

УДК 615.076

ВПЛИВ НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ФУНГІСТАТИЧНИХ АГЕНТІВ НА ДЕЯКІ ФУНКЦІЇ КЛІТИН КРОВІ ЛЮДИНИ

Л.Є.Калашнікова, І.М.Коперник, І.В.Семенюта, Л.П.Голод, Д.М.Година, Л.О.Метелиця

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: metelitsa@bpci.kiev.ua**Ключові слова:** *in vitro* скринінг; оксазолі; азотовмісні бісфосфонати; функціональні біосенсори

Для *in vitro* скринінгу нових біологічно активних функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів з відомою фунгістатичною активністю використовували як біосенсори еритроцити та лейкоцити крові людини. Встановлено, що жодна з досліджуваних сполук не виявила гемолітичної дії у реакції осмотичного гемолізу еритроцитів крові. Всі сполуки достовірно змінювали швидкість осідання еритроцитів крові – функціонально заміщені оксазолі знижували реакцію приблизно на 70%, а азотовмісні бісфосфонати збільшували приблизно на 30%. Встановлена реактивність може свідчити про високу тропність досліджуваних сполук до адренорецепторів мембрани клітин. Дана активність може бути використана для характеристики та прогнозування ряду інших потенційних ефектів сполук-антимікотиків, що вивчалися. Результати НСТ-тесту свідчать, що функціонально заміщені оксазолі є активаторами антимікробного потенціалу нейтрофільних лейкоцитів крові і можуть розглядатися як потенційні стимулятори реакційної здатності неспецифічного імунітету людини. Отримані експериментальні дані суттєво розширюють спектр біологічних ефектів синтезованих сполук-фунгістатиків і підтверджують перспективність їх подальшого вивчення як потенціальних антимікотичних засобів. Скринінг *in vitro* з використанням як біосенсорів клітин крові людини є важливою частиною дослідження потенційних лікарських засобів і може бути рекомендований для тестування нових біологічно активних сполук з відомою біологічною активністю.

THE EFFECT OF NEW POTENTIAL FUNGISTATIC AGENTS ON SOME HUMAN BLOOD CELLS FUNCTIONS L.E.Kalashnikova, I.M.Kopernyk, I.V.Semenyuta, L.P.Golod, D.M.Hodyna, L.O.Metelytsya

Key words: *in vitro* screening; oxazoles; nitrogen-containing bisphosphonates; functional biosensors

Erythrocytes and neutrophilic leukocytes of human blood have been used as biosensors for *in vitro* screening of new biologically active functionally substituted oxazoles and nitrogen-containing bisphosphonates with the known fungistatic activity. It has been found that none of the compounds under research do not reveal the hemolytic action in the reaction of osmotic hemolysis of human red blood cells. For all compounds tested the erythrocyte sedimentation rate is changed. The functionally substituted oxazoles decreased the reaction rate approximately by 70%, and nitrogen-containing bisphosphonates increased it approximately by 30%. The reactivity found can indicate high affinity of the compounds studied to erythrocyte membranes adrenoreceptors. It can be used for characteristics and prediction of a number of other potential effects of the antimycotical compounds tested. According to the NBT-test the functionally substituted oxazoles are activators of the antimicrobial potential of neutrophilic leukocytes and can be considered as potential stimulators of nonspecific human immunity reactivity. The experimental data obtained significantly expand the range of biological effects of the fungistatic compounds synthesized and confirm perspectiveness of their further study as antimycotic agents. *In vitro* screening with the use of human blood cells as biosensors is an important part of potential drugs research and can be recommended for testing new biologically active compounds with the known biological activity.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФУНГИСТАТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Л.Е.Калашникова, И.Н.Коперник, И.В.Семенюта, Л.П.Голод, Д.Н.Година, Л.А.Метелиця

Ключевые слова: *in vitro* скрининг; оксазолы; азотсодержащие бисфосфонаты; функциональные биосенсоры

