



УДК 547.785.5+547.431.4

Ю. І. Губський¹, О. В. Вельчинська¹, Н. І. Шарикіна², Е. О. Коваленко³

ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ НОВИХ АНТИМЕТАБОЛІТІВ ПУРИНОВОГО ОБМІНУ — МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСУ БАКТЕРІЙНОГО ЛЕКТИНУ І БІС-ПОХІДНОГО БЕНЗІМІДАЗОЛУ

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ,

²Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ,

³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот, малих активних молекул, з метою інгібіції пухлинного росту залишається одним із перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби [1]. Численні джерела вітчизняної та світової літератури підтверджують актуальність досліджень цієї спрямованості [2-4]. Останнім часом значно зросла кількість досліджень щодо синтезу нових похідних бензімідазолу та вивчення їх біологічної активності [4].

При введенні у положення 1 молекули бензімідазолу замісників ароматичної, аліфатичної будови, галогеналкілів, можна отримати сполуки з антибактеріальною, протівірусною або протизапальною дією [5].

Введення галоген(фтор)-вмісних фармакофорів у гетероциклічну молекулу приводить до підвищення розчинності сполук у ліпідах і робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспорту в організмі [6]. Увага до фторвміс-

них фрагментів у нових молекулах викликана також підвищенням антиметаболітних властивостей цих сполук.

Метод введення фармакофорних груп у молекули було досліджено нами на молекулах поліфторвмісних ацетиленових спиртів, заміщених піримідинів та 5(6)-заміщених урацилів [7]. Означений метод дозволяє виявити нову стратегію для синтезу селективно поліфункціональних молекул, хімічна будова яких дозволяє вводити в молекулу нові фармакофорні фрагменти.

Мета даної роботи полягає у визначенні преформованих пуринів або близьких до них за хімічною будовою гетероциклів, їх синтезі та вивченні хімічних, фізико-хімічних і біологічних властивостей. Після конструювання потенційно активних структур розроблено новий препаративний метод синтезу оригінального гетероциклу на основі бензімідазолу та фторзаміщеного загального анестетика фторотану (2-бром-1,1,1-трифтор-2-хлоретану) (I), досліджена протипухлинна актив-

ність і токсичність біс-похідного бензімідазолу як найбільш близької за хімічною будовою до пурину сполуки, на його основі створено молекулярний комплекс з бактерійним лектином *Bacillus polymyxa* 102 KGU з вираженими протипухлинними властивостями, вивчено його токсичність і протипухлинна активність.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження стали: нове гетероциклічне біс-похідне, синтезоване на основі незаміщеного бензімідазолу та фторотану; молекулярний комплекс біс-похідного бензімідазолу з бактерійним лектином *Bacillus polymyxa* 102 KGU. Абсолютні розчинники одержували у такий спосіб: ацетонітрил переганяли над P₂O₅, діетиловий ефір — над металевим натрієм. Диметилформамід і бензол переганяли у вакуумі. Індивідуальність синтезованих сполук контролювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol-254 у системі ацетонітрил-гексан 2:1. Інфра-



червоні спектри (ІЧ-спектри) записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник "Charles Ceise Hena", Germany).

Газорідинну хроматографію проводили на газорідинному хроматографі "Perkin Elmer" з УФ-детектором (виробник "Perkin", Germany). Спектри ^1H ядерно-магнітного резонансу (ЯМР) записували на приладах "Bruker WP-200" (виробник "Bruker", Switzerland), "Varian T-60" (виробник "Varian", USA) з робочою частотою 200-132 МГц у DMSO- d_6 з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту.

$N_{(1)}N_{(1)}$ - (2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III). Приготування розчину № 1. 0,47 г гідроксиду калію (0,008 моль), 0,047 г дибензо-18-краун-6-ефіру, 40 мл сухого бензолу перемішують при температурі 60 °С близько 15 хв до утворення на стінках хімічного реактора білого полімерного нальоту, тобто калієвого комплексу з дибензо-18-краун-6-ефіром. Отриманий розчин охолоджують до кімнатної температури, додають до нього краплями розчин 1,57 г (0,008 моль) фторотану в 30 мл діетилового ефіру.

