

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ**

КОПЕРНИК

Ірина Миколаївна

УДК 57.017+547.1'1+547.78+577.1

**ПРОГНОЗУВАННЯ ТА ОЦІНКА АНТИМІКОТИЧНОЇ
АКТИВНОСТІ НОВИХ АЗОЛІВ ТА БІСФОСФОНАТІВ**

02.00.10 – біоорганічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2014

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі медико-біологічних досліджень Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук
МЕТЕЛИЦЯ Лариса Олексіївна,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
завідувач відділу медико-біологічних досліджень

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
КІБІРСЬ Володимир Костянтинович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів

кандидат біологічних наук
КУХАРЕНКО Олександр Петрович,
Інститут молекулярної біології та генетики,
старший науковий співробітник відділу медичної хімії

Захист дисертації відбудеться «19» вересня 2014 р. о 10-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.220.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України за адресою 02660, Київ-94, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись в науковій бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Автореферат розісланий «16» червня 2014 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В.О. Євдокименко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Проблема пошуку та конструювання нових хімічних речовин із визначеною біологічною активністю є однією з найголовніших у біоорганічній хімії. Одним із підходів до вирішення цієї проблеми є сучасні комп'ютерні технології, що дозволяють здійснити апріорну оцінку властивостей хімічних сполук виходячи з їх молекулярної структури, ще до їх синтезу. Серед них методи аналізу кількісного взаємозв'язку структура-активність (QSAR), в основі яких лежить припущення, що властивості хімічної сполуки визначаються її структурою. Сучасний дизайн хімічних речовин охоплює широкий спектр атомних та молекулярних параметрів, різних за своєю природою, від суто емпіричних до квантово-механічних.

Грибкові ураження складають одну з поширених груп захворювань у світі. В умовах, коли зростає резистентність патогенної мікрофлори до більшості вже існуючих антимікробних препаратів, розробка нових та вдосконалення існуючих засобів є одним з першочергових завдань. Зокрема, значний інтерес викликають антимікотики – низькомолекулярні інгібітори ферментів, з'ясування механізмів дії яких є важливим для використання таких сполук як ефективних біорегуляторів. Більшість антимікробних препаратів є інгібіторами або рестрикторами ферментних систем клітини гриба, в тому числі *Candida spp.* серед яких інгібітори аспартат протеаз, С14- α -деметилази ланостеролу, хітинази, β -1,3-D-глюкансинтази, скваленепоксидази та ін. Проте розробка нових препаратів вимагає пошуку більш ефективних інгібіторів з меншою токсичністю та покращеною селективністю дії.

Тому прогнозування біоактивності сполук методами QSAR, дослідження їх як інгібіторів специфічних ферментів-мішеней з метою пошуку потенційних низькомолекулярних антимікотичних агентів є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у рамках наукової теми «Вивчення зв'язку структурних особливостей низькомолекулярних регуляторів активності гідролітичних ензимів з їх фармакологічною та біологічною активністю» (№ державної реєстрації 0111V002530).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було QSAR прогнозування та експериментальна оцінка антимікотичної активності ряду функціонально заміщених похідних оксазолу та азотовмісних бісфосфонатів.

Для реалізації поставленої мети було визначено такі **завдання**:

1. Систематизувати банк даних відомих інгібіторів ключових ферментів біосинтезу ергостеролу гриба *Candida albicans* – фарнезилдифосфатсинтази (ФДС) та С14- α -деметилази як потенційних антимікотичних засобів.

2. Створити експертну систему для відбору найбільш інформативних параметрів та розрахункового прогнозування антимікотичної дії нових сполук серед функціонально заміщених оксазолів (ФЗО) та азотовмісних бісфосфонатів (АБФ).

3. На основі даних QSAR та відібраних дескрипторів провести раціональне конструювання нових сполук – потенційних антимікотиків. Визначити речовини з високою прогнозованою біологічною активністю для подальшого синтезу.

4. Експериментально дослідити антимікотичну активність та токсичний вплив нових функціонально заміщених похідних оксазолу та азотовмісних бісфосфонатів, для яких було передбачено високу здатність інгібувати ріст культури *Candida albicans*.

5. Вивчити вплив досліджених сполук на ряд показників фізіологічного стану клітин крові людини.

Об'єкт дослідження. Культура гриба *Candida albicans* М 885 (АТСС 10231).

Предмет дослідження. Функціонально заміщені оксазоли та азотовмісні бісфосфонати як нові потенційно біоактивні сполуки.

Методи дослідження. Комп'ютерне прогнозування (пакет програм ChemAxon, пакет Dragon V5.5, асоціативна штучна нейронна мережа (Associative Neural Network (ASNN)), методи математичної статистики, методи відбору дескрипторів (pruning methods)), мікробіологічні та біохімічні методи (диско-дифузійний, експрес-метод визначення середньої ефективної дози та її похибки, метод осмотичного гемолізу еритроцитів крові людини, метод Панченкова, НСТ-тест).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету стандартних комп'ютерних програм.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено ефективні QSAR моделі для пошуку потенційних інгібіторів росту гриба *Candida albicans* та його ферментів-мішеней – С14- α -деметилази та фарнезилдифосфатсинтази, що беруть участь у біосинтезі ергостеролу.

Створено експертні системи для передбачення інгібуючої активності ФЗО та АБФ по відношенню до С14- α -деметилази та фарнезилдифосфатсинтази та виявлено ряд дескрипторів, що характеризують їх антикандидозну активність.

Вперше показано, що синтезовані ФЗО та АБФ з прогнозованою високою активністю інгібування росту культури гриба *C. albicans* у дослідах *in vitro* проявляють антимікотичні властивості, а також визначено їх токсичність та вплив на функціональний стан клітин крові людини.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами виконаних досліджень ряд низькомолекулярних функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів рекомендовано для подальшого вивчення як потенційні антикандидозні засоби.

Комп'ютерні моделі, розроблені за принципом пошуку кількісних співвідношень «структура-активність», результати експериментальних біологічних досліджень функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів дозволять визначити серед них активні сполуки та передбачити шляхи пошуку потенційних антимікотичних засобів.

Результати досліджень застосовано в науковому та навчальному процесах кафедри акустики та акустoeлектроніки ФЕМ НТУУ «КПІ».

