Рекомендована д.ф.н., професором Л.В.Яковлєвою

УДК 615.37:615.279.3:615.28:615.015.11]001

ІМУНОМОДУЛЮЮЧА І ПРОТЕКТОРНА ДІЯ 1-R-БЕНЗІМІДАЗОЛІЛ-2-ОКСАМІНОВИХ КИСЛОТ ТА ЇХ ЕТИЛОВИХ ЕФІРІВ

Г.А.Чалий, О.В.Корольова, П.В.Калуцький, Ю.І.Гуторов, Є.Л.Снітковський

Українська фармацевтична академія

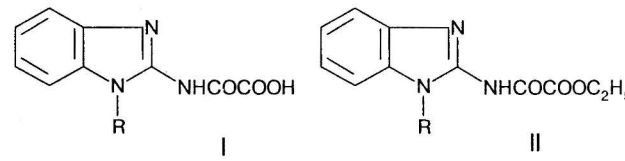
Курський медичний інститут

Вивчена дія 1-R-бензімідазоліл-2-оксамінових кислот та їх етилових ефірів на розвиток гуморальної імунної відповіді, індукованої тимусзалежним антигеном — еритроцитами барана. Досліджена протекторна дія зазначених сполук при генералізованій стафілококовій інфекції у мишей та антимікробна активність випробуваних речовин у відношенні стафілококу in vitro. Визначені сполуки, які виявляють комплекс названих видів активності та проаналізовані окремі закономірності зв'язку "хімічна структура—фармакологічна дія" в досліджуваному ряду похідних бензімідазолу.

Актуальною проблемою сучасної медицини є створення імунофармакологічних засобів, здатних впливати на певні ланки системи імунітету, ефективніших і менш токсичних у порівнянні з уже використаними. Найбільший інтерес серед синтетичних імуномодуляторів становлять похідні азолів, структурно схожих з природними метаболітами організму, зокрема, 2-амінобензімідазолу, який вміщує фрагмент імуноуреїдів — гуанідинове угрупування [13, 16]. Літературні дані свідчать про вибіркову дію деяких карбаматбензімідазолів (медаміну, мебендазолу) на функціональну активність імунокомпетентних клітин (макрофаги, Т- і В-лімфоцити та їх окремі субпопуляції, процеси міграції клітин та ін.) [1-3, 13].

Деякі з синтезованих нами раніше функціональних похідних 1-R-бензімідазоліл-2-оксамінових кислот виявляють аналгетичну, протигіпоксичну та антиаритмічну активність у поєднанні з низькою токсичністю [8, 17]. У відповідності до вимог Фармакологічного комітету обов'язковою частиною загальної програми доклінічної оцінки нешкідливості сполук, перспективних в ролі субстанцій для фармпрепаратів, є вивчення їх імунотоксичних властивостей [9]. З метою з'ясування впливу окремих структурних фрагментів оксамоїлпохідних, що вивчаються, на імунотропну активність нами досліджена дія сполук на розвиток первинної гуморальної імунної відповіді (ГІВ), індукованої тимусзалежним антигеном — еритроцитами барана (ЕБ). Крім того відомо, що імуномодулююча дія ряду похідних азолів зумовлена підвищенням резистентності організму до інфекцій, викликаних стафілококами, які виявляють множинну стійкість до ліків [4, 5, 15]. В зв'язку з цим в серії експериментів на тваринах нами досліджена протекторна дія найактивніших імуномодуляторів при генералізованій формі стафілококової інфекції та їх антимікробні властивості in vitro.

Як об'єкти дослідження, були вибрані 1-R-бензімідазоліл-2-оксамінові кислоти (I) та етилові ефіри названих кислот (II), формули яких наведені нижче:



R = C_4H_9 (Ia, IIa), $CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$ (Iб, IIб)

Результати проведених досліджень показали, що 1-R-бензімідазоліл-2-оксамінові кислоти та їх етилові ефіри виявляють різноспрямовану дію на індуктивну фазу ГІВ. Про це свідчить кількість антитіловиробляючих клітин (АВК) і розетковиробляючих клітин (РВК) на п'яту та шосту добу після імунізації (табл. 1). Встановлено, що кислоти I пригноблюють ГІВ. Найбільш високу і тривалу імуносупресивну дію на показники ГІВ справляє 1-діетиламіноетилбензімідазоліл-2-оксамінова кислота (Iб) при введенні для імунізації тварин. Під впливом цієї речовини кількість АВК і РВК на 5-й день після імунізації знижується до