Приготування розчину № 2. 1,89 г (0,016 моль) бензімідазолу розчиняють у 20 мл сухого бензолу при температурі 60 °С в окремому хімічному посуді. Гарячий розчин № 2 додають краплями через ділильну лійку до розчину № 1, перемішують при температурі 80–90 °С протягом 11 год, фільтрують у гарячому стані, охолоджують, відганяють простою перегонкою розчинники. Залишок — осад — кип'ятять із 30 мл ацетонітрилу, фільтрують, промивають водою, ацетонітрилом, ефіром, потім сушать у вакуумі водоструминного насоса. Кристалічний осад кремового забарвлення, нестійкий до дії гарячого органічного розчинника; при перекристалізації він розкладається до вихідного бензімідазолу. Вихід 0,6 г (53 %), $T_{\text{топл}}$ 222–225 °С. Знай-

дено, %: С 51,5; Н 3,0; N 14,65. $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{BrClN}_4$. Обчислено, %: С 51,43; Н 2,7; N 14,9. ІЧ-спектр (KBr), cm^{-1} : 550–850 (C–C1, C–Br), 650–900 (Ph), 1450 (cis-C=C-), 1600–1680 (trans-C=C-), 3000–3100 (Ph). ^1H ЯМР: 7,301–8,96 (10 H, м.; 2 Ph; 2 Heterocycles; -N=CH-).

Для створення молекулярного комплексу на основі бактерійного лектину та синтезованої сполуки (III) було відібрано найбільш активний продуцент позаклітинних лектинів — сапрофітну культуру *Bacillus polymyxa* 102 KGU з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ, ізольовану з ґрунту. Раніше з культуральної рідини одержано препарати позаклітинних лектинів із високою питомою активністю (13232–16845 ГАО), виходом за активністю до 97 % та ступенем очистки від 20,7 до 28,8 разу [8]. Культивування бактерій проводили періодичним способом на качалках при температурі 37 °С у колбах Ерленмейєра з робочим об'ємом 100 мл на оптимізованому для спрямованого біосинтезу лектинів середовищі Гаузе такого складу, г/л: бульйон Хоттінгера — 30 мл; пептон — 5,0; NaCl — 5,0; галактоза — 10,0; початкове рН середовища — 6,0; час культивування — 18–20 год. Бактерійні клітини відокремлювали центрифугуванням при 6000 г протягом 20 хв. Лектини виділяли зі звільненої від клітин культуральної рідини (КР) з допомогою висолювання сірчанокислим амонієм при насиченні 70 %, як описано раніше [9]. Одержані осад центрифугували при 6000 г протягом 20 хв, розчиняли в мінімальному об'ємі дистильованої води, діалізували проти останньої та прогрівали на водяній бані при температурі 65 °С тричі протягом 30 хв. Термолабільні білки відокремлювали центрифугуванням при 5000 г протягом 20 хв; супернатант висушували і використовували для подальших досліджень. Молекулярний комп-

лекс: бактерійний лектин — біс-похідне бензімідазолу отримували простим механічним перемішуванням двох компонентів у співвідношенні 1:1 у фізіологічному розчині.

Дослідження параметрів гострої токсичності та протипухлинної активності біс-похідного бензімідазолу та його молекулярного комплексу з бактерійним лектином проводили в Інституті фармакології та токсикології АМН України. Параметри гострої токсичності вивчали у дослідах на білих нелінійних мишах-самцях масою тіла (22±2) г і щурах-самцях масою тіла (160±20) г при внутрішньочеревинному шляху введення. Результати досліду обраховували у альтернативній формі на 14-ту добу після введення. Статистичну обробку проводили за В. Б. Прозоровським і співавторами [10]. Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил. При вивченні протипухлинної активності біс-похідного бензімідазолу та його молекулярного комплексу з бактерійним лектином прийнятим критерієм значення для речовини з протипухлинною активністю вважався показник гальмування росту пухлини — понад 50 % [11]. Як моделі застосовували перевивні моделі експериментального пухлинного росту різного гістогенезу — лімфосаркоми Пліса та злоякісної гліобластоми людини з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдана [12]. При лікуванні гліобластоми критерієм активності був відсоток гальмування росту гетеротрансплантата — гліоми людини — понад 25 %. Курс лікувальних впливів становив 6 введень через добу при внутрішньочеревинному шляху введення, згідно із правилами введення речовин в організм



піддослідних тварин, рекомендованими Фармакологічним центром МОЗ України, в інтервалі доз 1/4–1/5 ЛД₅₀. Результати обраховувалися через 24 год після закінчення лікування. Під час вивчення специфічної протипухлинної активності молекулярного комплексу, його розчиняли у фізіологічному розчині та вводили одноразово внутрішньоочеревинно.

Результати дослідження та їх обговорення

За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану (I) як фторвмісного синтону та бензімідазолу у молярному співвідношенні 1:2 у системі розчинників (бензол — диметилформамід — діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нове біс-похідне з фармакофорною групою =C=CBrCl, (III), (рисунок).

