

УДК 547.787 + 547.79: 57.083.3

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОМОДУЛЮЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ ПОХІДНИХ АЗОЛІВ

Л.О.Метелиця, Л.Л.Чарочкіна, С.Є.Могилевич,
О.В.Головченко, С.Г.Пільо, В.С.Броварець, Б.С.Драч

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
02094, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

Ключові слова: 1,3-оксазол; 1,3,4-оксадіазол; 1,3,4-тіадіазол; імуномодулятори; спленоцити; тимоцити; лейкоцити

Показаний імуномодулюючий вплив похідних азолів на клітинні і гуморальні реакції та неспецифічну резистентність організму тварин.

INVESTIGATION OF IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF NEW AZOLES DERIVATIVES

L.A.Metelitsa, L.L.Charochkina, S.Ye.Mogilevich, A.V.Golovchenko, S.G.Pilyo, V.S.Brovarets, B.S.Drach

Immunomodulating influence of azoles derivatives on the cellular and humoral reactions and non-specific resistance of the animals' organism has been shown.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОЛОВ

Л.А.Метелица, Л.Л.Чарочкина, С.Е.Могилевич, А.В.Головченко, С.Г.Пильо, В.С.Броварець, Б.С.Драч

Показано иммуномодулирующее влияние производных азолов на клеточные и гуморальные реакции и неспецифическую резистентность организма животных.

Актуальність пошуків ефективних імуномодуляторів природного і синтетичного походження не викликає сумніву, т.я. ознаки послаблення імунної системи тварин і людей, пов'язані з цілим рядом несприятливих факторів, проявляються досить виразно. Незважаючи на важливість цієї проблеми, скринінг на імуномодулюючі властивості проводиться лише в порівняно небагатьох наукових центрах, що пов'язано з необхідністю виконання складних і дорогих експериментів *in vivo*, без яких не можна скласти уявлення про дію нових сполук на різні механізми імунної системи. Метою нашої роботи є дослідження імуномодулюючих властивостей синтезованих нами нових похідних азолів (1-10), а саме: похідних 1,3-оксазолу (1,2,9,10), 1,3,4-оксадіазолу (1,3) та 1,3,4-тіадіазолу (2,4-8), які були отримані нами нещодавно [1-5].

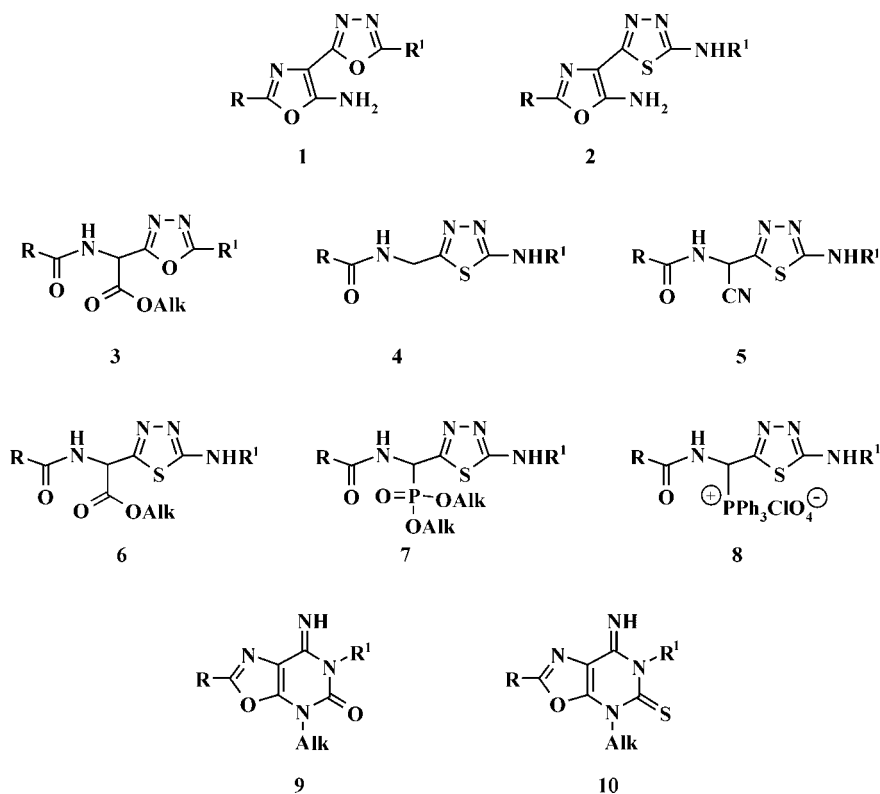
При цьому вивчався їх вплив не тільки на клітинні та гуморальні реакції імунітету, але й на неспецифічну резистентність організму (див. табл.).