Для *in vitro* скрининга новых биологически активных функционально замещенных оксазолов и азотсодержащих бисфосфонатов с известной фунгистатической активностью использовали как биосенсоры эритроциты и лейкоциты крови человека. Установлено, что ни одно из соединений не проявило гемолитического действия в реакции осмотического гемолиза эритроцитов крови. Все исследованные соединения достоверно изменяли скорость оседания эритроцитов – функционально замещенные оксазолы снижали скорость реакции приблизительно на 70%, а азотсодержащие бисфосфонаты увеличивали – приблизительно на 30%. Установленная реактивность может свидетельствовать о высокой тропности исследуемых соединений к адренорецепторам мембраны клеток. Данная активность может быть использована для характеристики и прогнозирования ряда других потенциальных эффектов изученных соединений-антимикотиков. Результаты НСТ-теста свидетельствуют о том, что функционально замещенные оксазолы являются активаторами антимикробного потенциала нейтрофильных лейкоцитов крови и могут рассматриваться как потенциальные стимуляторы реакционной способности неспецифического иммунитета человека. Полученные экспериментальные данные существенно расширяют спектр биологических эффектов синтезированных соединений-фунгистатиков и подтверждают перспективность их дальнейшего изучения как потенциальных антимикотических средств. Скрининг *in vitro* с использованием как биосенсоров клеток крови человека является важной частью исследования потенциальных лекарственных средств и может быть рекомендован для исследования новых биологически активных соединений с известной биологической активностью.

Раніше нами було синтезовано ряд нових функціонально заміщених оксазолів (ФЗО) і азотовмісних бісфосфонатів (АБФ) та встановлено їх високу фунгістатичну активність. В основі механізму дії синтезованих сполук лежить пригнічення активності ферментів біосинтезу ергостеролу гриба *Candida albicans* – С14- α -деметилази та фарнезилдифосфатсинтази [1-3, 25].

Як потенційні антимікотичні засоби досліджували ФЗО та АБФ при потрапленні до організму можуть змінювати, підвищуючи або знижуючи, показники морфофункціонального стану клітин крові людини, що необхідно враховувати при їх використанні.

Для скринінгу *in vitro* вищезазначених біологічно активних сполук були використані як біосенсори еритроцити та лейкоцити крові людини, здатні *in vitro* функціонально реагувати на будь-який досліджуваний фактор. Відомо, що клітини крові широко використовуються не лише для функціонального скринінгу біологічно активних речовин, але й для прогностичного скринінгу з метою спрямованого синтезу та визначення дії біологічно активної речовини, а також прогнозування її токсичності без проведення тестів на лабораторних тваринах [4-6].

Більше того, метаболічна активність клітин крові – еритроцитів та лейкоцитів тісно пов'язана між собою. Зміни фізико-хімічних, морфофункціональних або агрегаційних властивостей мембрани еритроцитів відображають рівень окиснювально-відновного потенціалу лейкоцитів, що, у свою чергу, є показником імунотоксичності досліджуваної речовини [4, 7-9].

Метою роботи є скринінг *in vitro* нових біологічно активних сполук – потенційних фунгістатиків на моделі клітин-біосенсорів крові людини.

Матеріали та методи

Кінцева концентрація всіх досліджуваних сполук складала $1 \cdot 10^{-4}$ М.

Для реєстрації змін показників фізико-хімічних та агрегаційних властивостей мембрани еритроцитів та окиснювально-відновного потенціалу лейкоцитів крові в роботі використовували реакцію осмотичного гемолізу еритроцитів (ОГЕ) [10-12], швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) [13-16] та тест відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) нейтрофільними лейкоцитами крові людини [17-19].

Реакцію ОГЕ крові людини проводили модифікованим методом Л.І. Ідельсона [10]. Метод полягає у кількісній оцінці ступеня гемолізу клітин у гіпотонічних розчинах хлориду натрію (NaCl). Після інкубації клітин з досліджуваною сполукою та центрифугування сформовану надосадкову рідину фотоелектроколориметрували при довжи-

ні хвилі 500-560 нм проти контрольної проби. Процент гемолізу еритроцитів визначали, порівнюючи величини екстинції надосадкової рідини у кожному зразку з екстинцією, прийнятою за 100% (контроль) за формулою:

$$\% \text{ гемолізу} = E_x \cdot 100 / E_1, \quad (1)$$

де: E_1 – екстинція надосадкової рідини у зразку з 0,1% розчином NaCl;

E_x – екстинція надосадкової рідини у зразку;

100 – % гемолізу у зразку з 0,1% розчином NaCl.

