

УДК 616.24:547.823/.824:546.171.5:544.165

**Л.В. Гайова, Н.І. Шарикіна, Л.С. Бобкова, В.М. Овруцький, О.В. Овруцький,
О.А. Журило, Ж.Є. В'ялих**

**ГАЛЬМУВАННЯ РОСТУ КУЛЬТУРИ МІКОБАКТЕРІЇ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ІЗОНІАЗИДОМ,
ВІТАМІНОМ В₆ ТА ПІРИДОКСАЛЬФОСФАТОМ В ДОСЛІДАХ IN VITRO.
ЗВ'ЯЗОК "СТРУКТУРА - АКТИВНІСТЬ" З ВИКОРИСТАННЯМ
КВАНТОВО-ХІМІЧНИХ РОЗРАХУНКІВ**

*Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця
Інститут фармакології та токсикології АМН України
Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України*

Розвиток комп'ютерної техніки, молекулярної біології і молекулярної фармакології привів до нової концепції створення ліків нового покоління — раціональному комп'ютерному конструюванню лікарських препаратів. В основі її лежать комп'ютерний аналіз взаємозв'язку біологічної активності БАР з властивостями їх молекул. Один із напрямків комп'ютерного аналізу базується на методі, що став класичним, а саме на вивченні співвідношення "структура — активність" (КССА). Одержувана при цьому інформація особливо важлива для пошуку принципово нових моделей майбутніх ліків нового покоління [1–4, 7–9].

Широке поширення захворювань туберкульозом, яке в Україні за останнє десятиліття збільшилось майже вдвічі, викликає необхідність активного і цілеспрямованого пошуку нових засобів і схем лікування. В зв'язку з цим доцільно вивчати різні аспекти фармакологічної активності БАР, як принципово нових, так і відомих препаратів за новим призначенням [1, 7–9, 11].

Серед протитуберкульозних препаратів ізоніазид відрізняється від інших здатністю проявляти не тільки бактеріостатичну, але і бактерицидну дію. Саме структурні особливості молекули ізоніазиду є принципово важливими і використовуються як відповідальні за протитуберкульозну дію при прогнозуванні активності різних сполук в рамках логіко-структурного методу [8]. До них належать наступні дескрипторні ознаки: оксогрупа (=O), атом вуглецю (1C) між гетероатомами (α -гетероатоми), γ -гетероатоми, кількість спряжених систем тощо.

Мета досліджень полягала у спробі здійснити прогнозування протитуберкульозної активності препаратів піридоксину та піридоксальфосфату у порівнянні з ізоніазидом та проведенні мікробіологічних скринінгових досліджень щодо їх здатності пригнічувати ріст *Mycobacterium tuberculosis*.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були препарати ПІРИДОКСИН ГІДРОХЛОРИД, ПІРИДОКСАЛЬФОСФАТ, АМІЗОН у порівнянні з ІЗОНІАЗИДОМ.

Метод для прогнозування вибраний на основі логіко-комбінаторного підходу з використанням дескрипторних підструктур аналогів відомих протитуберкульозних препаратів ІЗОНІАЗИДУ (1), ФТИВАЗИДУ (2), САЛЮЗИДУ (3), ПРОТІОНАМІДУ (4), пара-

АМІНОСАЛІЦИЛАТУ НАТРІЮ (5) та антибіотику РИФАМІЦИНУ SV (6), серед яких основним є ІЗОНІАЗИД [8].

Туберкулостатичну активність ПІРИДОКСИНУ ГІДРОХЛОРИДУ (7), ПІРИДОКСАЛЬФОСФАТУ (8) у порівнянні з ІЗОНІАЗИДОМ, їх сполучень — ІЗОНІАЗИД+ПІРИДОКСИН ГІДРОХЛОРИД (9), ІЗОНІАЗИД+ПІРИДОКСАЛЬФОСФАТ (11) вивчали на мікобактеріях туберкульозу людського типу штаму H₃₇Rv. Досліди проводили in vitro за загальприйнятою мікробіологічною методикою [5,6,10,13–15]. Використовували рідке живильне середовище Проскауера-Бека із вмістом нормальної кінської сироватки 10 %. Бактеріостатичну активність вивчали у такому діапазоні концентрацій: для піридоксину гідрохлориду від 0,01 до 50; піридоксальфосфату — від 0,007 до 62,5; та сполучень ізоніазид/піридоксин гідрохлорид 0,03/50, 0,015/25, 0,007/12,5, 0,0035/6,2, 0,0015/3,1; ізоніазид/піридоксальфосфат 0,03/62,5, 0,015/31, 0,007/15, 0,0035/7,8, 0,0017/3,9. Бактеріостатичний ефект оцінювали за затримкою росту півки мікобактерій туберкульозу.