В експерименті використовували самців щурів лінії Wistar з масою 220-280 г. Еквімольні кількості досліджуваних сполук розчиняли в 0,1 мл ДМСО, аліквоту цього розчину емульгували в 2,5 мл соняшникової олії "Олейна" [6]. Тваринам внутрішньом'язово вводили 0,35 мл емульсії з розрахунку $2 \cdot 10^{-4}$ Моль відповідної сполуки на 100 г маси тіла. Для контролю використовували щурів, яким замість досліджуваних сполук вводили емульсію ДМСО в олії. Крім цього, для з'ясування

впливу самої емульсії на всі показники, використовували інтактних тварин.

Через 24 години щурів декапітували і проводили кількісне дослідження ефекторних тимоцитів та спленоцитів у камері Горяєва [7]. Фагоцитарну активність поліморфноядерних лейкоцитів (ПМЯЛ) крові вивчали *in vitro* [8]. Для цього змішували кров щурів з розчином цитрату натрію і суспензією добової культури ($1 \cdot 10^9$ мікробних тіл в 1 мл) *Staphylococcus aureus* (штам №209) в об'ємному співвідношенні 2:1:1, суміш інкубували при 37°C протягом 1 год, із суспензії готували мазки і після фарбування проводили мікроскопічний підрахунок кількості фагоцитів (ПМЯЛ, які поглинули мікробні клітини) на 100 ПМЯЛ. Отримані результати після статистичної обробки [9] представлені в таблиці, де показана активність сполук по відношенню до контролю. В усіх експериментах значення досліджуваних показників, отриманих для тварин інтактної групи, практично не відрізняються від контролю (різниця < 10%).

Зауважимо, насамперед, що вивчення кількості тимоцитів важливе для оцінки стану первинного клітинного стану організму. Імунокомпетентні Т-клітини (тимоцити) з надзвичайно високою мітотичною активністю здатні диференціюватись у потенціальні ефектори клітинного імунітету і складають 90-95% загальної кількості клітин тимусу [10]. Зміна їх кількості може свідчити про рівень імунологічної реактивності організму.



Схема

Тільки деякі представники структур (4, 6-8), які містять 1,3,4-тіадіазольне кільце, проявили стимулюючу мітогенну дію та індукували проліферацію тимоцитів на 9-22%. Більшість субстратів пригнічувала мітотичну активність, а сполуки (1в, 2а,б, д,г; 3а,б,г; 5г,д, бв,д, 10а) робили це особливо виражено (57-44% від контролю).

Для первинної оцінки впливу біоактивних сполук на гуморальний ланцюг імунної системи важливим критерієм є кількісний аналіз клітинного складу селезінки [11]. В селезінці при внутрішньом'язовому введенні ксенобіотиків відбувається проліферація стовбурових імунокомпетентних клітин, а потім у кровотоку вони диференціюються в ефекторні плазматичні клітини, здатні синтезувати специфічні антитіла. Збільшення кількості цих

клітин має важливе значення для процесу формування гуморального імунітету.

Стимуляторами проліферації спленоцитів виявились сполуки (2е, 3б, 5а-г, бв,д; 7а-в). Найбільш активні з них субстрати (3б, 4а, 7а), які належать до похідних 1,3,4-оксадіазолу та 1,3,4-тіадіазолу. Порівняння активності ряду споріднених похідних 1,3,4-тіадіазолу, які відрізняються лише природою функціональної групи у боковому ланцюгу, показало, що стимуляція проліферації спленоцитів залежить саме від цього фактора і суттєво збільшується в ряду $C(O)OEt < PPh_3ClO_4^{\ominus} < P(O)(OEt)_2$ (див. рис. 1).

