

БИОТЕСТИРОВАНИЕ β -ТРИКЕТОНОВ ТИОФЕНОВОГО РЯДА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКОГО И АНТИПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ДЕЙСТВИЯ

Г.Н. Рахуба, С.В. Кучуро, Н.М. Литвинко, Д.Б. Рубинов, Т.А. Желдакова

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
nata@presidium.bas-net.by*

Известно, что нежелательное увеличение активности низкомолекулярной фосфолипазы A_2 (ΦLA_2 , К.Ф. 3.1.1.4) поджелудочной железы наблюдается при течении острого панкреатита, что приводит в критических случаях к развитию тяжелого некроза с летальным исходом [1]. Гемолиз эритроцитов при воздействии ядов змей на организм млекопитающих также связан с функционированием ΦLA_2 . Это свидетельствует об актуальности изучения на основе исследования липолитических реакций эффекторных свойств соединений различного химического строения, в том числе и производных тиотетроновой кислоты, поскольку природные антибиотики тиолактомицин и тиотетрамицин имеют структуру 3,5-дизамещённых тиофендионов. Открываются широкие перспективы для сознательного поиска ингибиторов фосфолипаз с антигемолитическими и антипанкреатическими свойствами. Биотестирование *in vitro* обеспечивает экспериментальную основу для выявления таких ингибиторов с заданными свойствами, а также для установления закономерностей функционирования ΦLA_2 на уровне клетки и целого организма.

По нашим предварительным данным ряд 3,5-дизамещённых производных тиотетроновой кислоты (ТТК 1-10) существенно ингибирует активность секреторных фосфолипаз A_2 [2]. Наибольший ингибиторный эффект в условиях геля-диффузии проявили дихлорзамещённое производное ТТК-05 и не содержащее непредельных связей в алкилбензильном радикале ТТК-03. Целью настоящей работы является биотестирование потенциального ингибирующего действия других синтезированных *de novo* 3,5-функционализированных производных β -трикетонотифенового ряда ТК 11-13, аналогов метаболитов полиненасыщенных жирных кислот, на активность ΦLA_2 поджелудочной железы свиньи и ΦLA_2 яда змеи *Naja naja oxiana*.

Биотестирование β -трикетонотифенового ряда как потенциальных эффекторов ΦLA_2 проводили с использованием модификации экспрессного метода диффузии фермента в тонком слое агарозного геля с включением в него эритроцитов в качестве субстрата для исследования ΦLA_2 яда змеи *Naja naja oxiana* или желтковой эмульсии в случае ΦLA_2 поджелудочной железы свиньи [3]. Чувствительность данного метода составляет 1-2 мкг фермента на пробу. Интактные эритроциты получали из цельной крови человека. Желтковую эмульсию готовили из желтков куриного яйца.

Для приготовления геля использовали 0,05М веронал-ацетатный буфер pH 7,5, содержащий 0,8% агарозы и 1,6 мМ $CaCl_2$, который прогревали на кипящей водяной бане в течение 25 мин, затем охлаждали до 50°C и смешивали с подогретым до 48°C 0,05 М веронал-ацетатным буфером pH 7,5, содержащим 27% эритроцитов или 5 мл желтковой эмульсии. Полученную смесь заливали в нагретые до 48°-50°C чашки Петри. Высота слоя геля в чашках Петри составляла 1 мм. После охлаждения в геле проделывали штампом отверстия диаметром 4 мм и объёмом 12,5 мкл для внесения фермента. Водный раствор ΦLA_2 (10 мкг на пробу) преинкубировали 2 часа при комнатной температуре с раствором β -трикетонотифенового ряда в диметилсульфоксиде (5 мкг на пробу). 12 мкл полученного раствора вносили в

вырезанную в геле лунку. Чашки преинкубировали 18 часов при 4°C, а затем в течение 5 ч при 37°C, со снятием замеров площади зоны лизиса через 2 ч и 5 ч. Измерение диаметра зоны лизиса производили с помощью измерительной лупы с ценой деления 0,1 мм.

При диффузии ΦLA_2 в гель происходило просветление зоны вокруг места нанесения фермента за счёт повреждения эритроцитарной мембраны и выхода гемоглобина из клетки или за счёт выделения лизофосфолипидов и коагуляции яичного желтка, что позволяло визуально фиксировать протекание гидролиза фосфолипидов. Уменьшение площади зоны просветления в геле после преинкубации ΦLA_2 с испытуемым веществом свидетельствует об ингибирующем действии данного вещества на активность фермента. Мерой остаточной активности фермента в присутствии ингибиторов и других компонентов системы служит относительное уменьшение площади зоны просветления ($S/S_0 = R^2 - r^2 / R_0^2 - r^2$, где R , R_0 – радиусы зон в присутствии исследуемого и без него, а r – радиус лунки).

В таблице представлены полученные результаты, которые свидетельствуют об ингибиторном воздействии на активность обеих ΦLA_2 – изучаемых веществ ТК-11 и ТК-13.

Таблица. – Относительное уменьшение площади зоны просветления при диффузии ΦLA_2 в гель, содержащий субстрат, после преинкубации с производными β -трикетонов тиюфенового ряда

Шифр веществ	S/S_0 , %	
	ΦLA_2 <i>Naja naja oxiana</i> .	ΦLA_2 поджелудочной железы свиньи
ТК-11	100	90,5 ± 4,5
ТК-12	104	96 ± 2,7
ТК-13	88	82 ± 2,4

Следует отметить, что проведение ингибиторного анализа полуколичественным методом гель-диффузии не даёт возможности для выведения строгих закономерностей между структурой β -трикетонов тиюфенового ряда и их ингибиторным эффектом. Однако по полученным результатам можно дать прогнозную оценку ингибиторного действия исследуемых соединений, в частности перспективности хлораминопроизводного (ТК-13) в качестве потенциального антипанкреатического и антигемолитического средства со смягченным спектром действия.

ЛИТЕРАТУРА

4. Nevalainen, T. Y. (1988) *Scand. J. Gastroenterol.*, **23**, 897—904.
5. Кучуро С.В., Рахуба Г.Н., Рубинов Д.Б., Желдакова Т.А., Литвинко Н.М. // Матер. Междунар. конф. "Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии". - Минск, 2004. - С. 211- 213.
6. Пат. №5752 РБ, МПК// Способ определения эффекторных свойств физиологически активных соединений/ Н.М.Литвинко, С.В.Кучуро, Т.А.Желдакова, Е.Р.Филич (РБ); зарегистрировано 07.08.2003.