Практичний інтерес до потенційних лікарських засобів зумовлений їх постійною дією на макроорганізм. Дослідження глибоких перетворень чутливих клітин під впливом цих речовин є важливим аспектом фармакології. Визначення одного з головних фармакологічних індексів гетероциклічного біс-похідного (III) та його молекулярного комплексу з бактерійним лектином — гострої токсичності — показало, що сполука (III) та її молекулярний комплекс належить до середньотоксичних: їх ЛД₅₀ становить 282 і 235 мг/кг відповідно.

Препарат порівняння — 5-фторурацил — це середньотоксична сполука, що характеризується такими значеннями токсичності — ЛД₅₀ 5-фторурацилу сягає 372 мг/кг. Доза введеної речовини внутрішньоочеревинним способом становила від 235 до 282 мг/кг. У дослідних тварин спостерігалися тонічні судоми впродовж 1–2 год, блювання (табл. 1).

Під час вивчення протипухлинної активності чималий інте-

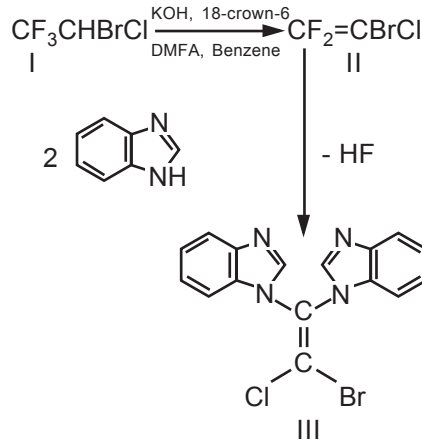


Рисунок. Біс-похідне бензімідазолу

рес становило похідне загального анестетика фторотану та бензімідазолу (III) як найбільш близьке за хімічною будовою до пурину. Сполука N₍₁₎,N₍₁₎-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III) була вивчена в онкофармакологічних експериментах із використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдана [12].

Маса гетеротрансплантата пухлини після дії сполуки N₍₁₎,N₍₁₎-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-

біс-(бензімідазол) (III) зменшилася до (1,510±0,102) мг (43,8 % гальмування росту пухлини), що підтверджено при проведенні морфологічного контролю (табл. 2).

При порівняльному гістологічному дослідженні клітиннотканинних реакцій пухлини при лікуванні потенційною протипухлинною сполукою (III) в умовах субклітинного тестування встановлена залежність між вираженими регресивними змінами пухлин і рівнем гальмування їх росту. Зазначений ефект вважається вираженим щодо подальшого вивчення сполуки (III) при пухлинах головного мозку.

Певний інтерес становило дослідження протипухлинної активності створеного нами молекулярного комплексу сполуки (III) з бактерійним лектином *Bacillus polymyxa* 102 KGU на моделі експериментального пухлинного росту — лімфосаркомі Пліса, оскільки раніше нами було досліджено аналогічні молекулярні комплекси на основі 5(6)-заміщених урацилів і бактерійних лектинів на вказаній моделі пухлини й отримано

Таблиця 1

Параметри токсичності сполуки (III) та її молекулярного комплексу з бактерійним лектином *Bacillus polymyxa* 102 KGU порівняно з 5-фторурацилом

Сполука, препарат порівняння	ЛД ₅₀ , мг/кг	Молекулярний комплекс, препарат порівняння	ЛД ₅₀ , мг/кг
N ₍₁₎ ,N ₍₁₎ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III)	282	<i>Bacillus polymyxa</i> 102KGU-N ₍₁₎ ,N ₍₁₎ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III)	235
5-фторурацил	372	5-фторурацил	372

Таблиця 2

Протипухлинна активність сполуки N₍₁₎,N₍₁₎-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III) при застосуванні у мишей — носіїв пухлин

Сполука	Маса гетеротрансплантата пухлини, мг	Гальмування росту пухлини, %
N ₍₁₎ ,N ₍₁₎ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III)	1,510±0,102	43,8



позитивні результати (табл. 3) [13].

Гальмування росту пухлини при застосуванні молекулярно-го комплексу: *Bacillus polytuxa* 102 KGU — N₍₁₎, N₍₁₎-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III) сягало 80,0 % за масою, а препарату порівняння 5-фторурацилу — 55,0 % (критерій значущості ≥ 50,0 % гальмування пухлинного росту). Як показали досліди, молекулярний комплекс має виражену здатність гальмувати експериментальний пухлинний ріст і перевищує за протипухлинною дією у проведених дослідах препарат порівняння 5-фторурацил.