Пригнічення проліферації клітин селезінки спостерігали при введенні сполук (1б-г, 2а-д, 5д, бг, 9, 10а,б). Причому сполуки (2г, 5д, бг, 9, 10б), які

Субстрати загальної формули:

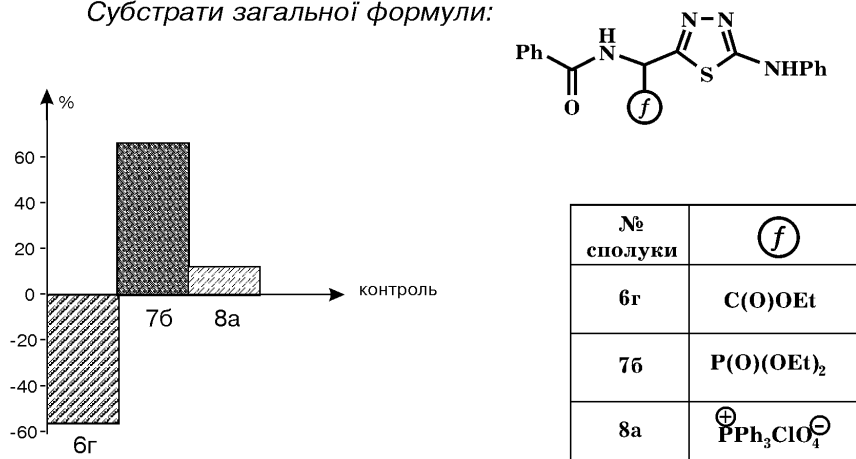


Рис. 1. Вплив на проліферацію спленоцитів селезінки щурів (% до контролю) похідних 1,3,4-тіадіазолу (6-8).

Таблиця

Вплив похідних азолів на проліферативну активність імункомпетентних клітин лімфоїдних органів і фагоцитарну активність ПМЯЛ крові щурів [$M \pm m$, $n=2$, значення, які достовірно відрізняються від контрольних ($p < 0,05$), позначені *]