Особистий внесок здобувача. Біологічні дослідження на базі Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика (Договір про співробітництво від 02.2011р. до 31.12.2013р.), токсикологічні дослідження та комп'ютерне моделювання зв'язку між структурою та біологічною активністю хімічних сполук (QSAR) здійснено особисто дисертантом. Автор щиро вдячний старшому науковому співробітнику відділу медико-біологічних досліджень Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України к. х. н. В.В. Ковалішину та доценту кафедри мікробіології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика к.м.н. В.М. Благодатному за надану методичну допомогу, а також к.б.н. Л.Л. Чарочкіній – за допомогу в створенні бази даних.

Синтез низькомолекулярних сполук із прогнозованою високою антикандидозною активністю здійснено у відділі хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ та відділі тонкого органічного синтезу Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Розробку методології і схеми дослідження, а також обговорення отриманих результатів було здійснено разом з науковим керівником. Експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, їх узагальнення

та інтерпретація виконані автором особисто. Результати робіт, що опубліковані у співавторстві та увійшли до дисертації, одержані здобувачем.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, основні положення та висновки дисертації доповідалися на наукових конференціях: XXVI Науковій конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії (Київ, 30–31 березня 2011р.); XXVII Науковій конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії (Київ, 21–22 березня 2012р.); III Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 11–13 березня 2013р.); XXVIII Науковій конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії (Київ, 28–29 березня 2013р.); IX Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 16–19 квітня 2013); XVI международной научно-практической конференции "Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике" (Россия, Санкт-Петербург, 25–26 апреля 2013г.); Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Біологічно активні сполуки та матеріали: фундаментальні і прикладні питання отримання та застосування» (Крим, Новий Світ, 27 травня –1 червня 2013р.); 5th International symposium “Methods and applications of computational chemistry” (Kharkiv, 1–5 July, 2013); VI международная научно-практическая конференция "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине” (Россия, Санкт-Петербург, 14–15 ноября, 2013г.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 робіт, у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях та 9 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 151 сторінці друкованого тексту, складається зі вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів досліджень, розділу власних досліджень, висновків, додатків, списку використаних джерел (164 найменування). Робота ілюстрована 4 рисунками та 16 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді наукової літератури проаналізовано проблему розповсюдження грибкових інфекцій, зокрема кандидозних, викликаних *C. albicans* – збудником, що входить до першої п’ятірки найбільш поширених факторів інфекційних захворювань. На основі сучасних даних про молекулярний механізм дії похідних азолів та бісфосфонатів як інгібіторів C14- α -деметилази та ФДС

обґрунтовано перспективність пошуку потенційних антикандидозних агентів серед функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів. Особливу увагу приділено методам QSAR моделювання для пошуку та розробки нових потенційно біологічно активних речовин.

Матеріали та методи досліджень

Комп'ютерний прогноз біологічної активності органічних та фосфорорганічних сполук як інгібіторів фарнезилдифосфатсинтази та C14- α -деметилази здійснено за допомогою методів QSAR моделювання. Змодельовано 3D структури молекул з використанням пакету програм ChemAxon Standardizer. Для розрахунку молекулярних дескрипторів застосовано пакет Dragon V5.5. Оцінку інформативності знайдених дескрипторів проводили спеціальними методами відбору дескрипторів (pruning methods). Для розрахунків використовувалась асоціативна штучна нейронна мережа (Associative Neural Network, ASNN). Прогнозуючу здатність моделей оцінювали за допомогою коефіцієнта перехресної оцінки (q^2).

Дослідження антимікробних властивостей сполук проводили *in vitro* диско-дифузійним методом на твердому поживному середовищі з використанням стандартного набору мікроорганізмів. Мікробне навантаження складало $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^9$ колонієутворюючих одиниць в 1 мл (КУО/мл) (С.В. Дьяченко, Е.В. Слободенюк, В.Г. Дьяченко, 2010).

Еритроцити та лейкоцити крові людини отримували методом виділення нейтрофілів в подвійному градієнті густини фіколл-урографіну (Л.В. Ковальчук, 2010).

Гемолітичну дію досліджуваних сполук вивчали за допомогою методу визначення осмотичної резистентності еритроцитів крові людини у модифікації Ідельсона (Л.І. Ідельсон, 1974).

Вплив досліджених сполук на швидкість реакції осідання еритроцитів (ШОЕ) крові людини проводили за методом Панченкова (Т.П. Панченков, 1982).

Зміни функціонально-метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові людини, спричинені активністю досліджених сполук, визначали за допомогою НСТ-тесту (М.Е.Виксман, А.Н. Маянский, 1979).

Дослідження гострої токсичності (LD_{50}) проводили *in vivo* на лабораторних мишах масою 18-20 г за експрес-методом Прозоровського (В.Б. Прозоровський, 1991).

Утримання тварин та роботу з ними проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджується з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1985).

Результати досліджень та обговорення

Комп'ютерний прогноз біологічної активності нових ФЗО та АБФ. В процесі пошуку нових потенційних антимікотиків – інгібіторів росту *C. albicans* та інгібіторів ферменту-мішені С14- α -деметилази створено вибірки сполук (1878 та 259 відповідно) серед азолів та їх похідних. Активність сполук оцінювали за величиною мінімальної інгібуючої концентрації (MIC). За допомогою методу Dragon V.5.5 розраховано 3224 дескриптори для кожної сполуки, відібрано найбільш значимі дескриптори та на їх основі побудовано ряд QSAR моделей (з використанням ANNN) для прогнозування активності ФЗО.

Прогнозуючу здатність моделей оцінювали величиною коефіцієнта перехресної оцінки (q^2), отриманого за допомогою методу асоційованих штучних нейронних мереж. Діаграми розподілу експериментальних та передбачених значень MIC_{50} для інгібіторів росту *C. albicans* та його ферменту С14- α -деметилази представлено на рис. 1, 2.

Наведені на рис. 1 та рис. 2 дані про розподіл експериментальних та передбачених значень MIC_{50} для інгібіторів росту *C. albicans* та С14- α -деметилази свідчать, що передбачена антикандидозна активність у порівнянні з відомою експериментальною для більшості сполук співпадає – лежить у межах $1 \lg$ (MIC). Обчислений коефіцієнт перехресної оцінки (0,6–0,9) для всіх моделей свідчить про їх високу прогнозуючу здатність. ФЗО із прогнозованою активністю 1 – 10 мкМ були відібрані як потенційні антикандидозні біорегулятори.

Для прогнозування потенційної біологічної активності нових АБФ як інгібіторів фарнезилдифосфатсинтази побудовано ряд QSAR моделей на основі структур АБФ, що є інгібіторами ФДС найпростіших (*Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*). Такий підхід

базувався на тому, що в доступній літературі відсутні дані про активність АБФ як інгібіторів ФДС *C. albicans*, а також існує велика вірогідність, що ФДС цих одноклітинних еукаріотичних патогенів людини може мати подібні функціональні властивості у процесі біосинтезу ергостеролу.

