles // Abstracts of the I all-Union conference on theoretical organic chemistry. Volgograd, 1991, 232].

7. Чупахин О. Н., Сидорова Л. П., Перова Н. М. и др. 2-аминопропилморфолино-5-арил-6Н-1,3,4-тиадиазины, дигидробромиды и 2-аминопропилморфолино-4-арилтиазолы, гидробромиды, обладающие антиагрегантным действием. Патент РФ №2456284. 2012. [Chupakhin O. N., Sidorova L. P.,

Perova N. M. et al. 2-aminopropylmorpholine-5-aryl-6H-1,3,4-thiadiazine, dihydrobromide and 2-aminopropylmorpholine-4-arylthiazole, hydrobromide possessing antiplatelet effect. Patent RF №2456284. 2012.]

8. Shestakova S. A., Stepanova R. P., Stepanian M. L., Cherniakova D. N. Structural changes in platelets in alloxan diabetes as parameters of their activation in the vascular bed and morphologic features // Tsitologiya. 1999. Vol. 41, № 2. P. 122–131.

THE EFFECT OF 2-MORPHOLINO-5-PHENYL-6H-1, 3, 4-THIADIAZINE HYDROBROMIDE ON THE CHANGE OF HEMATOLOGICAL INDICES OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES

© 2018 V. V. Emelyanov², S. A. Brilliant^{1,3}, I. F. Gette¹, I. G. Danilova^{1,2,3}, Y. N. Klyuyeva², L. P. Sidorova², T. A. Tseitler²

¹Institute of immunology and physiology of URO Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia;

²FGAOU VO "Ural Federal University named after the first President of Russia BN Yeltsin", Yekaterinburg, Russia;

³GAUZ WITH Institute of medical cellular technologies, Yekaterinburg, Russia

Received: 05.05.2018 Accepted: 08.06.2018

The article presents data on the effect of substituted 1, 3, 4-thiadiazine on the change in hematological parameters of rats with alloxan diabetes. It was found that the synthetic compound L-17 has the ability to correct hematological disorders in rats with alloxan diabetes.

Key words: blood, alloxan diabetes, 2-morpholino-5-phenyl-6H-1,3,4-thiadiazine, hydrobromide (compound L-17)

Authors:

Emelyanov V. V., Ph.D., Associate Professor of the Department of Medical Biochemistry and Biophysics of the Federal State Optical Institute of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Brilliant S. A., ✉ junior researcher immunophysiology and immunopharmacology laboratory, IIF UB RAS, junior scientific, CELB GUZ SO IMKT, Yekaterinburg, Russia;

620049 Yekaterinburg, Pervomayskaya str., 106. Phone: +79122070984, 8(343)3740070, **E-mail:** svetlana.brilliant@bk.ru

Gette I. F., Ph.D., laboratory of biochemistry and morphology, IIF UB RAS, Russian Federation, i.goette@yandex.ru

Danilova I. G., MD, Head of the laboratory of biochemistry and morphology, IIF, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, chief research Officer, CELB GUZ SO IMKT, Yekaterinburg, Russia;

Klyuyeva Y. N., assistant of the Department of medical biochemistry and biophysics of the Federal state optical Institute of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Sidorova L. P., Ph.D., FGAOU HPE «UrFU named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Tseitler T. A., Ph.D., associate professor of the Department of organic and biomolecular chemistry, FGAOU VPO «UrFU named after the first President of Russia BN. Yeltsin», Yekaterinburg, Russia.