Таблиця 1

Вплив кислот Іа,б та ефірів IIа,б на ГІВ у щурів, імунізованих ЕБ, при введенні до або після імунізації

№ п/п	Умови досліду	Статистичні показники	Кількість на селезінку			
			АВК · 10^3		РВК · 10^6	
			5-й день	8-й день	5-й день	8-й день
1	Контроль 1,ЕБ	M±σ %	57,3±9,4 100	32,4±6,3 100	58,6±4,8 100	85,5±8,1 100
2	Сполука Іа (2,5 мг/кг)+ЕБ	M±σ % P	38,1±2,9 66 <0,05	25,1±2,2 70 <0,05	41,0±3,5 70 <0,05	70,7±7,2 83 <0,05
3	Сполука Іб (15 мг/кг)+ЕБ	M±σ % P	10,2±2,2 18 <0,01	12,5±2,0 39 <0,01	29,9±1,2 51 <0,01	50,3±3,0 59 <0,01
4	Сполука IIа (61 мг/кг)+ЕБ	M±σ % P	146,1±14,9 255 <0,01	24,2±1,6 74 <0,05	99,6±9,1 70 <0,05	64,8±5,1 76 <0,05
5	Сполука IIб (160 мг/кг)+ЕБ	M±σ % P	121,4±11,9 212 <0,05	42,7±3,1 32 <0,05	96,7±6,3 165 <0,05	101,8±8,0 119 >0,05
6	Контроль 2,ЕБ	M±σ %	39,2±3,7 100	27,1±3,5 100	44,0±3,5 100	66,9±5,5 100
7	ЕБ+сполука Іа (2,5 мг/кг)	M±σ % P	23,3±2,7 60 <0,05	15,8±2,8 58 <0,05	29,3±2,0 67 <0,05	45,8±3,5 68 <0,05
8	ЕБ+сполука Іб (15 мг/кг)	M±σ % P	22,1±5,3 56 <0,05	18,9±2,1 70 <0,05	27,5±1,9 63 <0,05	53,5±4,9 80 >0,05
9	ЕБ+сполука IIа (61 мг/кг)	M±σ % P	386,5±32,2 986 <0,01	37,8±3,9 140 <0,05	175,9±19,9 400 <0,01	80,2±8,9 120 >0,05

18% та 49% відповідно, на 8-й день — до 51% та 59% (P<0,01). Згідно з даними літератури імуносупресивні властивості сполук можуть реалізуватися, з одного боку, через гальмування міграції стовбурових клітин, а також Т- і В-лімфоцитів із впливом на їх рецепторний апарат, а, з іншого боку — перешкоджаючи передаванню антигенної інформації, зменшуючи фагоцитарну активність і хемотаксис полі- та мононуклеарних лейкоцитів [12]. Тому імуносупресивна дія наведених сполук потребує більш поглибленого вивчення.

Етилові ефіри II виявляють значну імуностимулюючу активність. При цьому дія ефіру IIб, який вміщує 1-діетиламіноетильну групу, триваліша — зберігається за числом АВК до 8-го дня з показником 132% (P<0,05). При ін'єкції етилового ефіру 1-бутилбензімідазоліл-2-оксамінової кислоти (IIа) — на протязі трьох днів після імунізації; на 5-й день спостерігали максимальний ефект імуностимуляції на продукцію АВК (до 986%) і РВК (до 400%).

На підставі одержаних даних можна припустити, що спрямованість імуномодулюючої дії серед 1-R-бензімідазоліл-2-оксамінових кислот та їх етилових ефірів зумовлюється структурою оксамоїльного фрагмента. Рівень показників їх імуномодулюючих ефектів залежить від характеру радикалів у положенні 1 імідазольного кільця і співвідношення строків введення речовин та імунізації.