Отже, можна зробити висновок, що сполука N₍₁₎,N₍₁₎-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III) та її молекулярний комплекс з бактерійним лектином штаму *Bacillus polytuxa* 102 KGU, які мають високу протипухлинну активність на деяких штаммах пухлинної хвороби, а саме: на моделях експериментального пухлинного росту — лімфосаркомі Пліса та злоякісній гліобластомі людини з використанням пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдана, значно перевищують протипухлинну активність препарату порівняння 5-фторурацилу, що дозволяє розглядати їх як фізіологічно активні сполуки з перспекти-

вою подальшого вивчення за вимогами до потенційних протипухлинних засобів для лікування людини.

Висновки

1. За новим, розробленим нами методом синтезу, взаємодією фторотану як фторвмісного синтону та бензімідазолу (молярне співвідношення 1:2) у системі розчинників (бензол — диметилформамід-діетиловий ефір) в умовах міжфазного каталізу дибензо-18-краун-6-ефіром у лужному середовищі синтезовано нове біс-похідне з фармакофорною групою.

2. Будову та склад синтезованої сполуки — біс-похідного бензімідазолу підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ-, ЯМР Н¹-спектроскопії, а індивідуальність — методами тонкошарової та газорідної хроматографії.

3. Створено молекулярний комплекс біс-похідного бензімідазолу з найбільш активним продуцентом позаклітинних лектинів — сапрофітною культурою *Bacillus polytuxa* 102 KGU.

4. Встановлено, що сполука — біс-похідне бензімідазолу та її молекулярний комплекс належать до середньотоксичних: їх ЛД₅₀ становить 282 і 235 мг/кг відповідно.

5. При використанні пухлини головного мозку людини (операційний та біопсійний матеріал) у підкапсульному тесті за методом Богдана на підставі

результатів експериментально-морфологічних досліджень в умовах субкапсулярного тестування встановлено виражений протипухлинний ефект на пухлинну клітину біс-похідного бензімідазолу з гальмуванням 43,8 %.

6. Для молекулярного комплексу: *Bacillus polytuxa* 102 KGU — N₍₁₎,N₍₁₎-(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) зареєстровано значну протипухлинну дію щодо лімфосаркоми Пліса (80,0 %).

ЛІТЕРАТУРА

1. Noordhuis P. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthetase inhibition human colorectal cancer / P. Noordhuis, U. Holwerda // *Annals. of oncology.* — 2004. — Vol. 15. — P. 1025-1032.

2. Adjei A. A review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer / A. Adjei // *Clin. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 48. — P. 265-277.

3. Longey D. B. 5-fluorouracil - mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews* / D. B. Longey, D. Paul Harkin, G. Jonson Patrick // *Cancer.* — 2003. — Vol. 3. — P. 330-338.

4. New 2-piperazinylbenzimidazole derivatives as 5-HT₃ antagonists. Synthesis and pharmacological evaluation / A. Orjales, R. Mosquera, L. Labeage, R. Rodes // *J. Med. Chem.* — 1997. — Vol. 40 (4). — P. 586-593.

5. Мнджоян А. Л. Биологические свойства химических соединений / А. Л. Мнджоян, Ю. З. Тер-Захарян. — Ереван : Изд. АН Арм. ССР, 1962. — Вып. 1. — 246 с.

6. Ягупольский Л. М. Ароматические и гетероциклические соединения с фторсодержащими заместителями / Л. М. Ягупольский. — К. : Наук. думка, 2006. — С. 90-105.

7. Biological activity of bacterial lectins and their molecular complexes with heterocyclic bis-adducts / Hel. V. Welchinska, B. Piecuszak, E. A. Kovalenko [et al.] // *Мікробіологічний журнал.* — 2003. — Т. 65, N 6. — С. 20-25.

8. Коваленко Э. А. Внеклеточные лектины бактерий / Э. А. Коваленко // Там же. — 1990. — Т. 52, № 3. — С. 92-99.

9. Подгорский В. С. Лектины бактерий / В. С. Подгорский, Э. А. Коваленко, И. А. Симоненко. — К. : Наук. думка, 1992. — 203 с.