Дані про розподіл експериментальних та передбачених значень IC_{50} та K_i для інгібіторів ФДС представлено на рис. 3, 4.

Рисунок 1

Розподіл експериментальних значень $-\lg(MIC)$ та передбачених значень $-\lg(MIC)$ для інгібіторів росту гриба *C. albicans*

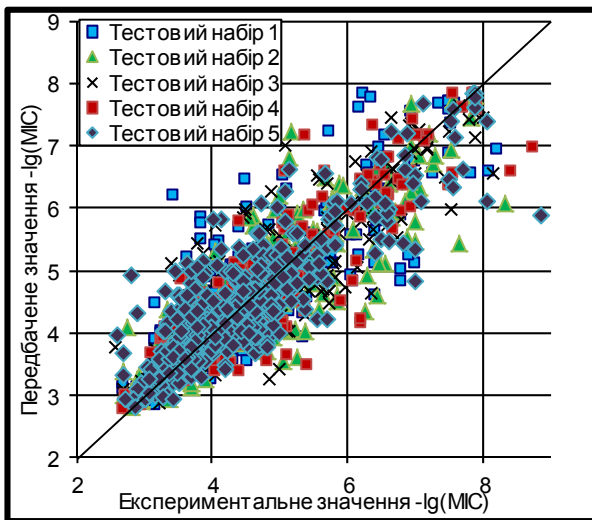


Рисунок 3

Розподіл експериментальних значень $-\lg(IC_{50})$ та передбачених значень $-\lg(IC_{50})$ для інгібіторів ФДС

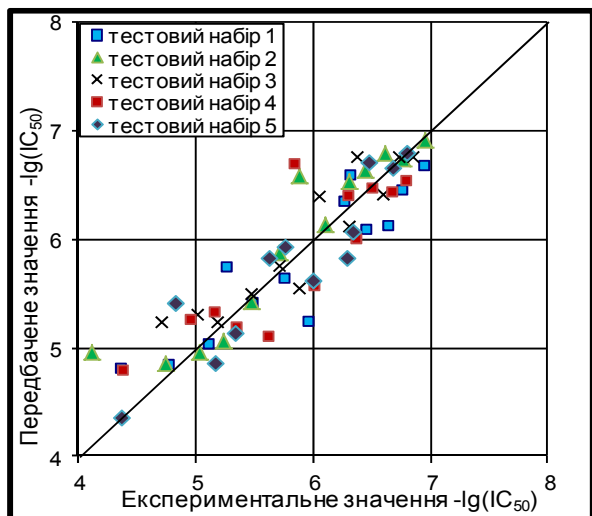


Рисунок 2

Розподіл експериментальних значень $-\lg(MIC)$ та передбачених значень $-\lg(MIC)$ для інгібіторів $C14-\alpha$ -деметиلاзи

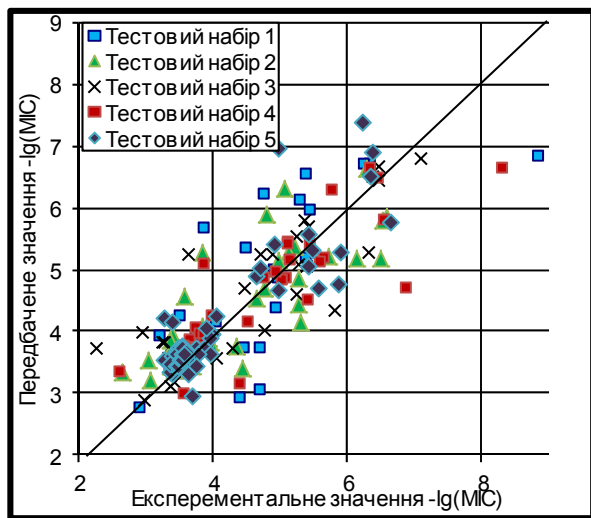
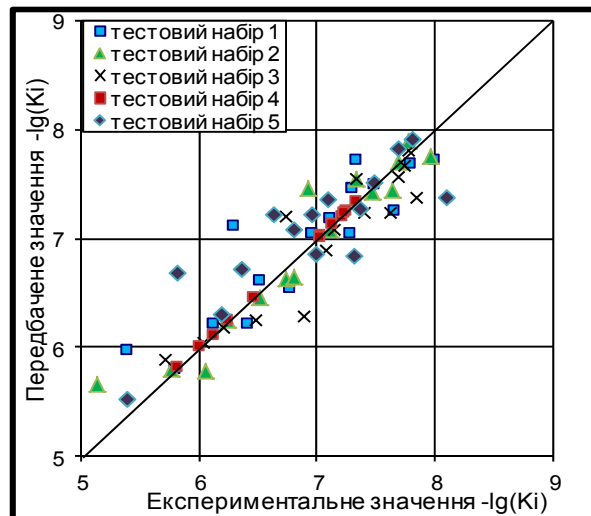


Рисунок 4

Розподіл експериментальних значень $-\lg(K_i)$ та передбачених значень $-\lg(K_i)$ для інгібіторів ФДС