Номер сполуки	R	R ¹	Alk	Кількість тимоцитів на 1 г тимусу $\cdot 10^8$ (% до контролю)	Кількість спленоцитів на 1 г селезінки $\cdot 10^8$ (% до контролю)	Кількість фагоцитів на 100 ПМЯЛ (% до контролю)
Контроль	-	-	-	8,9 \pm 0,7	10,3 \pm 0,1	39,5 \pm 2
Інтактна група	-	-	-	8,2 \pm 0,4	11,1 \pm 0,8	42,0 \pm 3,5
1а	Ph	Ph	-	6,5 \pm 0,5*(73) ^{a)}	8,9 \pm 0,9(86)	52,5 \pm 3,5*(133)
1б	4-MeC ₆ H ₄	Ph	-	7,9 \pm 0,7*(89)	8,5 \pm 0,3*(83)	48,0 \pm 4,0*(122)
1в	Ph	4-MeC ₆ H ₄	-	4,9 \pm 0,3*(55)	5,9 \pm 0,4*(57)	58,5 \pm 4,5*(148)
1г	Ph	Me	-	8,9 \pm 0,7(100)	7,3 \pm 0,5(71)	52,5 \pm 4,5*(133)
1д	Me	Me	-	8,1 \pm 0,7(91)	9,8 \pm 0,8(95)	55,0 \pm 4,5*(139)
2а	4-MeC ₆ H ₄	Ph	-	4,3 \pm 0,3*(48)	6,1 \pm 0,4*(59)	72,5 \pm 4,5*(186)
2б	4-MeC ₆ H ₄	Ph	-	4,3 \pm 0,2*(48)	8,1 \pm 0,4*(79)	46,0 \pm 2,0(116)
2в	Ph	4-MeC ₆ H ₄	-	7,9 \pm 0,5(80)	7,9 \pm 0,5*(77)	41,0 \pm 3,5(104)
2г	Ph	Et	-	4,5 \pm 0,3*(51)	5,0 \pm 0,4*(49)	73,0 \pm 5,0*(185)
2д	4-MeC ₆ H ₄	4-MeC ₆ H ₄	-	3,9 \pm 0,3*(44)	8,5 \pm 0,8*(83)	63,5 \pm 5,5*(161)
2е	4-MeOC ₆ H ₄	4-MeC ₆ H ₄	-	5,4 \pm 0,4*(61)	13,2 \pm 1,2*(128)	57,5 \pm 4,0*(146)
3а	Ph	Ph	Me	4,9 \pm 0,1*(55)	12,0 \pm 1,1(117)	73,0 \pm 5(185)
3б	Ph	4-MeC ₆ H ₄	Me	4,6 \pm 0,3*(52)	18,4 \pm 1,6*(179)	77,5 \pm 4,0*(196)
3в	Ph	Ph	Et	5,4 \pm 0,3*(61)	10,2 \pm 0,8(99)	55,0 \pm 5,0*(139)
3г	Ph	4-MeC ₆ H ₄	Et	4,4 \pm 0,2*(49)	9,9 \pm 0,9(96)	58,5 \pm 3,0*(148)
4а	Ph	Ph	-	7,2 \pm 0,6(81)	16,4 \pm 1,1*(159)	35,5 \pm 3,0*(90)
4б	4-MeC ₆ H ₄	4-MeC ₆ H ₄	-	10,2 \pm 0,4(115)	11,5 \pm 1,0(112)	65,5 \pm 5,0*(166)
5а	Me	Ph	-	4,6 \pm 0,2*(52)	12,7 \pm 1,0*(123)	41,5 \pm 4,0*(125)
5б	n-Pr	Ph	-	8,1 \pm 0,8*(91)	13,1 \pm 1,2*(127)	45,5 \pm 4,0*(115)
5в	i-Bu	4-MeC ₆ H ₄	-	6,3 \pm 0,5*(71)	15,0 \pm 1,1*(146)	47,0 \pm 3,5*(119)
5г	Me	Et	-	5,4 \pm 0,4*(61)	13,2 \pm 1,2*(128)	31,5 \pm 3,0(80)
5д	n-Pr	4-MeC ₆ H ₄	-	4,0 \pm 0,3*(45)	4,9 \pm 0,4*(48)	43,5 \pm 3,5*(110)
6а	4-MeC ₆ H ₄	Ph	Me	5,5 \pm 0,4*(62)	9,3 \pm 0,6*(90)	40,5 \pm 3,5(105)
6б	Ph	4-MeC ₆ H ₄	Me	8,2 \pm 0,7(92)	11,6 \pm 0,7(113)	63,5 \pm 5,5*(161)
6в	4-MeC ₆ H ₄	4-MeOC ₆ H ₄	Me	5,1 \pm 0,5*(51)	11,9 \pm 0,4*(116)	55,5 \pm 5,0*(139)
6г	Ph	Ph	Et	9,7 \pm 0,8(109)	4,5 \pm 0,3*(44)	37,5 \pm 3,0(95)
6д	Ph	4-MeC ₆ H ₄	Et	4,8 \pm 0,3*(54)	13,6 \pm 1,0*(132)	47,0 \pm 4,0(119)
7а	PhCH=CH	Ph	Me	10,9 \pm 0,9(122)	17,9 \pm 0,9*(174)	58,0 \pm 5,0*(147)
7б	Ph	Ph	Et	9,0 \pm 0,8*(101)	16,9 \pm 1,3*(164)	37,5 \pm 3,5*(95)
7в	PhCH=CH	Ph	Et	5,5 \pm 0,4*(62)	13,9 \pm 1,4*(135)	35,5 \pm 2,5(90)
8а	Ph	Ph	-	6,8 \pm 0,6(76)	11,2 \pm 0,8(109)	29,5 \pm 2,0*(75)
8б	Me	Ph	-	10,4 \pm 0,8(117)	10,0 \pm 0,8(97)	61,5 \pm 5,0*(111)
9	4-MeC ₆ H ₄	Ph	PhCH ₂	5,8 \pm 0,5*(65)	4,3 \pm 0,2*(42)	62,0 \pm 5,0*(160)
10а	Ph	4-MeC ₆ H ₄	Me	4,4 \pm 0,3*(49)	6,9 \pm 0,4*(67)	66,0 \pm 5,5*(167)
10б	Ph	CH ₂ =CHCH ₂	Me	6,6 \pm 0,5*(74)	5,0 \pm 0,4*(49)	60,0 \pm 5,0*(152)

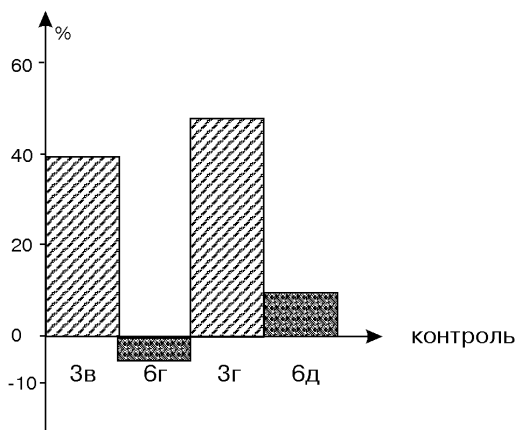
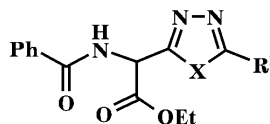
а) Тут і далі в дужках наведені відносні результати впливу сполук у % до контролю.