Особливості будови піридоксину, піридоксальфосфату ізоніазиду (а саме: розподіл електронної щільності, енергії вищої зайнятої (ВЗМО) і нижчої вільної (НСМО) молекулярних орбіталей, конформаційні властивості (об'єм молекул), дипольний момент, а також інші молекулярні енергетичні параметри) вивчені напівемпіричним методом квантової хімії по алгоритму Паризера-Парра-Попла (ППП) РМ3.

Залежність величини концентрації, яка визначає гальмування росту культури мікобактерій туберкульозу людського типу штаму H₃₇Rv на 25 % (відповідне позначення один плюс +) від значень молекулярних характеристик піридоксину, піридоксальфосфату, ізоніазиду визначали за програмою для ПК "Statistica" [2].

Результати дослідження та їх обговорення

І. Прогнозування протитуберкульозної активності піридоксину та піридоксальфосфату за дескрипторними підструктурами, які вилучені при аналізі протитуберкульозних препаратів, серед яких основним є ізоніазид.

На першому етапі визначали рівень подібності сполук на основі виділення фрагментів хімічних структур препаратів, спільних для структур кількох сполук-аналогів. В даному випадку аналоги — це сполуки, у яких виявляється хоча б одна ознака активності, яка є характерною для структури аналізованої сполуки. В якості структурних ознак, що вказують на протитуберкульозну активність, у структурах аналогів 1–6 були виділені наступні фрагменти: Hetar-Hetar (гетероатоми, безпо-

Таблиця 1

Прогнозування протитуберкульозної активності піридоксину та піридоксальфосфату з використанням логіко-комбінаторного підходу за підструктурами, відповідальними за протитуберкульозну активність

Препарат	Дескрипторні ознаки активності та їх кількість в молекулі препарат						
	Hetar-Hetar	Alpha-Hetar	Delta-Hetar	К-сть спряжених систем	=O	=N	К-сть ознак для препарату
Ізоніазид 1	1	1	1	1	1	1	6
Фтивазид 2	1	1	2	2	1	2	9
Салюзид 3	1	1	2	2	2	2	10
Протіонамід 4	0	1	1	1	1	1	5
Парааміносаліцилат натрію 5	0	1	0	1	1	0	3
Рифаміцин SV 6	0	3	1	2	3	0	9
Піридоксин 7	0	0	2	1	0	1	4
Піридоксальфосфат 8	1	0	2	1	2	1	7
К-сть сполук з даним дескриптором	4	6	7	8	7	7	-

середньо сполучені хімічним зв'язком, напр., N–N), Alpha-Hetar (атом вуглецю між гетероатомами, напр., O=αC–NH–), Delta-Hetar (напр., N–αC–βC–γC–δC=O) =O, =N.

Далі за виявленою множиною подібних дескрипторів для піридоксальфосфату та піридоксину було здійснено прогнозування їх протитуберкульозної активності, яка була невідомою. В табл. 1 наведені кількості дескрипторних ознак протитуберкульозної активності для сполук 1–8.

Так, ізоніазид має 6 структурних ознак протитуберкульозної активності. За даними літератури, протитуберкульозна активність сполук може бути спрогнозована за дескрипторними ознаками, характерними для структури ізоніазиду. Наступні три ознаки: Delta-Hetar, кількість спряжених систем та =O, — характеризують прогноз протитуберкульозної активності з коефіцієнтом довіри 0,28 [8]. За сукупністю структурних

гідрохлориду, піридоксальфосфату та амізону в порівнянні з такою для ізоніазиду.

Результати досліджень МІК препаратів піридоксину гідрохлориду (7), піридоксальфосфату (8) у порівнянні з ізоніазидом (1) та сполучень цих препаратів з ізоніазидом (9,10) наведені в табл. 2.

За даними табл. 2 препарати піридоксин (7) та піридоксинфосфат (8) проявляють антимікобактеріальну активність, але вона характеризується як слабка. Ізоніазид має МІК 0,03 мкг/мл, тоді як МІК піридоксальфосфату 62,5 мкг/мл, а для піридоксину гідрохлориду спостерігається затримка росту мікобактерій на 25 % при концентрації 50 мкг/мл.