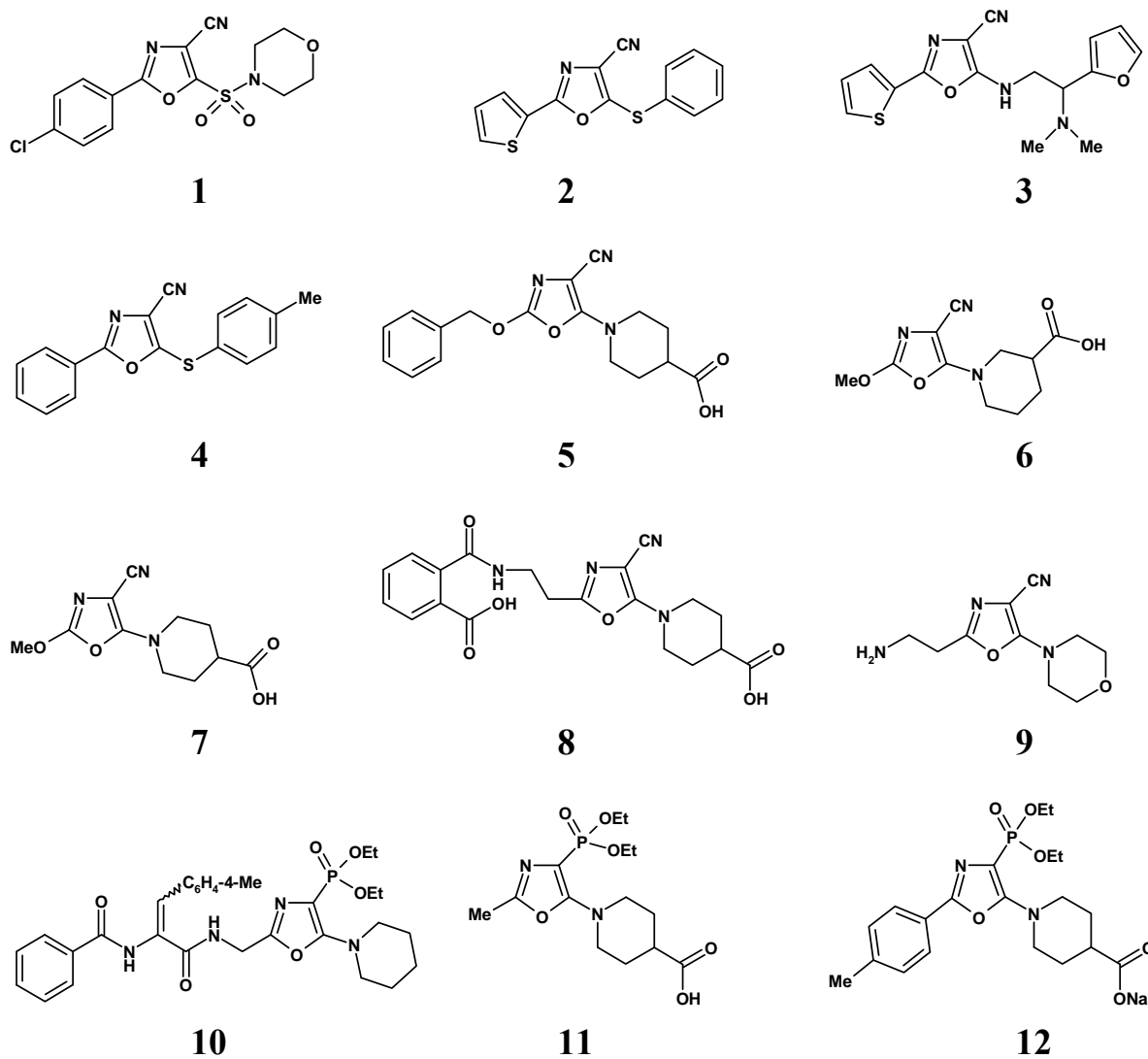
Було створено дві вибірки сполук-інгібіторів ФДС *Leishmania major* з відомими значеннями IC_{50} (62 сполуки) і K_i (76 сполук). Наведені на рис. 3 та рис. 4 діаграми показують, що для більшості сполук різниця між експериментальними та передбаченими значеннями активності лежить в межах однієї логарифмічної одиниці. Точність прогнозу для всієї вибірки складала 0,81 (q^2), що свідчить про високу прогнозуючу здатність моделей.

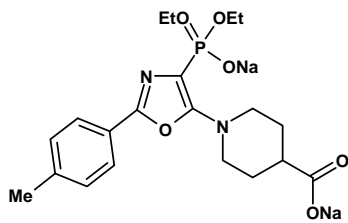
За результатами прогнозу біологічної активності ФЗО та АБФ відібрано ряд найбільш перспективних сполук з оптимальними значеннями прогнозованої активності (рис. 5).

Рисунок 5

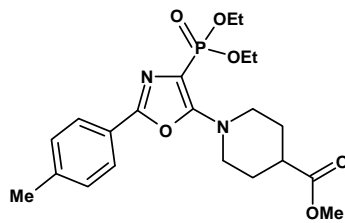
Хімічна структура сполук, відібраних для експериментальних досліджень

Функціонально заміщені оксазоли та продукти їх перетворень

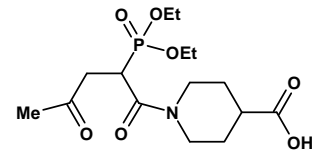




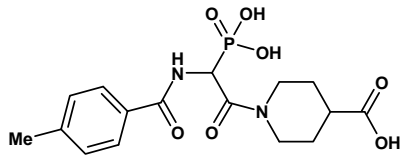
13



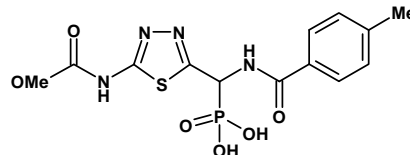
14



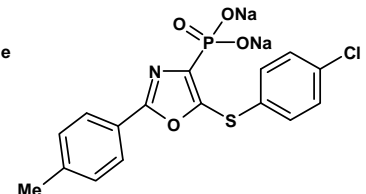
15



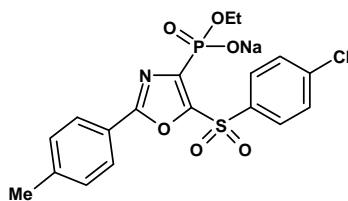
16



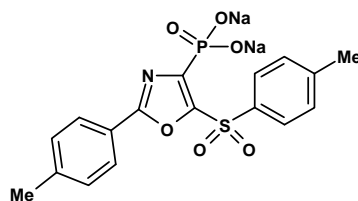
17



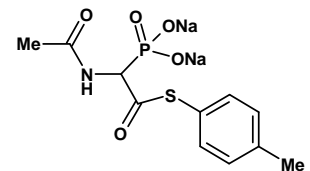
18



19

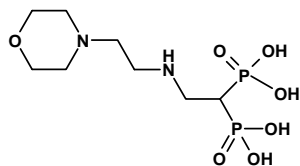


20

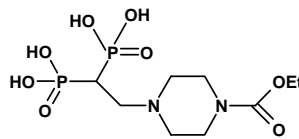


21

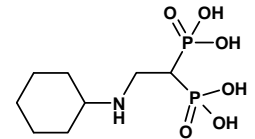
Азотовмісні бісфосфонати



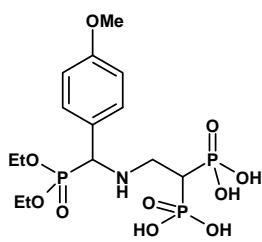
30



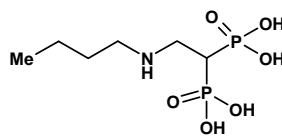
31



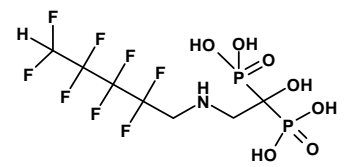
32



33



34



35

Вивчення антимікробних властивостей синтезованих ФЗО та АБФ.