Вплив досліджуваних сполук на реакцію ШОЕ оцінювали за методом Т.П.Панченкова [13]. Для цього у капіляр із кров'ю з висотою стовпчика 100 мм додавали відповідну сполуку, зразки встановлювали в апарат Панченкова і після інкубації визначали висоту стовпчика плазми, сформованого при осіданні еритроцитів. Результат фіксували у мм/год та виражали у відсотках по відношенню до контролю – зразка без додавання досліджуваної сполуки.

Оцінку окиснювально-відновного потенціалу периферичних нейтрофілів крові людини проводили за допомогою НСТ-тесту (тесту відновлення нітросинього тетразолію) [17]. В основі тесту лежить процес піноцитозу, накопичення та відновлення із перетворенням розчинного безбарвного нітросинього тетразолію у нерозчинний темно-синій формазан, що візуально ідентифікується у нейтрофілах – фагоцитах.

Для цього зразки крові у 0,2% водному розчині НСТ інкубували з відповідною досліджуваною сполукою, а потім із отриманої суміші готували мазки, які фарбували розчином нейтрального червоного та мікроскопували. У мазках підраховували кількість формазанактивованих клітин (фагоцитів) на 100 підрахованих нейтрофілів (ДАН – частка активованих нейтрофілів). За кількістю формазану у клітинах оцінювали їх активність в умовних одиницях і підраховували індекс активності нейтрофілів (ІАН) за формулою:

$$\text{ІАН} = (0 \cdot N_0 + 1 \cdot N_1 + 2 \cdot N_2 + 3 \cdot N_3) / 100, \quad (2)$$

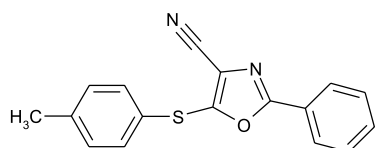
де: N_0, N_1, N_2, N_3 (%) – кількість нейтрофілів з активністю 0, 1, 2, 3 та 4 бали відповідно.

Всі отримані експериментальні результати досліджень були статистично оброблені методами варіаційного аналізу [20].

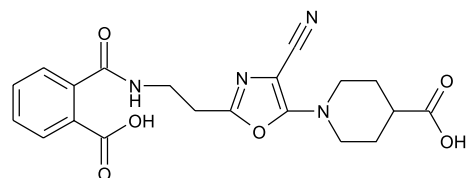
Результати та їх обговорення

На рисунку наведені структурні формули сполук – потенційних фунгістатиків, які були досліджені у роботі.

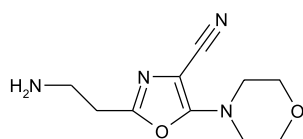
У табл. 1 представлені результати дослідження впливу нових ФЗО та АБФ на показники реакцій ОГЕ та ШОЕ.



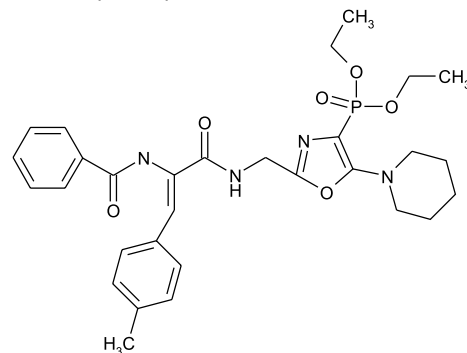
(ФЗО 1)



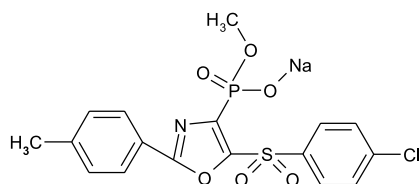
(ФЗО 2)



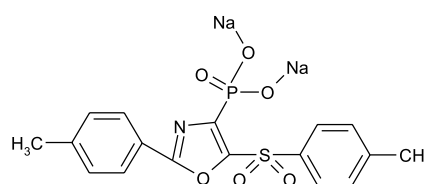
(ФЗО 3)



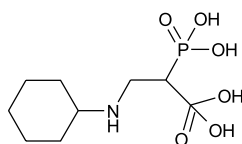
(ФЗО 4)



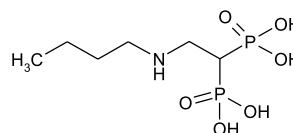
(ФЗО 5)



(ФЗО 6)



(АБФ 1)



(АБФ 2)

Рис. Структурні формули досліджуваних сполук.