є похідними 1,3,4-тіадіазолу, 2-(1,3,4-оксазол-4-іл)-1,3,4-тіадіазолу, а також конденсованих систем, пригнічують таку проліферацію більше ніж у 2 рази (див. табл.).

Ще одним важливим механізмом у системі імунітету є фагоцитоз. Фагоцитарна активність

лімфоїдних клітин крові забезпечує оптимальний рівень неспецифічної резистентності організму і є обов'язковим початковим етапом індукції формування специфічної відповіді [12]. Фагоцитарну функцію здійснюють поліморфноядерні лейкоцити (ПМЯЛ) периферичної крові, які формуються

Субстрати загальної формули:



№ сполуки	X	R ¹
3в	O	Ph
6г	S	PhNH
3г	O	4-MeC ₆ H ₄
6д	S	4-MeC ₆ H ₄ NH

Рис. 2. Вплив на фагоцитарну активність (% до контролю) споріднених похідних азолілзаміщених α-амінокислот (3, 6).

та диференціюються в кістковому мозку. Потенціальні імуномодулюючі властивості різних біорегуляторів оцінюють, найчастіше, за їх впливом на фагоцитарну активність, тобто на здатність ПМЯЛ до розпізнавання та поглинання патогенних агентів (вірусів, бактерій і т.п.). Активация або пригнічення фагоцитарної функції ПМЯЛ у даному випадку є одним з важливих показників стану антибактеріального та противірусного імунітету організму в цілому [13].

Слід відзначити, що більшість досліджених субстратів (20 сполук), які відносяться до різних типів гетероциклічних структур (1-4, 6-10), проявляли явний стимулюючий вплив на фагоцитарну активність ПМЯЛ крові. Дев'ять сполук (2а,г,д; 3а,б; 4б, 6б, 9, 10а) стимулювали фагоцитоз більше ніж на 60%. Порівнюючи активність споріднених представників структур (1-4, 6-10), можна зробити висновок про її залежність від ряду факторів: природи гетероциклічної системи, властивостей

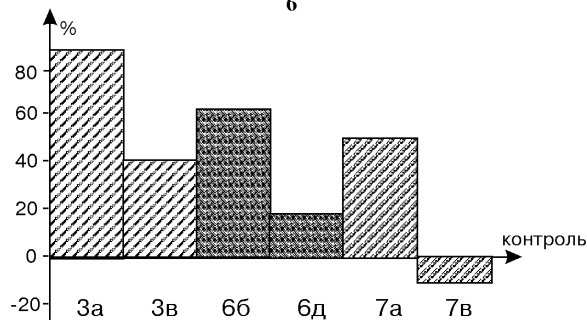
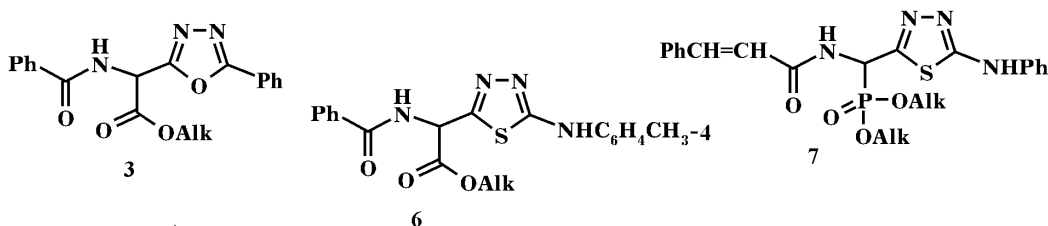
замісників R та R¹ і навіть від особливостей алкоксильних залишків в естерному фрагменті структур (3, 6, 7). На рис. 2 показана на чотирьох прикладах залежність фагоцитарної активності від природи азольного кільця, з якої видно, що певні похідні 1,3,4-оксадіазолу значно активніші, ніж їх 1,3,4-тіадіазольні аналоги.