За результатами комп'ютерного прогнозування активності сполук було проведено експериментальне дослідження їх фунгістатичної дії. Результати дослідження антимікотичної активності ФЗО наведено в табл.1.

Діаметри зон затримки росту (мм) культури *C. albicans*, $M \pm m$, (n=3)

| Досліджені сполуки | Кількість мікробних тіл в 1 мл біоматеріалу, КУО/мл | | | | | |
|--------------------|---|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | $1 \cdot 10^5$ | | $1 \cdot 10^6$ | | $1 \cdot 10^7$ | |
| | стандартний штамп | клінічний ізолят | стандартний штамп | клінічний ізолят | стандартний штамп | клінічний ізолят |
| 1** | 12,4±0,4 | н/а | 9,4±0,3 | н/а | н/а | н/а |
| 2 | 10,2±0,3 | н/а | н/а | н/а | н/а | н/а |
| 3 | 8,1±0,2 | н/а | н/а | н/а | н/а | н/а |
| 4 | 22,5±0,2* | 10,3±0,3 | 17,2±0,5 | 9,3±0,2 | 14,2±0,4 | 9±0,3 |
| 5 | 15,1±0,4 | н/а | 11,3±0,3 | н/а | н/а | н/а |
| 6 | 14,4±0,5 | н/а | 10,3±0,4 | н/а | н/а | н/а |
| 7 | 13,3±0,2 | н/а | н/а | н/а | н/а | н/а |
| 8 | 20,2±0,7 | 9,4±0,2 | 16,4±0,2 | 8,3±0,2 | 13,4±0,3 | н/а |
| 9 | 22,3±0,5 | 9,5±0,3 | 20,2±0,5 | 9,3±0,3 | 17,2±0,4 | н/а |
| 10 | 16,3±0,5 | н/а | 13,2±0,2 | н/а | н/а | н/а |
| 11 | 20,4±0,5 | 10,4±0,4 | 13,3±0,3 | 8,4±0,2 | 9,4±0,3 | н/а |
| 12 | 24,2±0,4* | н/а | 20,3±0,5 | н/а | 18,5±0,4 | н/а |
| 13 | 22,3±0,4 | н/а | 17,4±0,4 | н/а | 14,1±0,3 | н/а |
| 14 | 16,6±0,2 | н/а | 13,3±0,3 | н/а | 9,3±0,2 | н/а |
| 15 | 14,5±0,2 | н/а | 12,1±0,2 | н/а | 9,2±0,3 | н/а |
| 16 | 14,2±0,2 | н/а | 10,5±0,2 | н/а | 8,3±0,3 | н/а |
| 17 | 15,5±0,3 | н/а | 11,4±0,2 | н/а | 8,1±0,2 | н/а |
| 18 | 14,1±0,4 | н/а | 11,2±0,3 | н/а | 8,2±0,3 | н/а |
| 19 | 20,6±0,3 | 10,3±0,3 | 15,2±0,2 | н/а | 10,5±0,4 | н/а |
| 20 | 22,1±0,5 | 8,2±0,2 | 18,5±0,4 | н/а | 14,4±0,4 | н/а |
| 21 | 18,3±0,3 | н/а | 14,3±0,4 | н/а | 12,5±0,4 | н/а |
| ФЛ ¹ | 21,2±0,4 | н/а | 21,4±0,6 | н/а | 20,2±0,4 | н/а |
| ДМСО ² | н/а | н/а | н/а | н/а | н/а | н/а |

Примітки: * – значення достовірно відрізняється від контролю ($p < 0,05$); ** – вміст на диску досліджених сполук та референс-препарату флуконазол склав $13 \cdot 10^{-8}$ М; н/а – сполука не активна; ¹ – флуконазол; ² – диметилсульфоксид.

На основі отриманих даних встановлено, що активність 4-ціанооксазолу **4** та 4-фосфорильованого оксазолу **12** достовірно перевищує активність референс-препарату флуконазол. Антикандидозна активність оксазолів **8, 9, 11, 13, 19, 20** не поступалася активності флуконазолу (при мікробному навантаженні $1 \cdot 10^5$ КУО/мл). При збільшенні мікробного навантаження до $1 \cdot 10^7$

КУО/мл активність сполук знижувалась, поступаючись активності флуконазолу.

Важливо відмітити, що майже всі з зазначених сполук, за винятком фосфорильованих оксазолів **12** та **13**, проявили також активність проти штаму клінічного ізоляту *C. albicans*, виділеного з біоматеріалу та резистентного до флуконазолу.

В експерименті з вивчення фунгістатичної активності АБФ та встановлення вірогідного механізму їх дії як контрольні сполуки використовували {1-фосфоно-2-[(піридин-2-іл)аміно]етил}фосфонову кислоту (**36**) [J. Med. Chem., 2003, V. 46, № 24, P. 5171], лікарські засоби ризедронат, ібандронат та флуконазол як референс-препарати (табл. 2).

Таблиця 2

Діаметри зон затримки росту (мм) культури *C. albicans*, $M \pm m$, (n=3)