Дані табл. 1 свідчать, що жодна із досліджуваних сполук не виявила достовірного впливу на реакцію ОГЕ. При цьому всі досліджені ФЗО та АБФ достовірно змінювали ШОЕ – АБФ у середньому на 35% прискорювали, а ФЗО у середньому на 70% пригнічували реакцію.

У табл. 2 представлені результати впливу досліджуваних сполук на показники НСТ-тесту. За даними табл. 2 можна зробити висновок, що АБФ не проявили достовірного впливу ані на показники ДАН, ані ІАН, тобто додавання у зразки крові досліджуваних сполук не викликало активації нейтрофільних лейкоцитів.

Всі досліджувані ФЗО виявили достовірний вплив на обидва показники НСТ-тесту – додавання у зразки крові вказаних сполук викликало не тільки збільшення кількості активованих клітин,

але й суттєво підвищувало ступінь їх активації – у середньому на 30%.

Таким чином, на основі вищезазначених фактів нами встановлено, що всі сполуки – це потенційні антимікотики, які не мають гемолітичної дії.

Отримані нами дані про достовірний, але протилежний вплив АБФ та ФЗО на реакцію ШОЕ є важливими у комплексному *in vitro* скринінгу сполук, оскільки дають можливість з високою ймовірністю спрогнозувати їх дію *in vivo*. Враховуючи той факт, що в основі реакції ШОЕ лежить здатність еритроцитів крові до агрегації, що контролюється адренорецепторами мембрани клітини, можна стверджувати, що тропність досліджених сполук до адренорецепторного апарату є однією з важливих характеристик їх потенційних біологічних ефектів [21, 22].

Таблиця 1

Вплив досліджуваних ФЗО та АБФ на реакції
ОГЕ та ШОЕ, % до контролю, $M \pm m$, (n=6)

Шифр сполуки	ОГЕ, % до контролю	ШОЕ, % до контролю
ФЗО 1	97,4±2,2	26,3±2,0*
ФЗО 2	94,2±3,1	34,0±1,7*
ФЗО 3	96,5±2,7	24,7±1,5*
ФЗО 4	95,1±2,4	31,0±2,1*
ФЗО 5	98,6±2,6	27,1±1,3*
ФЗО 6	95,7±4,3	28,4±1,4*
АБФ 1	98,8±3,3	136,2±8,0*
АБФ 2	96,3±3,8	134,4±6,6*

Примітка: * – значення достовірно відрізняється від контролю (p<0,05).

На основі експериментальних даних про вплив вивчених сполук на показники НСТ-тесту – АБФ не впливали, а ФЗО на 30% збільшували активність нейтрофілів крові – можна зробити висновок, що ФЗО є активаторами киснево-залежних внутрішньоклітинних мікробіцидних систем нейтрофілів-фагоцитів, які контролюються НАДФ-Н-оксидазою. При цьому відомо, що поява у клітині активних форм кисню може приводити не тільки до

Таблиця 2

Вплив ФЗО та АБФ на показники НСТ-тесту,
% до контролю, $M \pm m$, (n=6)

Шифр сполуки	ДАН, % до контролю	ІАН, % до контролю (n=6)
ФЗО 1	134,3±5,5*	126,6±7,1*
ФЗО 2	128,7±6,8*	116,3±6,4*
ФЗО 3	141,1±3,2*	132,2±5,7*
ФЗО 4	130,6±4,2*	126,1±7,0*
ФЗО 5	126,0±8,1*	131,4±4,9*
ФЗО 6	136,2±4,3*	124,5±6,6*
АБФ 1	102,2±0,3	104,4±0,2
АБФ 2	111,8±0,1	103,7±0,5

Примітка: * – значення достовірно відрізняються від контролю (p<0,05).

збільшення її антимікробного потенціалу, але й до активації тканинного метаболізму та реакційної здатності неспецифічного імунітету людини [23, 24].

Отримані у роботі експериментальні дані суттєво розширюють відомий спектр біологічних ефектів нових АБФ та ФЗО, що мають високу фунгістатичну активність, а також підтверджують перспективність їх подальшого вивчення як потенційних антимікотичних лікарських засобів.