Дослідження виживання тварин при стафілококовій інфекції показало, що сполуки Іб та IIа виявляють значну протекторну дію при генералізованій стафілококовій інфекції у випадку п'ятиразового введення речовин лабораторним тваринам до інфікування (табл. 2). Слід відзначити, що кислота Іб, яка пригноблює ГІВ, індукований за допомогою ЕБ, виявляє найбільш високу хіміотерапевтичну активність: забезпечує виживання 100% мишей, інфікованих сублетальною дозою стафілококу, і 60% мишей, інфікованих летально. Значно слабше виражена, всупереч до очікуваної, захисна дія імуностимулятора — етилового ефіру 1-бутилбензімідазоліл-2-оксамінової кислоти (IIа), при введенні якого вижили відповідно 60% і 50% тварин. Проте, середня тривалість життя мишей, що загинули в цих дослідах, продовжувалась 9,0 та 8,2 доби, що на 5 діб більше, ніж у контрольних групах. При

Таблиця 2

Протекторна дія кислоти Іб та ефіру IIа при генералізованій стафілококовій інфекції

№№ груп	Умови досліду	Доза стафілококу, мікробних тіл	Кількість мишей, які вижили		Середня тривалість життя мишей, доби
			абсолютна, особин	відносно загального числа тварин у групі, %	
1	Контроль, інфікування	$1 \cdot 10^9$	2	10	3,2
2	Контроль, інфікування	$2 \cdot 10^9$	0	0	2,5
3	Сполука Іб+інфікування	$1 \cdot 10^9$	20	100	-
4	Сполука Іб+інфікування	$2 \cdot 10^9$	12	60	1,3
5	Інфікування+сполука Іб	$1 \cdot 10^9$	10	50	4,6
6	Інфікування+сполука Іб	$2 \cdot 10^9$	4	20	2,7
7	Сполука IIа+інфікування	$1 \cdot 10^9$	12	60	9,0
8	Сполука IIа+інфікування	$2 \cdot 10^9$	10	50	8,2
9	Інфікування+сполука IIа	$1 \cdot 10^9$	4	20	2,8
10	Інфікування+сполука IIа	$2 \cdot 10^9$	0	0	2,7

*Сполуки вводили до або після інфікування мишей стафілококом в добових дозах 15 мг/кг (Іб)та 61 мг/кг (IIа).

введенні кислоти Іб після зараження тварин сублетальною дозою стафілококу її протекторний ефект знижується до 50%, летальною дозою — до 20%. Ефір IIа при цьому режимі призначення не справляє лікувальної дії — загибель тварин відбувається на рівні нелікованих.

В зв'язку з високою протекторною активністю речовин, які досліджувалися, при генералізованій формі стафілококової інфекції вивчали також їх антимікробну дію у відношенні стафілококу in vitro. Встановлено, що етиловий ефір IIа виявляє антимікробну дію in vitro: діаметр зони затримки зростання тест-мікроорганізмів становив 16 мм. Кислота Іб не виявляє антимікробної активності in vitro.

Одержані результати дозволяють зробити висновок, що протекторна дія етилового ефіру IIа при генералізованій стафілококовій інфекції зумовлена, певно, поєднанням його імуностимулюючої та бактеріостатичної активності. Механізми імуносупресивної та протекторної дії кислоти Іб потребують подальшого вивчення. На підставі наведених даних можна припустити, що протекторна дія цієї сполуки пов'язана з його стимулюючим впливом на функціональну активність фагоцитів або на продукцію антистафілококового антитоксину, що буде предметом подальших досліджень.

Експериментальна частина

Вплив оксамоїлпохідних на індуктивну фазу ГІВ до ЕБ вивчали в серії дослідів на 288 щурах Вістар масою 180-220 г по 8 тварин у кожній групі. Сполуки, що досліджувалися, застосовували у вигляді розчинів (сполука Іб) або суспензій (сполуки Іа, IIа та IIб), приготованих на 0,9%-ному розчині натрію хлориду, і вводили внутрішньоочеревинно триразово (з інтервалом 24 год.) до або після антигенної стимуляції, в дозах, що відповідають 1/10 LD_{50}. Тварин імунізували суспензією ЕБ одноразово, внутрішньоочеревинно з розрахунку $2 \cdot 10^8$ клітин на 100 г маси тіла. Інтенсивність розвитку ГІВ оцінювали на 5-й та 8-й день після імунізації за кількістю АВК [10] і РВК [18]. В контрольній групі щури були імунізовані тільки ЕБ і одержували фізрозчин.