10. Прозоровский В. Б. Экспресс-метод определения средней эффек-

Таблица 3

Специфічна протипухлинна активність молекулярного комплексу сполуки (III) з бактерійним лектином *Bacillus polytuxa* 102 KGU порівняно з 5-фторурацилом на лімфосаркомі Пліса

Молекулярний комплекс	Доза, мг/кг	Середня маса пухлин, г		Гальмування росту пухлин, %
		контроль	дослід	
<i>Bacillus polytuxa</i> 102KGU — N ₍₁₎ ,N ₍₁₎ -(2"-бром-2"-хлоретеніл)-біс-(бензімідазол) (III)	35	13,90±1,93	2,5±1,3	80,0
5-фторурацил	35	13,90±1,93	2,5±1,3	55,0



тивності дози и ее ошибки / В. Б. Прозоровский, В. П. Прозоровский, В. М. Демченко // Фармакологія та токсикологія. — 1978. — Т. 41, № 4. — С. 407-509.

11. *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США* / под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. Голдина,

А. Кляйна. — М. : Медицина, 1979. — 296 с.

12. *Розробити* новий протипухлинний та протиметастазний засіб на основі фосфорильованого урацилу ФП-8 : звіт про НДР / ІФТ АМН України ; викон. : Н. І. Шарикіна, М. І. Голубов — К., 2006. — 176 с. — № ДР 0106U000871.

13. *Вельчинська О. В.* Пошук засобів лікування пухлинної хвороби

шляхом створення нових антиметаболітів піримідинового обміну — біспохідних 5(6)-заміщених урацилів та їх молекулярних комплексів з бактерійними лектинами / О. В. Вельчинська, Н. І. Шарикіна, Е. О. Коваленко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. — 2008. — № 1 (35). — С. 62-68. — (Сер. Біологія).

УДК 612.821.8-02:613.16]-054.87

О. В. Денефіль

СПРИЙНЯТТЯ ЧАСУ СТУДЕНТАМИ ЗА РІЗНИХ ТИПІВ ПОГОДИ

Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського

Відображення часу є невід'ємною складовою частиною цілісного світосприйняття. Діяльність людини з самого народження організована у часі й від коректності цієї організації залежить рівень адаптації індивідуума до навколишнього середовища. Відображення часу пов'язане з рівнем обміну речовин, руховою активністю, з пам'яттю і забезпечується корою великих півкуль за участі підкіркових систем, лівою півкулею [1].

Тривалість індивідуального часу залежить від напруженості, тривожності, депресії. При дослідженні здорових людей із різними рівнями тривожності виявлено таке: при середній тривожності спостерігається незначне відхилення від еталона, при низькій — недооцінка та перевідмірювання інтервалів (довша індивідуальна хвилина), при високій — переоцінка і недовідмірювання (коротка індивідуальна хвилина). Використання результатів оцінювання часу для визначення емоційного стану рекомендовано в стресових ситуаціях [2].

Загострення здатності до ендогенного відмірювання часу

пов'язане зі станом периферичного відділу симпатичної нервової системи. Вузкий діапазон тривожності є оптимальним для хронометричних здібностей [3].

Суб'єктивна внутрішня оцінка часу є одним із параметрів, що характеризують дію стресора. За її величиною можна в цілому скласти уявлення про адаптаційні можливості людини. При подовженні індивідуальної хвилини у студентів спостерігається підвищення артеріального тиску (АТ) під час іспиту, зменшення пульсового тиску [4]. У пацієнтів з артеріальною гіпертензією менша тривалість часу (підвищений рівень цейтнотичності), який можна вважати суб'єктивним дефіцитом часу, що є психологічним стресором і прогностичним фактором виникнення нових випадків ішемічної хвороби серця [5].

Студентське життя пов'язане з частими психоемоційними стресами. На 1–2 курсах у студентів вищих медичних навчальних закладів спостерігається напруження регуляторних механізмів, тобто цей час є періодом нестабільної адаптації [6]. Вони стають чутливи-

ми до навколишніх впливів, у тому числі змін погоди.

Метою роботи було визначити тривалість індивідуального сприйняття часу в молодих практично здорових осіб за різних типів погоди.

Матеріали та методи дослідження

Було обстежено по 32 юнаки та 30 дівчат за I, II і III типів медико-метеорологічної ситуації. За допомогою механічного секундоміра визначали тривалість 1, 3, 5, 7 і 10-секундних інтервалів (три рази кожен у довільному порядку, після чого брали середній результат, який враховували у загальній вибірці) [5].

За допомогою комп'ютерної методики Г. М. Чайченка і співавторів [7] у них вивчали швидкість реакції вибору для правої руки (РВП, мс), швидкість реакції вибору для лівої руки (РВЛ, мс). Також враховували середнє значення тривалості 1 с за Б. Й. Цукановим [8].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою критерію Фішера — Стьюдента.