Література

- Pil'о S. G., Brovarec V. S., Vinogradova T. K., Golovchenko A. V., Drach B. S. *Zhurnal obshhej khimii – Journal of general chemistry*, 2002, Vol. 72, No.11, pp.1818-1827.
- Kopernyk I. M., Blagodatnyj V. M., Petrenko O. V., Kalashnikova L. E., Prokopenko V. V., Kondratjuk K. M., Lukashuk O. I., Golovchenko O. V., Chumachenko S. A., Shablykin O. V., Metelytsia L. O., Brovarec V. S. *Ukrainica Bioorganica Acta*, 2011, Vol. 72, No.2, pp.57-68.
- Prokopenko V., Kovalishyn V., Shevchuk M., Kopernyk I., Metelytsia L., Romanenko V., Mogilevich S., Kukhar V. *Current Drug Discovery Technologies*, 2014, Vol. 11, No.2, pp.1-12.
- Kondakov S. E., Mel'nikov M. Ja., Kozachenko P. N., Alekseev K. V. *Zhurnal "Vestnik Moskovskogo Universiteta" – Journal "Vestnik Moskovskogo Universiteta"*, 2009, P. 2, Chemistry, Vol. 50, No.4, pp.153-156.
- Brigden M. L. *American Family Physician*, 1999, Vol. 60, No.5, pp.1443-1450.
- Lucantoni G., Pietraforte D., Matarrese P., Gambardella L., Metere A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, Vol. 510, pp.300-306.
- Di Masi J. A. *Journal of Health Economics*, 2003, Vol. 22, pp.151-185.
- Di Masi J. A. *Journal of Managerial and Decision Economics*, 2007, Vol.28, pp.469-479.
- Voeikov V., Asfaramov R., Bulargina Yu. S. et al. *Abstracts of Papers. III International Multi-Conference "Information Society IS'2000 New Science of Consciousness"*, Ljubljana, 2000, pp.21-28.
- Kassirskij I. A. *Spravochnik po funkcional'noj diagnostike (Handbook of functional diagnostics)*, Moscow, 1970, p.401.
- Brumen M., Glaser R., Svetina S. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1979, Vol. 6, No.2, pp.227-243.
- Potapenko A. Ja., Kvjagova A. A., Tikhomirov A. M. *RGMU (RNRMU)*, 2006, p.16.
- Voejkov V. L. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk (Advances of Physiological Sciences)*, 1998, Vol.29, No.4, pp.55-73.
- Zlonis M. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1993, Vol. 13, pp.787-800.
- Plebani M. *American Journal of Clinical Pathology*, 2002, Vol.17, No.4, pp.621-626.
- Tabuchi T., Tominaga H., Tatsumi N. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2002, Vol.33, No.2, pp.151-154.
- Viksman M. E., Majanskij A. N. *Sposob ocenki funkcional'noj aktivnosti nejtrofilov cheloveka po reakcii vosstanovlenija nitrosinogo tetrazolija. Metodicheskie rekomendacii (Method of assessing the functional activity of human neutrophils by the reduction reaction of nitroblue tetrazolium. guidelines)*, Kazan', 1979, pp.11.
- Berton G., Lowell C.A. *Cell Signaling*, 1999, Vol. 11, pp.621-635.
- Cai T. Q., Wright S. D. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, Vol. 270, pp.14358-14365.
- Komarov Ju. M. *Rukovodstvo (Handbook)*, Moscow, Med. Publ., 2001, p.352.
- Brigden M. *Postgraduate Medical Journal*, 1998, Vol. 103, No.5, pp.257-262.
- Miao G. *Archives of Medical Research*, 2002, Vol. 33, No.5, pp.506-509.
- Tret'jakova I. E. *Rol' sekretornykh produktov nejtrofilov v reguljacii local'nykh reakcij vospalenija i immuniteta (Role of neutrophil secretory products in the regulation of local inflammation and immune reactions)*, the thesis of the doctor medical Sciences, Cheljabinsk, 2003, pp.407.
- Hampton M. B., Krittler A. J., Winterbourn C. C. *Blood*, 1998, Vol. 92, pp.3007-3017.
- Lukashuk O. I., Kondratjuk K. K., Golovchenko A. V., Brovarets V. S., Kukhar V. P. *Heteroatom Chemistry*, 2013, Vol. 24, No.4, pp.289-297.

Надійшла до редакції 07.02.2014 р.