IIб. Бактеріостатична дія сполучень препаратів.

Результати дії різних концентрацій сполучень препаратів на штам H₃₇Rv мікобактерій туберкульозу наведені в табл. 3. Початкові концентрації у даних сполученнях дорівнюють МІК кожного з препаратів. Початкові

Таблиця 2

Дослідження МІК препаратів по відношенню до штаму H₃₇Rv мікобактерій туберкульозу (МБТ)

Препарат	Концентрації препарату у досліді, мкг/мл та дія на ріст МБТ													
Піридоксаль г/х (7)	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	Контроль
	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Піридоксаль фосфат (8)	62,5	31	15	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	Контроль
	-	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Ізоніазид (1)	5,0	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,007	0,0035	0,00175	0,00085	0,00042	Контроль
	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

ознак активності та за вище зазначеними трьома структурними ознаками можна очікувати певного прояву протитуберкульозної активності досліджуваними сполуками — піридоксальфосфатом піридоксином з коефіцієнтом довір'я 0,28.

II. Визначення антимікобактеріальної активності.

Для дослідження мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) препаратів по відношенню до мікобактерій туберкульозу (МБТ) використовували лабораторний штам H₃₇Rv. Дослідження проводили на рідкому живильному середовищі Проскауера-Бека, що містить 10 % нормальної кінської сироватки.

IIa. Бактеріостатична дія препаратів піридоксин

концентрації для сполучення піридоксину гідрохлориду з ізоніазидом були 50 і 0,03 мкг/мл відповідно.

Таблиця 3

Результати дії різних концентрацій сполучень препаратів на штам H₃₇Rv мікобактерій туберкульозу (МБТ)

Сполучення препаратів	Концентрації препарату у досліді, мкг/мл та дія на ріст МБТ					
Піридоксин гідрохлорид/ ізоніазид (10)	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6
	++	+++	++++	++++	++++	++++
Піридоксаль фосфат/ізоніазид (11)	62,5	31	15	7,8	3,9	2,0
	-	++	++++	++++	++++	++++

За даними табл. 3 сполучення препаратів піридоксину гідрохлориду з ізоніазидом та піридоксальфосфату з ізоніазидом значно перевищують МІК окремо взятих препаратів. Для сполучення піридоксину гідрохлориду з ізоніазидом інгібуючими були концентрації 6,2 та 0,0035 мкг/мл відповідно, а для сполучення піридоксальфосфату з ізоніазидом — концентрації 7,8 і 0,0035 мкг/мл відповідно.

Отже, інгібуюча концентрація піридоксину гідрохлориду у сполученні з ізоніазидом перевищувала МІК цього препарату у 8 разів, а інгібуючу концентрацію ізоніазиду у 10 разів. Для сполучення піридоксальфосфату з ізоніазидом інгібуючі концентрації підвищувались у 8,6 та 10 разів відповідно.

Біологічні дослідження вказують на синергичну дію цих препаратів.

III. Наступний крок дослідження полягав у проведенні аналізу зв'язку "структура — активність". В табл. 4 наведені кількісні характеристики молекул піридоксину, піридоксальфосфату та ізоніазиду, отримані за результатами квантово-хімічних розрахунків. Формалізація даних біологічного експерименту полягала у використанні в розрахунках значень концентрацій кожного з препаратів, при яких має місце гальмування росту культури на 25 %, а саме такий ряд чисел: 0,015 (1), 31 (8), 50 (7) мкг/мл. За даними характеристиками структури молекул та активності визначені коефіцієнти парної кореляції (К кор.).

За даними табл. 4 простежується тенденція кореляції протитуберкульозної активності з такими характеристиками молекулярної структури відповідного препарату, як електронегативність, енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі, енергія нижньої вільної молекулярної орбіталі, величина заряду на 4С ядра піридину та величина заряду на атомі вуглецю оксо- чи гідроксиметиленовій групах та молекулярний об'єм тощо.

Висновки

1. Здійснена спроба прогнозування протитуберкульозної активності препаратів піридоксину та піридоксальфосфату у порівнянні з ізоніазидом. За виявленою множиною подібних дескрипторів для піридоксальфосфату та піридоксину було здійснено прогнозування їх протитуберкульозної активності, яка раніше була невідомою.

Таблиця 4

Електронні та енергетичні характеристики молекул піридоксальфосфату, піридоксину, ізоніазиду. Залежність величини концентрації гальмування росту культури МБТ від молекулярних характеристик (коефіцієнт кореляції, К кор.)