Протекторну дію сполук встановлювали на моделі генералізованої стафілококової інфекції [11] в дослідах на 200 мишах-гібридах F1 (CBAxC57BL) масою 18-20 г по 20 тварин в групі. Для зараження мишей використовували змив добової агарової культури Staphylococcus aureus (штам 142, тип "Жаєв"). Інфікування тварин проводили внутрішньоочеревинною ін'єкцією спочатку відтитрованих доз стафілококу, що вміщували $1 \cdot 10^9$ (сублетальна доза) або $2 \cdot 10^9$ (летальна доза) мікробних тіл. Речовини, які досліджувалися, вводили тваринам протягом 5-ти діб до або після зараження в дозах, що відповідають 1/10 LD_{50}. В контрольній групі були миші, заражені стафілококом, які одержували в ті самі терміни фізрозчин. На протязі 10 діб з моменту зараження відмічалось виживання та середня тривалість життя тварин.

Антимікробну активність сполук in vitro визначали методом дифузії в шар агару [6]. Випро-

бували розчин або суспензії сполук в концентрації 500 мкг/мл, приготовані на стерильному фізрозчині. Антимікробну дію сполук оцінювали за діаметром зон пригноблення зростання стафілококу в міліметрах.

Статистичну обробку цифрового матеріалу проводили методом обчислення середньої арифметичної (M) і квадратичного відхилення (AMs) [4]. Істотність розбіжностей оцінювали за допомогою критерію Вілкоксона-Манна-Уітні при P<0,05 або P<0,01 [7].

ВИСНОВКИ

1. 1-R-Бензімідазоліл-2-оксамінові кислоти пригноблюють індуктивну фазу розвитку гуморальної імунної відповіді, індукованої тимусзалежним антигеном. Найбільшу імуносупресивну дію до еритроцитів барана справляє 1-діетиламіноетилбензімідазоліл-2-оксамінова кислота при введенні до імунізації.

2. Етилові ефіри 1-R-бензімідазоліл-2-оксамінових кислот стимулюють індуктивну фазу гуморальної імунної відповіді на тимусзалежний антиген. Максимальну імуностимулюючу дію виявляє етиловий ефір 1-бутилбензімідазоліл-2-оксамінової кислоти при введенні після імунізації.

3. 1-Діетиламіноетилбензімідазоліл-2-оксамінова кислота і етиловий ефір 1-бутилбензімідазоліл-2-оксамінової кислоти виявляють протекторну дію при генералізованій стафілококовій інфекції у випадку п'ятиразового введення до інфікування мишей сублетальною та летальною дозами стафілококу.

4. Етиловий ефір 1-бутилбензімідазоліл-2-оксамінової кислоти відрізняється антимікробною дією у відношенні до стафілококу in vitro. 1-Діетиламіноетилбензімідазоліл-2-оксамінова кислота не виявляє подібної дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Абайтова Н.Е., Романов В.А.// Иммунология. — 1991. — №3. — С. 43-45.*
2. *Абайтова Н.Е., Романов В.А. Иммуномодулирующие эффекты вермокса (мебендазола)// I съезд иммунологов России: тез. докл. — Новосибирск, 1992. — С. 3.*
3. *Барышев М.Д., Введенская Г.П.// Мед. паразитол. и паразитар. болезни. — 1986. — №3. — С. 59-62.*
4. *Бранде А.И., Бухарин О.В. Новые бензимидазольные производные со свойствами повышать неспецифическую устойчивость организма к экспериментальной инфекции// Тр./ Центр. ин-т усоверш. врачей. — М., 1967. — Т. 108. — 147 с.*
5. *Васильева В.И., Семененко Т.А., Тарасенко О.А. и др. Стимулирующее влияние производных бензимидазола на иммунологическую реактивность и неспецифическую резистентность организма человека// Иммуномодуляторы в инфекционной патологии. — М., 1988. — С. 26-32.*
6. *Государственная фармакопея СССР. — 10 изд. — М.: Медицина, 1968. — С. 943-944.*
7. *Гублер Е.В., Генкин А.А. Случай независимых выборок// Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.*
8. *Королева Е.В., Черных В.П., Чалый Г.А. и др. Поиск биологически активных соединений в ряду N-2-(1-R-бензимидазолил)-оксаминовых кислот и их функциональных производных// Кур. гос. мед. ин-т. — Курск, 1993. — 13 с. — Деп. в ВИНИТИ 23.02.93., №439-В93.*
9. *Кудрин Г.П., Алтынбаев Р.Д., Буров Ю.В. и др. Методические рекомендации к оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. — М., 1992. — 39 с.*
10. *Мальберг К., Зигль Э. Метод локального гемолиза// Иммунологические методы// Под ред. Г.Фримеля/ Пер. с нем. А.П.Тарасова. — М., 1987. — С. 57-72.*
11. *Падейская Е.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. — М.: Медицина, 1971. — С. 109.*
12. *Петрова И.В. Иммуносупрессия. Иммунодепрессивные свойства нестероидных противовоспалительных препаратов// Мед. реф. журн. XXI, ВНИИМИ. — 1981. — №3. — С. 40-44.*
13. *Сибиряк С.В., Строкин Ю.В., Садыков Р.Ф. и др.// Хим. фармац. журн. — 1990. — №11. — С. 19-24.*
14. *Стрелков Р.Б. Метод вычисления стандартной ошибки и доверительных интервалов с помощью таблицы. — Сухуми: Алашара, 1966. — 41 с.*
15. *Теплова С.Н., Радкевич Н.В. Конференция по вопросам неспецифической профилактики инфекций и методам повышения сопротивляемости организма в процессе лечения. — Мат-лы, Челябинск, 1961. — С. 142-143.*
16. *Чалый Г.А., Кочинова О.Ф., Зубкова И.В. и др. Исследование иммуномодулирующих свойств некоторых производных 2-аминобензимидазола// Биофизич. и клинич. аспекты экологич. исследований. Курск, 1989. — С. 58-59.*
17. *Черних В.П., Чалий Г.А., Корольова О.В. та ін.// Вісник фармації. — 1993. — №1-2. — С. 113-115.*
18. *Jondal M., Holm G., Wigzell H.// J.exp. Med., 1972. — Vol. 126. — P. 207-215.*