| Досліджені сполуки | Вміст на диску, $1 \cdot 10^{-8}$ М | Кількість мікробних тіл в 1 мл біоматеріалу, КУО/мл | | | | |
|--------------------|-------------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | $1 \cdot 10^5$ | $1 \cdot 10^6$ | $1 \cdot 10^7$ | $1 \cdot 10^8$ | $1 \cdot 10^9$ |
| 30 | 13,0 | 11,3±0,3 | 9,8±0,5 | 7,7±0,3 | н/а | н/а |
| | 2,0 | 9,7±0,2 | 7,7±0,2 | н/а | н/а | н/а |
| 31 | 13,0 | 8,5±0,2 | 7,5±0,3 | н/а | н/а | н/а |
| | 2,0 | н/а | н/а | н/а | н/а | н/а |
| 32 | 13,0 | 24,2±0,4* | 22,7±0,5* | 21,8±0,6* | 20,4±0,5* | 18,1±0,6* |
| | 2,0 | 20,3±0,4 | 18,4±0,5 | 16,8±0,4 | 14,3±0,4 | 14,8±0,5 |
| 33 | 13,0 | 12,4±0,4 | 10,5±0,4 | 8,7±0,2 | н/а | н/а |
| | 2,0 | 10,5±0,3 | 9,5±0,2 | н/а | н/а | н/а |
| 34 | 13,0 | 26,6±0,5* | 23,4±0,5* | 22,6±0,6* | 20,5±0,3* | 18,6±0,5* |
| | 2,0 | 23,5±0,3 | 20,4±0,3 | 20,9±0,2 | 17,8±0,5 | 14,8±0,3 |
| 35 | 13,0 | 13,4±0,5 | 12,1±0,2 | 8,1±0,3 | н/а | н/а |
| | 2,0 | 11,0±0,5 | 8,4±0,3 | н/а | н/а | н/а |
| 36 | 13,0 | 22,9±0,2* | 21,7±0,1* | 18,4±0,3 | 16,3±0,5 | 12,3±0,5 |
| | 2,0 | 18,7±0,2 | 16,2±0,6 | 14,5±0,4 | 12,2±0,3 | 11,2±0,2 |
| Ризедронат | 13,0 | 21,2±0,3 | 19,1±0,5 | 15,4±0,5 | 13,8±0,2 | 11,8±0,3 |
| | 2,0 | 14,0±0,4 | 12,3±0,4 | н/а | н/а | н/а |
| Ібандронат | 13,0 | 22,4±0,2 | 20,7±0,2 | 15,7±0,3 | 14,4±0,3 | 10,3±0,2 |
| | 2,0 | 16,2±0,4 | 1,4±0,3 | н/а | н/а | н/а |
| Флуконазол | 13,0 | 21,5±0,4 | 20,5±0,5 | 20,5±0,4 | 18,0±0,4 | 12,5±0,4 |

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

Дані табл. 2 свідчать, що бісфосфонати **32** і **34**, як сполуки з високою прогнозованою здатністю інгібувати ФДС із вмістом на диску $2,0 \cdot 10^{-8}$ М і при

максимальному мікробному навантаженні $1 \cdot 10^9$ КУО/мл культури *C. albicans*, достовірно перевищували активність флуконазолу – формували зони затримки росту гриба 18,1, 18,6 та 12,5 мм відповідно.

Для бісфосфонатів **30**, **31**, **33**, **35**, прогнозована активність яких на порядок нижче, фунгістатичний ефект зафіксовано лише при низькому мікробному навантаженні ($1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ КУО/мл). У той же час, сполука **36**, ризедронат і ібандронат, як відомі інгібітори ФДС, формували зони затримки росту, аналогічні флуконазолу (21,7, 21,2, 22,4 та 20,5 мм відповідно).

Таким чином, фунгістатичний ефект досліджених АБФ відповідав рівню їх здатності інгібувати ФДС *C. albicans*. Встановлені залежності з високою долею вірогідності дозволяють припустити, що молекулярний механізм фунгістатичної дії АБФ пов'язаний з інгібуванням ФДС гриба.

Слід додати, що сполуки **32** та **34** виявили фунгістатичну активність і проти резистентного штаму гриба *C. albicans*, культура якого була виділена з біоматеріалу.

В результаті виконаних робіт нами був встановлений взаємозв'язок між хімічною будовою та рівнем антикандидозної активності функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів (табл. 1, 2). Серед похідних оксазолу найбільш активними виявились 4-ціанооксазоли **4**, **8**, **9** та 4-фосфорильовані оксазоли **12**, **13**, **19**, **20**. Виявлено, що наявність у положенні 2 аміноетильної групи (сполука **9**) або її ацильованої похідної (сполука **8**) призводить до прояву найбільш виразної активності (майже у 2 рази) порівняно з іншими дослідженими ціанооксазолами (сполуки **1** – **3** та **5** – **7**). Наявність фрагменту ніпекотинової та ізоніпекотинової кислот у положенні 5 ціанооксазолів **5** – **7** не призводить до збільшення рівня активності, тоді як введення ізоніпекотинового фрагменту у положення 5 фосфорильованих оксазолів має протилежний ефект (сполука **12**).

Для прояву антикандидозної дії важлива природа замісника у положенні 2 оксазольного фрагменту. Так, наявність арильного замісника, на відміну від алкільного, алкоксильного чи тінільного, підвищує рівень активності (див. сполуки **4**, **12**, **13**, **19**, **20**).

Значну роль відіграє також природа сірковмісних груп у положенні 5 оксазольного циклу. Зокрема, введення сульфонільної групи у 4-фосфорильовані оксазоли **19**, **20** сприяє підвищенню активності, в той час як наявність сульфанільної групи знижує її (сполука **18**). Протилежний ефект

спостерігається для ціанооксазолу **1** – сульфонільна група не впливає на його активність.

Варто відмітити, що продукти розщеплення оксазольного кільця (сполуки **15**, **16**, **21**) або продукти його рециклізації (сполука **17**) не проявляють високої активності.

Дослідження антикандидозної активності шести нових азотовмісних бісфосфонатів показують, що введення аліфатичного замісника до атома азоту, зокрема циклогексильного (сполука **32**) або бутильного (сполука **34**), відіграє важливу роль для прояву антимікотичних властивостей.

Побічні біологічні ефекти досліджених сполук як потенційних антимікотиків. Морфо-функціональний скринінг сполук проводили *in vitro* на клітинах крові людини. Вплив похідних оксазолу та азотовмісних бісфосфонатів на фізико-хімічні показники стану еритроцитів крові людини визначали за реакціями осмотичного гемолізу та швидкості осідання клітин. Встановлено, що досліджені сполуки не впливають на осмотичну резистентність еритроцитів, проте достовірно змінюють швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ). Причому, АБФ на 35 % підвищували ШОЕ, а ФЗО у середньому на 70 % зменшували досліджувану реактивність.

Вплив сполук на функціонально-метаболичну активність нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові людини, відповідальних за реакційний стан неспецифічного імунітету людини, визначали в НСТ-тесті. Встановлено, що АБФ не впливають на функціональну активність нейтрофільних гранулоцитів крові – в умовах експерименту додавання зазначених сполук до дослідних зразків клітин крові не викликало достовірного збільшення як долі клітин, що активувалися (показник ДАН), так і їхньої фагоцитарної активності (ІАН – показник, що показує рівень здатності до поглинання патогену). При додаванні ФЗО у зразки клітин крові було зареєстровано також достовірне збільшення обох показників НСТ-тесту. Всі зазначені ФЗО достовірно збільшували не лише долю активованих нейтрофілів, але й ступінь їх активації – у середньому на 30 %.