				К НБП (25%)
	-2350,88	-2743,4	-1771,32	0,70
	-9,46	-9,34	-9,98	0,85
	-0,427	-0,911358	-0,883	0,75
	4,95	5,13	5,43	-0,99998
	0,117	0,351	0,276	-0,56
	-0,169	-0,268	-0,102	-0,52
	94,75	179,05	51,45	0,46

2. Проведенні мікробіологічні скринінгові дослідження здатності препаратів піридоксину та піридоксальфосфату пригнічувати ріст *Mycobacterium tuberculosis*. Встановлено, що МІК піридоксальфосфату становить 62,5 мкг/мл, а для піридоксину гідрохлориду спостерігалась затримка росту МБТ на 25 % при його концентрації 50 мкг/мл (ізоніазид має МІК 0,03 мкг/мл).

3. Біологічні дослідження вказують на синергичну дію сполучень препаратів. Показано, що інгібуюча концентрація піридоксину гідрохлориду у сполученні з ізоніазидом перевищувала МІК цього препарату у 8 разів, а інгібуючу концентрацію ізоніазиду у 10 разів. Для сполучення піридоксальфосфату з ізоніазидом інгібуючі концентрації підвищувались у 8,6 та 10 разів відповідно.

4. Простежується тенденція кореляції протитуберкульозної активності з такими характеристиками молекулярної структури відповідного препарату, як електронегативність, енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі, енергія нижньої вільної молекулярної орбіталі, величина заряду на 4С ядра піридину, величина заряду на атомі вуглецю оксо- чи гідроксиметиленовій групах та молекулярний об'єм тощо.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Антитуберкульозна активність 4,5-заміщених 1,3-тіазолідону-2 та кореляція структури — дії* / Н.Є. Штойко, Б.С. Зіменковський, І.Г. Льницький та ін. // Фармац. журн. — 2001. — № 2. — С. 84–89.
2. *Боровиков В.П., Боровиков И.П. Statistica — Статистический анализ и обработка данных в среде Windows.* — Москва: Информ.-издат.дом Филін, 1997. — 608 с.
3. *Блинова В.Г., Харчевникова Н.В.* Прогноз токсичности замещенных бензолов с помощью ДСМ-метода автоматического порождения гипотез и квантово-химических расчетов // Хим.фармац. журн. — 2000. — Т.34, №4. — С.44–50.
4. *Исследование связи Структура-активность в ряду аналогов буспирона с применением электронно-топологического подхода* / А.С. Димогло, Ю.М. Чумаков, Ю.А. Симонов и др. // Хим.фармац. журн. — 1998. — Т., №. — С. 36–40.
5. *Калиниченко Н.Ф.* Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций, Харьков, 1991. — С.7–11.
6. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. — Москва: Медицина, 1972. — С. 80.
7. *Розанцев Г.Г., Фроловский В.А., Студнев Ю.Н.* Новый принцип поиска соединений с противосудорожными свойствами. // Хим.фармац. журн. — 1998. — С. 3–9.
8. *Розенблат А.Б. Голендер В.Е.* Примеры прогнозирования активности / Логико-комбинаторные методы в конструировании лекарств. — Рига: Зинатне, 1983. — С. 249–268.
9. *Руководство по медицине. Диагностика и терапия.* / Под ред. Р. Беркоу, Ф. Флетчера. — В 2-х т. — Т.1. — Москва: Мир, 1997. — С.83–94.
10. *Руководство по медицине. Диагностика и терапия* / Под ред. Р. Беркоу, Ф. Флетчера. В 2-х т. — Т.1. — Москва: Мир, 1997. — С. 83–94. (микробиол. исслед-я)
11. *Синтез и изучение противотуберкулезных свойств 2-фторанилидов 1R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот* / И.В. Украинец, Абдель Насер Х.Н. Дакках, С.Г. Таран и др. // Фізіологічно активні речовини. — 2000. — № 1 (29). — С. 18–21.
12. *Синтез и противотуберкулезная активность бензтиазолил-2-амидов 1R-2-оксо-4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот* / И.В. Украинец, П.А. Безуглый, Амжад Абу Шарех, О.В. Горохова, Л.В. Сидоренко // Фізіологічно активні речовини. — 2000. — № 2 (30). — С.23–26.
13. *Фещенко Ю.І., Мельник В.М.* Туберкулез легень в період епідемії: епідеміологічні, клініко-діагностичні, лікувально-профілактичні та організаційні аспекти. — Київ: Логос, 1998. — 284 с.
14. *Collins K.S., Franzblau S.G.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 1997. — Vol. 81. — P. 1004–1009.

