

NEW PHYTOPREPARATION TN INTERFERON-INDUCING ACTIVITY

Kozlovsky M., Benzel L., Drul O., Fedoruk V., Golovatska Zh.
Lviv research institute of Epidemiology and Hygiene

As a result of retrieval of new plant matter interferon inducing agents active phytopreparation TN extracted from a herb *Cotinus coggygia* was discovered. Being tested on laboratory mice, this preparation demonstrated highly expressed interferon-inducing activity, nearly equal to the one of well-known commercial interferon inductor Ridostinum (2560-5120 U/ml). Refractory period after re-infusion of preparation was in the range of 12-96 hours. Definitively optimal conditions of phytopreparation TN use are to be determined after it's testing on experimental models of viral and bacterial infections.

PASS-СКРИНІНГ ПОХІДНИХ ПІРИМІДИНУ

Колесніков О.В., Черних В.П., Шемчук Л.А.
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

В даний час в розвинених країнах світу пошук нових ліків на основі синтетичних субстанцій переважно заснований на скринінгу *in vitro* великих масивів хімічних речовин відносно порівняно невеликого переліку необхідних видів біологічної активності (macromolecular targets). Властивості виявлених таким шляхом базових структур (lead compounds) в подальшому оптимізуються шляхом синтезу і дослідження великого числа їх аналогів. При цьому багато видів біологічної активності, властивих речовинам, що вивчаються, але є "побічними" по відношенню до вибраного напрямку досліджень, залишаються невивченими. "В спадок" від СРСР Росії, Україні, і іншим незалежним державам дісталася достатньо розвинена органічна хімія синтетичних і природних речовин. Згідно оцінкам провідних фармацевтичних фірм, найкрупніші масиви хімічних сполук, синтезованих "уручну" (без використання комбінаторної хімії) і доступних в даний час для скринінгу, забезпечуються хіміками з країн СНД [4, 6, 8].

Одним із напрямків синтетичних досліджень кафедри органічної хімії НФаУ є похідні піримідину та дикарбонових кислот, які є природними метаболітами організму і привертають увагу дослідників, як потенційні біологічно активні речовини. На їх основі створено багато фармакологічно активних сполук, які знайшли застосування у медичній практиці: фторурацил

протиухлинна активність), зідовудін (противірусна), оротова кислота та метилурацил (анаболічна активність), барбітурати (седативна та протиепілептична дія), урапідил та міноксидил (вазодилататорна дія), триамтерен та аллаціл (діуретики), триметоприм та сульфадиметоксин (протимікробна активність) та ін. [5]. Якщо включити в одній структурі піримідиновий цикл та залишок карбонової кислоти, то це може призвести до сполук з новою фармакологічною дією, що робить актуальним синтез нових сполук.

Нами розроблено метод синтезу похідних 5-гідразинооротової і 5-амінооротової кислот та синтезовані сполуки на основі 1,4,6-триаміно-1,2-дигідро-2-піримідинтіону [1-3]. Синтез здійснювали взаємодією 5-гідразинооротової і 5-амінооротової кислот з карбонним ангідридом, в результаті чого утворювались нові конденсовані гетероциклічні сполуки, в молекулу яких потім включались залишки дикарбонових кислот, при подальшому гліцизуванні. При реакції 1,4,6-триаміно-1,2-дигідро-2-піримідинтіону з монокарбонільними сполуками утворювались гетероцикли при подальшому конденсуванні з похідними карбонових кислот. Наступним шляхом нашої роботи стало здійснення віртуального скринінгу синтезованих сполук з використанням сучасних комп'ютерних технологій. Для розв'язання поставленої задачі було використано програму PASS Prediction Activity Spectra for Substances), яка прогнозує 900 видів біологічної активності по структурній формулі хімічної речовини, включаючи основні і побічні фармакологічні ефекти, механізми дії, мутагенність, канцерогенність, тератогенність та тератоксичність [7,9].

Робота PASS заснована на аналізі залежності "структура-активність" для речовин з повчальної вибірки, що містить більше 45000 різноманітних біологічно активних речовин (субстанції різних лікарських препаратів і фармакологічно активні сполук). Хімічна структура представлена в PASS у вигляді оригінальних MNA дескрипторів (Multilevel Neighbourhoods Atoms), які мають універсальний характер і з достатньою точністю описують різноманітну залежність "структура-властивість". Середня точність прогнозу при ковзаючому контролі складає близько 85%.

Результати прогнозу видаються користувачу у вигляді списку назв вірогідних видів активності з розрахунковими оцінками вірогідності наявності (Pa) і відсутності кожного виду активності (Pi), яка має значення від 0 до 1. Ця вірогідність розраховується

незалежно по підвибірках активних і неактивних сполук, і тому їх сума не рівна одиниці. P_a і P_i інтерпретуються як оцінки міри приналежності речовини до класів активних і неактивних сполук відповідно, або як оцінки помилок першого і другого роду. Чим більше для конкретної активності величина P_a і чим менше величина P_i , тим більше шанс знайти дану активність в експерименті [10, 12]. Якщо при аналізі прогнозованого списку активностей для дослідження вибираються ті види активності, для яких $P_a > 90\%$, то ми ризикуємо пропустити біля 90% дійсно активних сполук, але вірогідність не відповідати дійсності прогнозів при цьому нікчемна мала. Крім того слід врахувати, що інші комп'ютарні програми (QSAR і 3D молекулярне моделювання успішні в прогнозі біологічної дії для хімічних структур за умови, що вони працюють з нечисленністю типів діяльності і звичайно залишаються в тих же хімічних серіях, в той самий час, як PASS надає можливість працювати з численними типами діяльності в різних хімічних серіях) [11,13].