Гостру токсичність ФЗО та АБФ визначали *in vivo* на лабораторних тваринах. Експериментально встановлена доза гострої токсичності (LD_{50}) для активних ФЗО та АБФ свідчить про перспективність їх подальшого вивчення як потенційних антимікотиків. Як за класифікацією Сидорова («Классификация токсичности веществ при введении под кожу и в брюшную полость животного», К.К. Сидоров, 1977), так і за класифікацією Заугольникова

(«Гигиеническая классификация ядов», С.Д. Заугольников, 1978), тестовані сполуки є мало- та помірно токсичними – LD₅₀ зареєстровано у межах 101-1000 та 151-1500 мг/кг відповідно.

ВИСНОВКИ

Узагальнення результатів дисертаційної роботи свідчить про перспективність використання 4-ціано- та 4-фосфорильованих похідних оксазолів, а також азотовмісних бісфосфонатів для створення препаратів, котрі виявляють антимікотичну активність.

1. Створено нові QSAR моделі для пошуку інгібіторів ферментів біосинтезу ергостеролу *Candida albicans*, котрі можуть бути застосовані для прогнозування активності похідних оксазолу та азотовмісних бісфосфонатів.
2. На підставі даних віртуального скринінгу та результатів експериментальних біологічних досліджень 4-ціанооксазоли, 4-фосфорильовані оксазоли та азотовмісні бісфосфонати рекомендовано для подальшого дослідження як антикандидозні засоби.
3. Встановлено, що наявність арильного замісника у положенні 2 оксазольного кільця 4-ціанооксазолів, а також арильного замісника у положенні 2 та сульфонільної групи у положенні 5 4-фосфорильованих оксазолів сприяє підвищенню рівня антикандидозної активності.
4. Показано, що введення аліфатичного замісника до атома азоту бісфосфонатів може забезпечувати реалізацію їх антимікотичних властивостей.
5. Результати теоретичних розрахунків та отримані експериментальні дані вказують на те, що ймовірним механізмом антикандидозної активності азотовмісних бісфосфонатів є пригнічення фарнезилдифосфатсинтази у процесі біосинтезу ергостеролу гриба.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Метелиця Л.О. Дослідження імунокорегуючих властивостей 4-фосфорильованих похідних 1,3-оксазолу та 1,3-тіазолу за умов коротко- та довготривалого супресивного ефекту циклофосфану / Л.О. Метелиця, І.М. Коперник, К.М. Кондратюк, О.В. Головченко, С.В. Попільніченко,

- В.В. Прокопенко, В.Є. Попов, В.С. Броварець // Ukr. Bioorg. Acta. – 2010. – №2. – С. 47-51.
2. Коперник І.М. Дослідження *in vitro* антимікробної активності нових похідних оксазолу та продуктів його перетворень / І.М. Коперник, В.М. Благодатний, О.В. Петренко, Л.Є. Калашнікова, В.В. Прокопенко, К.М. Кондратюк, О.І. Лукашук, О.В. Головченко, С.А. Чумаченко, О.В. Шабликін, Л.О. Метелиця, В.С. Броварець // Ukr. Bioorg. Acta. – 2011. – №2. – С. 57-68.
 3. Коперник І.М. Антибактеріальні властивості азотовмісних бісфосфонатів як інгібіторів фарнезилдифосфатсинтази / І.М. Коперник, Л.Є. Калашнікова, Л.П. Голод, Л.О. Метелиця // Ukr. Bioorg. Acta. – 2013. – №2. – С. 8-11.
 4. Prokopenko V. Design and synthesis of new potent inhibitors of farnesyl pyrophosphate synthase / V. Prokopenko, V. Kovalishin, M. Shevchuk, I. Kopernyk, L. Metelitsia, V. Romanenko, S. Mogilevich, V. Kukhar // Current Drug Discovery Technologies. – 2014. – №11.– 133-144.
 5. Kovalishyn V. QSAR studies, design, synthesis and antimicrobial evaluation ofazole derivatives / V. Kovalishyn, I. Kopernyk, S. Chumachenko, O. Shablykin, K. Kondratyuk, S. Pil'о, V. Prokopenko, V. Brovarets, L. Metelytsia // Computational Biology and Bioinformatics. – 2014. – V. 2, №2. – P. 25-32.
 6. Калашнікова Л.Є. Вплив нових потенційних фунгістатичних агентів на деякі функції клітин крові людини / Л.Є. Калашнікова, І.М. Коперник, І.В. Семенюта, Л.П. Голод, Л.О. Метелиця // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2014 – Т. 12 – Вип. 1 (45) – С. 79-82.
 7. Коперник И.Н. Исследование иммунокорректирующих свойств 4-фосфолированных производных 1,3-оксазола и 1,3-тиазола в условиях краткого и длительного супрессивного эффекта циклофосфана / И.Н. Коперник, В.В. Прокопенко, Л.А. Метелица // XXVI научная конференция по биоорганической и нефтехимии. – Киев. – 2011. №19. – С. 107.
 8. Коперник И.Н. Дизайн ингибиторов фарнезилдифосфатсинтазы и изучение их антифунгальных свойств / И.Н. Коперник, В.В. Ковалишин, Л.А. Метелица, В.В. Прокопенко// III Международная научно-практическая конференция. – Запорожье. – 2012. – С. 319-320.
 9. Коперник И.Н. QSAR моделирование ингибиторов фарнезилдифосфатсинтазы и изучение их антимикотической активности /

- И.Н. Коперник, В.В. Ковалишин, Л.А. Метелица, В.В. Прокопенко // XXVII научная конференция по биоорганической и нефтехимии. – Киев. – 2012. №21. – С. 173.
10. Коперник І. М. Доцільність використання культури *Candida albicans* для створення тест-системи первинного скринінгу інгібіторів фарнезилдифосфатсинтази / І. М. Коперник, В.В. Ковалішин, Л.О. Метелиця, В.В. Прокопенко // ІХ міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології». – Львів. – 2013. – С. 306.
 11. Коперник И.Н. Антимикробные свойства новых функционально замещенных оксазолов / И.Н. Коперник, В.В. Ковалишин, Л.А. Метелица, В.В. Прокопенко // XXVIII научная конференция по биоорганической и нефтехимии.– Киев. – 2013. – №22. – С. 55.
 12. Ковалишин В.В. Создание QSAR моделей для предсказания активности потенциальных ингибиторов *Candida albicans* / В.В. Ковалишин, Л.А. Метелица, И.Н. Коперник, Л.Л. Чарочкина, В.В. Прокопенко // Международная междисциплинарная научная конференция «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». – Новый Свет. – 2013. – С. 69-70.
 13. Vasilenko A.N. QSAR studies of anticancer activity of 1,3-thiazole and 1,3-oxazole derivatives / A.N. Vasilenko, O.T. Devinyak, I.V. Semenyuta, V.V. Kovalishin, I.N. Kopernyk, V.S. Brovarets // 5th International symposium “Methods and applications of computational chemistry”. – Kharkiv. – 2013. – P. 131.
 14. Калашникова Л.Е. Биотестирование как первичная оценка токсичности новых производных оксазола и продуктов его превращений, обладающих фунгистатической активностью / Л.Е. Калашникова, И.Н. Коперник, К.М. Кондратюк, С.А. Чумаченко, Л.А. Метелица // XVI международная научно-практическая конференция "Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике". – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 243-245.
 15. Калашникова Л.Е. Применение ультразвука в исследованиях токсичности производных азолов, как потенциальных биологически активных соединений / Л.Е. Калашникова, И.Н. Коперник, Л.А. Метелица // VI международная научно-практическая конференция "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине". – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 216-219.