15. *Inderlend C.B., Salfinger M.* Antimycobacterial agents and susceptibility tests // *Manual of Clinical Microbiology* / Eds. P.R.Murray, E.J.Baron, M.A.Pfaller, F.S.Tenover, R.H.Yolken. — Washington D.S.: ASM Press, 1995. — P. 1385–1404.

**ГАЛЬМУВАННЯ РОСТУ КУЛЬТУРИ
МКОБАКТЕРІЇ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ІЗОНІАЗИДОМ,
ВІТАМІНОМ B₆ ТА ПІРИДОКСАЛЬОСФАТОМ В ДОСЛІДАХ IN VITRO.
ЗВ'ЯЗОК "СТРУКТУРА–АКТИВНІСТЬ" З
ВИКОРИСТАННЯМ КВАНТОВО-ХІМІЧНИХ
РОЗРАХУНКІВ**

*Л.В. Гайова, Н.І. Шарикіна, Л.С. Бобкова,
В.М. Овруцький, О.В. Овруцький,
О.А. Журило, Ж.Є. Вяхіх*

Резюме

Здійснена спроба прогнозування протитуберкульозної активності препаратів піридоксину та піридоксальфосфату у порівнянні із ізоніазидом. Проведені мікробіологічні дослідження здатності препаратів піридоксину та піридоксальфосфату гальмувати ріст *Mycobacterium tuberculosis*. Встановлено, що МІК піридоксальфосфату становить 62,5 мкг/мл, а для піридоксину гідрохлориду затримка росту МБТ на 25 % спостерігалась при його концентрації 50 мкг/мл (МІК ізоніазиду становить 0,03 мкг/мл). Біологічні дослідження свідчать на синергічну дію сполучень препаратів. Вказано, що концентрація інгібування МБТ піридоксином гідрохлоридом у сполученні із ізоніазидом перевищувала МІК окремо діючого піридоксин гідрохлориду у 8 разів, а окремо діючого ізоніазиду — у 10 разів. Для сполученого застосування піридоксальфосфату із ізоніазидом інгібіруюча концентрація підвищувалась по відношенню до окремо взятого препарату відповідно в 8,6 та 10 раз. Простежується тенденція кореляції протитуберкульозної активності з такими характеристиками молекулярної структури відповідного препарату як електро-

відємність, енергія вищої зайнятої молекулярної орбіта лі, енергія нижньої вільної молекулярної орбіталі, величина заряду на 4С ядра піридину, величина заряду на атомі вуглецю оксо- або гідроксиметиленової групи та молекулярний об'єм.

**THE INHIBITION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CULTURE BY ISONIAZID, VITAMIN B₆ AND PYRIDOXALPHOSPHATE IN VITRO.
"STRUCTURE — ACTIVITY" CORRELATION
WITH APPLICATION OF QUANTUM-CHEMICAL
CALCULATIONS**

*L.V. Gayevaya, N.I. Sharykina,
L.S. Bobkova, V.M. Ovrutskiy,
A.V. Ovrutskiy, O.A. Zhurilo, Zh.E. Vyalykh*

Summary

The attempt of prediction of antituberculous activity of vitamin B₆ and pyridoxalophosphate in comparison with isoniazid was performed. The ability of vitamin B₆ and pyridoxalophosphate to inhibit the grows of *Mycobacterium tuberculosis* culture was studied. It was established, that MIC of pyridoxalophosphate was 62,5 mcg/ml. Vitamin B₆ inhibited the growth of MBT on 25 % at concentrations of 50 mcg/ml (isoniazid MIC — 0,03 mcg/ml). The biological study indicated a synergetic action of drugs combinations. The inhibitory concentration of vitamin B₆ in combination with isoniazid exceeded the MIC of separately administered vitamin B₆ in 8 times and isoniazid — in 10 times. For combination of pyridoxalophosphate with isoniazid the inhibiting concentrations increased a by 8,6 and 10 times, accordingly, in comparison with their separate administration. The antituberculous activity of these medications correlated with the following molecular properties, such as electronegativity, energy of the highest held molecular orbital, energy of the lower free molecular orbital, value of a charge on 4C core of pyridine, value of a charge on Carbon atom of oxo- or hydroxymethylen- groups and molecular volume.