З урахуванням результатів прогнозування біологічної активності зробленої програмою PASS, здійснено біологічний скринінг на культурах клітини та мишах. Цитотоксичність препаратів вивчали з використанням комерційного тесту - "CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" (Promega). Тест заснований на кількісному визначенні активності ферменту лактатдегідрогенази, що звільняється з цитоплазми при лізисі клітин. Як клітини-мішені використовували лінію людських гепатоцитів Hep-2, концентрації 2000000 кліток/мл. Препарати досліджувалися в кінцевих концентраціях 10, 50, 100 і 1000 мкг/мл. Як позитивний контроль використовувався гентаміцин в концентрації 50 мкг/мл. Зимірювання активності лактатдегідрогенази, по кінцевому продукту формазану нітротетразолію, проводили на планшетній фотометрії Tecan Classic (Австрія) при довжині хвилі 492 нм. Цитотоксичність розраховувалася як відсоток від активності лактатдегідрогенази, одержаної при лізисі всіх клітин - мішеней, за вирахуванням спонтанної цитотоксичності.

Дослідження на здатність індуктувати апоптоз з використанням лінії пухлинних клітин HeLA людини. Дослідження засновано на вивченні морфологічних особливостей клітини, вступаючої в апоптоз (утворення глибок хроматину в ядрі, та руйнування цитоплазматичних і мембранних структур).

Клітини інкубувалися протягом 8 годин в середовищі RPMI 1640, з додаванням 10% фетальної сироватки теляти, у присутнос-

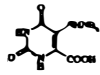
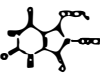
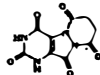
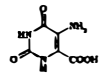

ті препаратів, що вивчаються. Препарати додавалися в концентраціях 10, 50, 100 мкг/мл. Як позитивний контроль в культуру додавали ФНО-альфа в концентрації 500 од/мл і актиноміцин D в концентрації 1 мг/мл. Клітинна суспензія фіксувалася 8% розчином формаліну і потім забарвлювалася флуоресцентним фарбником Hoechst 33342 в концентрації 5 мкг/мл. Проби інкубувалися в темноті протягом 5 мін. За допомогою флуоресцентного мікроскопа оцінювався зміст клітин з "нормально" або "апоптично" розташованою в ядрі ДНК.


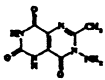
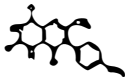
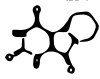


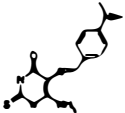

Вплив сполук на периферичну ноцицептивну систему вивчали на моделі опігово-кислих корчів у мишей. У механізмі розвитку цієї патології беруть участь калекреїн-кінінова система, біогенні аміни, простагландини (ПГ) та лейкотриєни (ЛТ), які є ендогенними альгогенами та сприяють розвитку судомних скорочень черевних м'язів. Це супроводжується витягуванням задніх кінцівок та прогинанням спини [1]. Вивчення впливу сполук на розвиток ноцицептивної реакції дозволяє визначити здатність речовини інгібувати медіатори болю та розвиток больової реакції. У експерименті використовували білих мишей обох статей масою 18-20 г. по 5 тварин у групі. Корчі викликали внутрішньочеревним введенням 0,67% розчину опігової кислоти з розрахунку 0,1 мл на 10 г маси тіла тварини через 60 хв. після внутрішньошлункового введення досліджуваних речовин. Як референт-препарат використовували широко використовуваний та найбільш ефективний засіб з групи нестероїдних протизапальних засобів вольтарен, який володіє вираженими анальгетичними та протизапальними властивостями. Досліджувані речовини та препарат порівняння вольтарен вводили перорально у дозах 1,0, 5,0 та 10,0 мг/кг, які були обрані згідно з Методичними рекомендаціями ДФЦ МОЗУ [1], з метою визначення ЕД50 на цій моделі. Величини ЕД50 розраховували з використанням метода найменших квадратів. Контрольна група мишей одержувала еквівалентну кількість розчинника. Підрахунок кількості "корчів" починали після введення опігової кислоти та проводили протягом 20 хвилин. По закінченню експерименту тварин наркотизували ефіром та виводили з дослідження за допомогою дислокації шийних хребців. Анальгетичну активність досліджуваних сполук оцінювали за їх здатністю зменшувати кількість корчів у дослідній групі тварин у порівнянні з контрольною і виражали у %, розрахунок проводили за такою формулою:

$$AA = \frac{C_k - C_0}{C_k} \times 100, \text{ де}$$

- AA - анальгетична активність у %;
- C_k - середня кількість корчів у тварин контрольної групи;
- C₀ - середня кількість корчів у тварин дослідної групи.