УДК 615.37:615.279.3:615.28:615.015.11]001

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ И ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ 1-R-БЕНЗИМИДАЗОЛИЛ-2-ОКСАМИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ

Г.А.Чалый, Е.В.Королева, П.В.Калуцкий, Ю.И.Гуторов, Е.Л.Снитковский

Изучено действие 1-R-бензимидазолил-2-оксаминовых кислот и их этиловых эфиров на развитие первичного гуморального ответа (ГИО), индуцированного тимусзависимым антигеном — эритроцитами барана (ЭБ). Установлено, что изученные кислоты угнетают индуктивную фазу ГИО, индуцированного ЭБ, а этиловые эфиры названных кислот стимулируют индуктивную фазу ГИО на ЭБ. У двух наиболее активных иммуномодуляторов из групп кислот и их эфиров выявлено протекторное действие, а у этилового эфира, проявляющего иммуностимулирующую и протекторную активность, обнаружен также и антимикробный эффект.

UDC 615.37:615.279.3:615.28:615.015.11]001

IMMUNOMODULATIVE AND PROTECTIVE ACTION OF 1-R-2-BENZIMIDAZOLYLOXAMINIC ACIDS AND THEIR ETHYL ESTERS

G.A.Chaly, E.V.Korolyova, P.V.Kalutsky, Yu.I.Ghutorov, E.L.Snitkovsky

It is examined the action of 1-R-2-benzimidazolyloxaminic acids and their ethyl esters on the development of primary humoral immunical answer (HIA), induced by thymusdepended antigen — ram's erythrocytes (RE). It was established that the acids under investigation inhibit inductive phase of HIA, induced by RE, while ethyl esters of these acids stimulate inductive phase of HIA, induced by RE. Two the most active immunomodulators of the acids and the esters series were found to possess a protective action. Besides that ethyl ester with an immunostimulative and a protective activities was found to produce an antimicrobial effect.

ДОВІДНИК ВФ

КУРС ЛЕКЦІЙ З ФАРМАКОЛОГІЇ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ

(у 3-х частинах)

Видавництво "Основа", Харків, 1990 р. Під редакцією проф. С.М.Дроговоз

С.М.Дроговоз, Н.Л.Кузнєцова, Л.В.Яковлєва, І.М.Риженко, І.А.Зупанець, Н.В.Бездєтко, С.І.Сальникова, О.В.Бикова

В учбовому посібнику висвітлені питання загальної і конкретної фармакології. Кожна лекція побудована в чіткій логічній послідовності: актуальність теми лекції для провізорів, механізм дії, фармакодинаміка, показання до застосування, порівняльна характеристика лікарських препаратів. Така послідовність вчить студента, який знає механізм дії, орієнтуватись у фармакодинаміці ліків, а знання фармакодинаміки дає змогу правильно визначити показання і протипоказання до їх використання.

Для студентів фармінститутів.