

**ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ
ім. В.П. КУХАРЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ**

**БІОАКТИВНІ СПОЛУКИ,
НОВІ РЕЧОВИНИ
І МАТЕРІАЛИ**

**За загальною редакцією
А.І. Вовка**

**Київ
Інтерсервіс
2022**

УДК 547.783+547.869.1+547.284+546.185+541.64+544.423+665.372+
662.73+66.092+615.28

Біоактивні сполуки, нові речовини і матеріали / За загальною ред.
А.І. Вовка – Київ: Інтерсервіс, 2022. - 328 с.

У книзі представлено роботи співробітників Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, а також науковців інших інститутів та університетів за матеріалами XXXVII наукової конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії (16 червня 2022 р., м. Київ). Виклад наукових статей об'єднано в два розділи, що присвячені синтезу і дослідженню біоактивних сполук, а також вивченню нових речовин і матеріалів та їх застосуванню. У першому розділі обговорюються питання синтезу, структури, реакційної здатності і біологічної активності органічних сполук. Окрему увагу приділено *in silico* моделюванню властивостей потенційно біоактивних сполук, вивченню механізмів дії синтетичних і природних біорегуляторів та з'ясуванню зв'язку між структурою і активністю нових речовин. У другому розділі представлено результати теоретичних досліджень і практичних наукових розробок, що стосуються паливних і мастильних матеріалів, каталізаторів для нафтохімії, нових полімерних композицій, потенційних сорбентів тощо. Книга розрахована на широке коло фахівців у галузі біоорганічної хімії, органічної хімії, нафтохімії, хімії високомолекулярних сполук, а також аспірантів і студентів.

Рецензенти

Доктор хімічних наук І.І. Герус
Доктор біол. наук Л.О. Метелиця

ISBN ІБОНХ ім. В.П. Кухаря НАН України, 2022

РОЗРОБКА ТРИПТАНТРИН/ЛІЗОЦИМВМІСНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ДІЇ

Декіна С.С., Карпенко О.С., Корнілов О.Ю., Чекал С.І.,
Шестеренко Є.А., Шестеренко Ю.А., Валіводзь І.П., Муратов В.Н.
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України
svitlana.dekina@gmail.com

З метою пошуку ефективних засобів лікування та профілактики найбільш поширених захворювань із запальною компонентою було розроблено комплексний гель на основі карбополу з похідними триптантрину і лізоциму. В рамках роботи були синтезовані похідні триптантрину (**1a**, **1b**) і оксими похідних триптантрину (**2a**, **2b**). Показано, що лізоцим повністю зберігає гідролітичну активність в досліджених умовах у присутності **1a-b** та **2a-b**. Досліджені умови включення і розроблено рецептуру гелю на основі карбополу з іммобілізованим лізоцимом та похідними триптантрину.

Ключові слова: похідні триптантрину, лізоцим, карбопол, гель.

In order to find effective means of treating and preventing the most common diseases with an inflammatory component, the possibility of creating a complex gel based on carbopol with tryptanthrin and lysozyme derivatives was studied. Derivatives of tryptanthrin (**1a**, **1b**) and their oximes (**2a**, **2b**) have been synthesized. It was shown that lysozyme completely retains its hydrolytic activity under the studied conditions in the presence of **1a-b** and **2a-b**. The entrapment conditions were studied and a gel formulation based on carbopol with immobilized lysozyme and tryptanthrin derivatives was developed.

Keywords: tryptanthrin derivatives, lysozyme, carbopol, gel.

Проблема пошуку і розробки ефективних засобів лікування та профілактики найбільш поширених захворювань із запальною компонентою є актуальним напрямом досліджень сучасної біоорганічної хімії та біотехнології. У коло фармакологічно перспективних речовин входять похідні триптантрину, що становлять інтерес як протизапальні агенти, які блокують активність протеїнкіназ сімейства JNK та COX. Аналіз даних літератури свідчить про наявність високого терапевтичного потенціалу як природних хіназолінових алкалоїдів – триптантринів, так і нових синтетичних похідних [1–3]. До природних антибіотиків належить лізоцим (КФ 3.2.1.17) – гідролітичний ензим, відомий антимікробною, протизапальною, імуномодулюючою дією [4, 5]. Тому пошук і створення

нових потенційних препаратів протизапальної і антибактеріальної дії з використанням біологічно активних сполук є пріоритетним напрямом досліджень.

Метою даної роботи є дослідження біологічної сумісності лізоциму і похідних триптантрину та розробка нового триптантрин/лізоцимвмісного геля на основі карбополу для його подальшого вивчення і потенційного застосування в фармакології, медицині, фармації.

У роботі використовували лізоцим ячного білка (КФ 3.2.1.17) (М.м. 14,4 кДа, 40000 од/мг, «Sigma-Aldrich», Німеччина), клітини *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma-Aldrich», Німеччина), Carbopol® 940 полімер (Lubrizol Corporation, США).