Ми поставили перед собою мету - порівняти наскільки є вірогідним прогноз, зроблений програмою PASS, з результатами біологічних досліджень, отриманими на практиці. Метою наведеної нижче таблиці являється наглядне представлення порівняльної характеристики конкретної біологічної активності сполук, отриманих експериментальним та розрахунковим (PASS) шляхом.

Хімічна структура сполуки	Прогноз біологічної активності по PASS		Результати біологічної дії отримані в експерименті	
	Pa-Pi	Вид біологічної активності	Результати скринінгу	Вид біологічної дії
	0,738	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=22%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія
	0,731	Анальгетик	ЕД ₅₀ =0,51 мг/кг	Анальгетична
	0,844	Агоніст аптопозу	Апoptичний індекс =38%, при 10мкг/мл	Агоніст аптопозу
	0,194	Анальгетик	ЕД ₅₀ =0,53 мг/кг	Анальгетична
	0,572	Противірусна активність (herpes)	IC ₅₀ =0.54μM	Противірусна активність (herpes)
	0,575	Противірусна активність (herpes)	IC ₅₀ =0.41μM	Противірусна активність (herpes)
	0,579	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=20%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія
	0,536	Противірусна активність (herpes)	IC ₅₀ =0.337 M	Противірусна активність (herpes)
	0,528	Антибактеріальна активність	Найнижча концентрація яка інгібує ріст Candida albicans=250, та Aspergillus niger=250	Антибактеріальна активність

	0,432	Противірусна активність (hepves)	IC ₅₀ =0,447 M	Противірусна активність (hepves)
	0,639	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=21%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія
	0,557	Противірусна активність (hepves)	IC ₅₀ =0,117 M	Противірусна активність (hepves)
	0,423	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=19%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія
	0,513	Противірусна активність (hepves)	IC ₅₀ =1,297 M	Противірусна активність (hepves)
	0,611	Анальгетична на сполуки	ЕД ₅₀ =1,1 мг/кг	Анальгетична
	0,444	Противірусна активність (hepves)	IC ₅₀ =1,047 M	Противірусна активність (hepves)
	0,615	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=22%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія
	0,825	Агоніст апоптозу	Апоптичний індекс <35%, при 10мкг/мл	Агоніст апоптозу
	0,792	Агоніст апоптозу	Апоптичний індекс <31%, при 10мкг/мл	Агоніст апоптозу
	0,588	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=21%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія
	0,521	Противірусна активність (hepves)	IC ₅₀ =0,967 M	Противірусна активність (hepves)
	0,674	Регулятор процесів біосинтезу нуклеотидів	Цитотоксичний індекс=24%, при 10мкг/мл	Цитотоксична дія

ВИСНОВКИ

1. За допомогою комп'ютерної програми PASS був проведений віртуальний скринінг синтезованих сполук та порівнян з біологічною дією отриманою в експерименті.
2. Порівняльний аналіз результатів прогнозування і виявлення біологічної дії показав, дуже високу прогностичну здатність даної програми та доцільність її використання при плануванні роботи з синтезу та пошуку нових біологічно активних речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Колесніков А. В., Черних В.П., Шемчук Л.А.// Вісник фармації. - 2002, №1(29). - С. 10-13.
2. Колесніков А. В., Черних В.П., Шемчук Л.А.// Вісник фармації. - 2002, №4(32). - С. 3-6.
3. Колесніков А. В., Черних В.П., Шемчук Л.А.// Вісник фармації. - 2003, №3(35). - С. 3-6.
4. Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В. Компьютерный поиск потенциальных антигипертензивных соединений комбинированного действия. // Хим.-фарм. журн. - 2001, №35 (7). - С.28-34.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х т. 12-е изд. е. - М.: Медицина, 1993. Т.1.-731 с., Т.2.- 685 с.
6. Поройков В.В., Филимонов Д.А. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств. В сб.: Азотистые гетероциклы и алкалоиды. - Москва: Иридий-пресс, 2001. - Т.1. - С.123-129.
7. Поройков В.В. Компьютерное предсказание биологической активности веществ: пределы возможного. // Химия в России. - 1999. - № 2. - С. 8-12.
8. Anzali S., Barnickel G., Cezanne B., Krug M., Filimonov D., Poroikov V. Discriminating between drugs and nondrugs by Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). // J. Med. Chem. - 2001. - 4 (15). - P. 2432-2437.
9. Filimonov D., Poroikov V., Borodina Yu., Glorizova T. Chemical similarity assessment through multilevel neighborhoods of atoms: definition and comparison with the other descriptors. // J. Chem. Inf. Comput. Sci. - 1999. - 39 (4). - P. 666-670.
10. Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. // Bioinformatics. - 2000. - 16 (8). - P. 747-748.
11. Poroikov V., Filimonov D. Computer-aided prediction of biologi-