Разом з цим на рис. 3 для естерів трьох типів азолілзаміщених амінокислот показано, що метилові естри проявляють фагоцитарну активність у кілька разів вищу, ніж відповідні етилові аналоги.

Подібна закономірність спостерігається і у випадку впливу відповідних естерів на проліферацію тимоцитів і спленоцитів (див. табл.).

Узагальнюючи увесь цей матеріал, слід акцентувати увагу на тому, що більшість досліджених похідних азолів проявляє по-різному спрямований вплив на проліферативну активність клітин лімфоїдних органів і функціональну активність ПМЯЛ крові. На основі первинного скринінгу 35

Субстрати трьох типів:

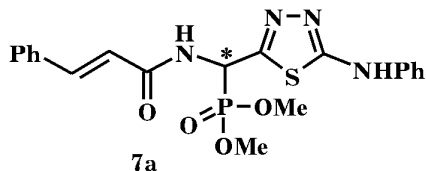


№ сполуки	Alk
3а	Me
3в	Et
6б	Me
6д	Et
7а	Me
7в	Et

Рис. 3. Вплив на фагоцитарну активність (% до контролю) похідних азолілзаміщених α-амінокислот (3, 6, 7).

нових хімічних сполук можна зробити висновок про перспективність подальшого дослідження сполук (2а,д,г; 3а,б; 6б, 9, 10а), які суттєво стимулюють фагоцитарну активність ПМЯЛ крові.

Серед усіх субстратів особливо вирізняється таке похідне 1,3,4-тіадіазолу та амінометилфосфонової кислоти:



Сполука (7а) проявила значну активність у всіх трьох тестах, що характеризують імунну систему.

Література

1. Головченко А.В., Пільо С.Г., Броварець В.С., Драч Б.С. // *ЖОХ*. — 2003. — Т. 73, №11. — С. 1933-1934.
2. Головченко О.В., Броварець В.С., Пільо С.Г., Драч Б.С. // *ДАН України*. — 2003. — №9. — С. 141-143.
3. Golovchenko A.V., Pilyo S.G., Brovarets V.S. et al. // *Synthesis*. — 2003. — №18. — P. 2851-2857.
4. Golovchenko O.V., Pilyo S.G., Brovarets V.S. et al. // *Heteroatom Chem.* — 2004. — Vol. 15, №6. — P. 454-458.
5. Головченко А.В., Пільо С.Г., Броварець В.С. и др. // *ЖОХ*. — 2005. — Т. 75.
6. Дроговоз С.М., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М., Зупанець Й.А. *Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ*. — Фармкомитет МЗ Украины. — К., 1993. — 27 с.
7. *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования* / Под ред. Е.А. Коста. — М.: Медицина, 1968. — С. 38-40.
8. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. *Иммунология и иммунопатология заболеваний легких*. — К.: Здоров'я, 1981. — С. 169-171.
9. Сепетлиев Д. *Статистические методы в научных медицинских исследованиях* / Под ред. А.М. Меркова. — М.: Медицина, 1968. — 420 с.
10. Бернет Ф. *Клеточная иммунология* / Пер. с англ. — М.: Мир, 1971. — 537 с.
11. Петров Р.В. *Иммунология*. — М.: Медицина, 1987. — С. 98-108.
12. Дуглас С.Д., Кук П.Г. *Исследование фагоцитоза в клинической практике*. — М.: Медицина, 1983. — 112 с.
13. Семенов Б.Ф., Каулен Д.П., Баландин И.Г. *Клеточные и молекулярные основы противовирусного иммунитета*. — М.: Медицина, 1981. — 208 с.

Надійшла до редакції 06.04.2005 р.

Зрозуміло, що перспективність синтезу її аналогів та дослідження їх імунологічної дії не викликають сумніву.

Висновки

1. Експериментальне дослідження впливу нових похідних азолів на імунну систему щурів показало, що серед них є ефективні імуномодулятори, які в невеликих дозах підвищують фагоцитарну активність майже в 2 рази.

2. Деякі з досліджуваних структур не тільки помітно збільшують фагоцитоз, але й суттєво підвищують проліферативну активність імунокомпетентних клітин лімфоїдних органів, що стимулює інтерес до більш глибокого вивчення таких імуномодуляторів.