Синтез похідних триптантрину (**1a**, **1b**) конденсацією заміщених ізатинів із ізатовим ангідридом, а також їхнє перетворення в оксими було проведено за відомими методиками [6, 7] та представлено на рис. 1.

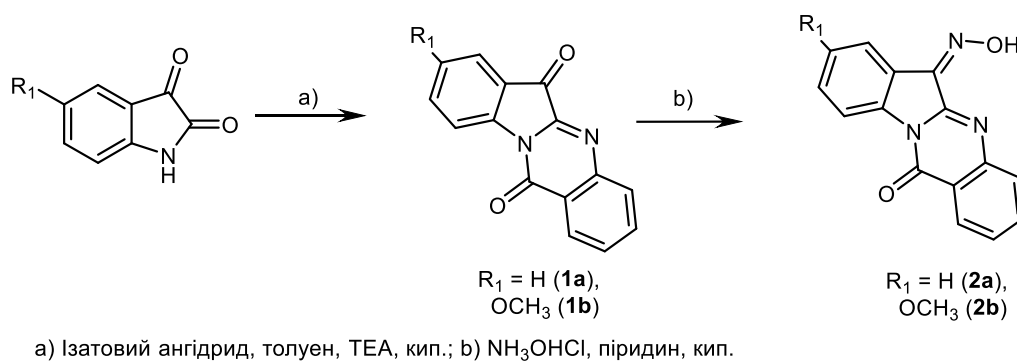


Рис. 1

Структуру синтезованих сполук доводили методами ЯМР-спектроскопії та мас-спектромерії, чистоту оцінювали тонкошаровою хроматографією та ВЕРХ.

Активність лізоциму (LYS) визначали бактеріолітичним методом в буферному К-фосфатному розчині ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, рН 6,2; 0,1 моль/дм³), використовуючи як субстрат клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665 (1 мг/см³) [8]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що знижує оптичну щільність суспензії клітин на 0,001 за 1 хв при 25 °С. Активність вільного лізоциму приймали за 100 %.

Імобілізацію лізоциму сумісно з триптантринами здійснювали методом включення в гель. Гель Carbopol® 940 готували в кінцевій концентрації 1,85 %, використовуючи як нейтралізуючий агент водний розчин амміака, після чого (рН 6,0) залишали на 12 годин для стабілізації. В приготований карбопол вносили розчин лізоциму (кінцева концентрація ензиму 0,5 %), триптантриноксим (або інші похідні) в 1 см³ дистильованої

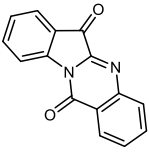
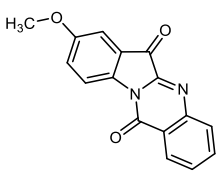
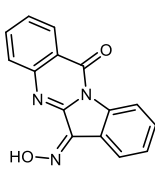
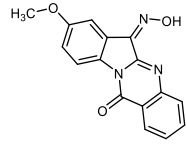
води і ретельно перемішували. З метою посилення антимікробної активності додавали біглюконат хлоргексидину (кінцева концентрація 0,05 %).

Дані експериментів піддавали статистичній обробці згідно [9]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень між серіями експериментів при кількості повторень $n=5$, і відносно вихідної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму).

Триптантрин, 8-метокситриптантрин (**1b**) та їх оксими (**2a-b**) були синтезовані у кількостях до 1 г. З даних літератури відомо, що перший представник цього класу речовин, триптантин, чинить протизапальну, ранозагоюючу дію у концентрації 1,5–2,5 г/дм³ [1], що обумовило вибір кількості похідних триптантринів для попередніх досліджень їх впливу на гідролітичну активність лізоциму (табл. 1).

Таблиця 1

Гідролітична активність лізоциму у присутності похідних триптантрину

Похідні триптантрину	 Indolo[2,1- <i>b</i>]quinazoline-6,12-dione	 8-Methoxy-indolo[2,1- <i>b</i>]quinazoline-6,12-dione	 Indolo[2,1- <i>b</i>]quinazoline-6,12-dione-6-oxime	 8-Methoxy-indolo[2,1- <i>b</i>]quinazoline-6,12-dione-6-oxime
Гідролітична активність лізоциму, од/мг (% від макс.)	39120±1410 (*P < 0,005, **P>0,05) (97,8)	38580±1560 (*P < 0,005, **P>0,05) (96,5)	38230±1850 (*P < 0,005, **P>0,05) (95,9)	38570 ±2030 (*P < 0,005, **P>0,05) (97,46)

Умови: час витримування 30 хв, температура 25 °С, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, рН 6,2; 0,1 моль/дм³. Вихідна гідролітична активність лізоциму 40000 од/мг ензиму. Масове співвідношення LYS/Tr 1:0,3. *Ймовірність відмінностей між серіями експериментів при $n=5$; **відносно максимальної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму)

Показано, що активність лізоциму достовірно не змінюється у присутності похідних триптантринів у зазначених умовах.