АНОТАЦІЯ

Коперник І.М. Прогнозування та оцінка антимікотичної активності нових азолів та бісфосфонатів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія. – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії Національної Академії Наук України, Київ, 2014.

Дисертацію присвячено створенню ефективних малотоксичних інгібіторів росту гриба *Candida albicans*. Розроблено QSAR моделі для прогнозування антимікотичної активності сполук серед функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів. Проведено широкий спектр біологічних досліджень сполук-лідерів.

Встановлено антифунгальні властивості сполук проти стандартного та резистентного штамів культури *Candida albicans*. Речовини з високою антимікотичною активністю рекомендовано як потенційні антикандидозні засоби.

Виявлено взаємозв'язок між хімічною будовою та рівнем антикандидозної активності функціонально заміщених оксазолів та азотовмісних бісфосфонатів.

На основі експериментально встановленої залежності між рівнем фунгістатичної активності сполук та їх здатністю інгібувати фарнезилдифосфатсинтазу висунуто гіпотезу про молекулярний механізм дії азотовмісних бісфосфонатів.

Визначено вплив рекомендованих сполук на ряд показників фізіологічного стану клітин крові людини.

Встановлено, що досліджувані сполуки відносяться до класів помірно- та малотоксичних.

Ключові слова: функціонально заміщені оксазоли, азотовмісні бісфосфонати, QSAR моделі, антикандидозна активність, клітини крові, токсичність.

АННОТАЦИЯ

Коперник И.Н. Прогнозирование и оценка антимикотической активности новых азолов и бисфосфонатов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. – Институт

биоорганической химии и нефтехимии Национальной Академии Наук Украины, Киев, 2014.

Диссертационная работа посвящена созданию эффективных малотоксичных ингибиторов роста гриба *Candida albicans*. В процессе выполнения работы решены следующие задачи:

- созданы прогнозирующие QSAR модели для поиска новых функционально замещённых оксазолов и азотсодержащих бисфосфонатов как ингибиторов ферментов биосинтеза эргостерола гриба *Candida albicans*. Определены соединения-лидеры.

- исследованы антимикробные свойства соединений с высокой прогнозированной активностью.

- изучено влияние наиболее активных соединений на ряд показателей физиологического состояния клеток крови человека.

- определена токсичность биологически активных соединений.

Систематизирован банк данных известных ингибиторов фарнезилдифосфатсинтазы и C14- α -деметилазы – ключевых ферментов биосинтеза эргостерола *Candida albicans*. Разработаны QSAR модели для прогнозирования антимикотической активности соединений среди функционально замещённых оксазолов и азотсодержащих бисфосфонатов. С помощью специальных методов анализа отобраны наиболее значимые дескрипторы, которые обуславливают заданную биологическую активность, в частности, антикандидозную. Определены соединения-лидеры.

Проведен широкий спектр биологических исследований соединений с высокой прогнозированной активностью.

Установлена антикандидозная активность исследуемых соединений как против стандартного штамма *Candida albicans* M 885 (ATCC 10231), так и против клинического изолята, резистентного к референс-препарату флуконазол. Вещества с высокой антимикотической активностью рекомендованы для дальнейшего исследования в качестве потенциальных антикандидозных средств.

На основании экспериментально установленной зависимости между наличием фунгистатической активности соединений и их способности ингибировать фарнезилдифосфатсинтазу выдвинута гипотеза о молекулярном механизме действия азотсодержащих бисфосфонатов.

Выявлена взаимосвязь между химическим строением и уровнем антикандидозной активности функционально замещённых оксазолов и

азотсодержащих бисфосфонатов. Установлено, что для проявления антимикотического действия производными оксазола важна природа заместителя в положении 2 оксазольного фрагмента. Значительную роль играют также серосодержащие группы в положении 5 оксазольного цикла. Для проявления антикандидозных свойств азотсодержащих бисфосфонатов важную роль играет наличие алифатического заместителя у атома азота.

Определено влияние ряда соединений на показатели физиологического состояния клеток крови человека.

Установлено, что исследуемые замещенные оксазолы и азотсодержащие бисфосфонаты по гигиенической классификации ядов Заугольника относятся к умеренно токсичным, а по классификации Сидорова – к мало- и практически не токсичным соединениям.

Ключевые слова: функционально замещенные оксазолы, азотсодержащие бисфосфонаты, QSAR модели, антикандидозная активность, клетки крови, токсичность.

ANNOTATION

Kopernyk I.M. Prediction and evaluation of antimycotic activity of new azoles and bisphosphonates. – Manuscript.

Dissertation for Scientific Degree of Candidate of Biological Science on specialty 02.00.10 – Bioorganic chemistry – Institute Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Science of Ukraine – Kyiv, 2014.

The dissertation dedicated to creation of low-toxicity effective inhibitors of *Candida albicans* growth. For prediction antimycotic activity of functional substituted oxazoles and nitrogen-containing bisphosphonates were developed QSAR-models. It was conducted a wide range of biological studies of leading compounds.

We established antifungal properties of compounds against standard and resistant strains of *Candida albicans*. Compounds with high antimycotic activity were recommended as potential anti-candidal agents.

Was found interrelation between chemical constitution and anti-candida level of functional substituted oxazoles and nitrogen-containing bisphosphonates.

Hypothesis about molecular action mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates was based on experimental dependences between fungistatic activity of compounds and its ability to inhibit farnesyl diphosphate synthase.

Was defined influence of recommended compounds on physiological state of human blood cells.

Was found the tested compounds have moderately and low toxicity.

Keywords: functional substituted oxazoles, nitrogen-containing bisphosphonates, anti-candidal activity, blood cells, toxicity.