У гелях карбополу велику роль модифікації реології у водних системах грає регулювання рН. Загущення полімеру відбувається після його нейтралізації лугом. При цьому максимальна в'язкість досягається при нейтральному середовищі рН 6,0–7,0 [10]. Зазвичай використовують гідроксид натрію, калію, амонію, триетаноламін або амінометилпропанол [11]. Для нейтралізації гелю обрали 28 % розчин гідроксиду амонію. Так, рН гелю карбопола без додавання розчину NH₄OH 3,8–4,0, тоді як після нейтралізації 6,0±0,5.

Ряд композицій гелю з лізоцимом, триптантин-оксимом (Indolo[2,1-*b*]quinazoline-6,12-dione-6-oxime, **1a**), що обрали як модельний триптантрин у масовому співвідношенні 1:0,3, і різними концентраціями карбополу, наведені у табл. 2. Обираючи діапазон концентрацій носія, який досліджувався, керувалися даними літератури, оскільки карбопол – поширена основа для розробки і створення якісних терапевтичних і косметичних продуктів [10].

Таблиця 2

Композиції гелю на основі карбополу (% w/w)

Інгредієнти	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
LYS	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Tr-oxim	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Хлоргексидину біглюконат	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Гліцерин	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Пропіленгліколь	–	–	–	5	10	15	20	20	20
Карбопол 940	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	1,85	2,0	3,0
Очищена вода до	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Композиції F1 та F2 гель не утворювали, F3–F5 характеризувалися задовільним гелеутворенням, однак ензим не повністю включався в карбопол, візуально гель був неоднорідний. Гель F6 після приготування візуально задовольняв усім вимогам, зберігаючи форму, однак за півгодини спостерігалася проблема розрідження. Композиції F7 і F8 утворювали задовільні гелі і після стабілізації впродовж 12 годин. Композиція F9 при перемішуванні мала погану консистенцію, була дуже густою, утворювала грудки, некомфортно липкою і не розподілялася належним чином. В результаті з оптимальною композицією було обрано гель F7.

Необхідно зазначити, що зазвичай компоненти в карбопол вводять до нейтралізації, оскільки в'язкість розчину полімеру значно нижча за таку геля. Однак у випадку з ензимами, які чутливі до кислих значень рН, це неможливо, оскільки приводить до значної втрати активності. Так активність лізоциму, введеного у карбопол при рН 3,8–4,0 становила 8600 од/мг ензиму (20 % від вихідної), тоді як після нейтралізації 88 % активності.

Таким чином, на першому етапі роботи були синтезовані похідні триптантрину: індоло[2,1-*b*]хіназолін-6,12-діон, 8-метоксиіндоло[2,1-

b]хіназолін-6,12-діон, індоло[2,1-*b*]хіназолін-6,12-діон-6-оксим, 8-метокси-індоло[2,1-*b*]хіназолін-6,12-діон 6-оксим **1a-b** та **2a-b**. Показано, що активність лізоцима не інгібується зазначеними сполуками у відповідних умовах. У результаті серії експериментів підібрана формула гелю (F7) для подальших біохімічних і біологічних досліджень.

Робота виконується за грантом НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України у 2022 р. від 01.03.2022 № 23/02-2022(4) «Нові похідні триптантринів у композитних матеріалах з лізоцимом як перспективні протизапальні і антимікробні засоби».

Література

1. Kaur R., Manjal S.K., Rawal R.K., Kumar K. Recent synthetic and medicinal perspectives of tryptanthrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 25, N 17. P. 4533–4552.
2. Schepetkin I.A., Khlebnikov A.I., Potapov A.S. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-one derivatives and tryptanthrin-6-oxime as c-Jun N-terminal kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 161. P. 179–191.
3. Kaura R., Kumar K. Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. Vol. 215, N 5. P. 113220.
4. Leśniewski G., Yang T. Lysozyme and its modified forms: A critical appraisal of selected properties and potential. *Trends in Food Science & Technology*. 2021. Vol. 107. P. 333–342.
5. Osserman E. Lysozyme. Elsevier, 2012. 670 p.
6. Bergman J. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* aubl. *Tetrahedron*. 1985. Vol. 41, N 14. P. 2879–2881.
7. Klioze S.S., Ehrgott Jr. F.J., Glamkowski E.J. Synthesis of 7-substituted 1*H*-indolo[3,2-*d*][1,2]benzoxazepines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1984. Vol. 21, N 5. P. 1257–1259.
8. Protocol Merck company of lysozyme activity assays <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/technical-documents/enzymatic-assay-of-lysozyme>
9. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион, 2000. 320 с.
10. Islam M.T., Rodríguez-Hornedo N., Ciotti S., Ackermann C. Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceutical Research*. 2004. Vol. 21, N 7. P. 1192–1199.
11. Vargas P.R., Costa C.M., Fonseca B.S., Naccache M.F., de Souza Mendes P.R. Rheological Characterization of Carbopol® Dispersions in Water and in Water/Glycerol Solutions. *Fluids*. 2019. Vol. 4, N 1. P. 3–24.