

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*На правах рукопису*

ВАСИЛЕНКО  
Лілія Семенівна

**ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ СИНТЕТИЧНИХ  
ПОРФІРИНІВ ТА ЇХ МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ**

14. 03. 08 — фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Одеса - 1996

АВ 34.47а

Дисертацією є рукопис.  
Робота виконана в Одеському державному університеті  
ім. І.І. Мечникова.

Науковий керівник: - доктор біологічних наук,  
професор, академік АМН України,  
ГОЛОВЕНКО Микола Якович.

Науковий консультант: - кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
ФІЛПОВА Тетяна Олегівна.

Офіційні опоненти: - доктор біологічних наук, професор  
МАРДАШКО Олексій Олексійович,  
- кандидат медичних наук,  
старший науковий співробітник  
ДЕГТЯРЕНКО Тетяна Володимирівна

Провідна установа: Одеський науково - дослідний інститут  
вірусології і епідеміології  
ім. І.І. Мечникова.

Захист відбудеться " 17 " травня 1996 року  
о 15 годині на засіданні Спеціалізованої ради Д 05.04.02 при  
Одеському державному медичному університеті ( 270100, м. Одеса, пров.  
Валіховський, 2).

Автореферат розіслано " 17 " квітня 1996 року.  
З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці університету.

Вчений секретар Спеціалізованої ради  
доктор медичних наук, професор

Л.С. Годлевський

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00740406 (L)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми.

Щодо нинішнього етапу дослідження порфіринів, то він визначається не лише появою досить широкого класу синтетичних порфіринів, але й пошуками шляхів їх практичного застосування. Синтетичні мезозаміщені порфірини та їх металокомплекси є структурними аналогами природних порфіринів. І саме це є підставою для їх дослідження як потенційних біологічно активних речовин.

Відомо, що гематопорфірину (природному порфірину) притаманна властивість інгібувати імунні реакції *in vitro* (Franco et al., 1983), а екзогенні порфірини здатні накопичуватися у лімфоїдній тканині, кістковому мозку та інших швидкопроліферуючих тканинах (Сухін, 1984). Ці дані дозволили зробити припущення, що введені в організм порфірини впливатимуть на імунну систему. Поза цим, важливість вивчення імуотропних властивостей порфіринів визначається їх використанням щодо ракових захворювань, котрі, як правило, супроводжуються порушеннями імунного статусу.

Одними із перспективних фармакологічних засобів щодо лікування гемолітичних анемій різноманітної етіології є синтетичні аналоги гема ( $\text{Sn}^{4+}$ - протопорфірин IX та  $\text{Sn}^{4+}$ - мезопорфірин IX), гіпобілірубінемічний ефект котрих пов'язаний з інгібуванням гемоксигенази - фермента, що відповідає за деградацію гема а, отже, за утворення білірубину в організмі (Drummond, Karras, 1984, 1986; Karras, Drummond, 1984, 1986). Дослідження дії  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП на систему мікосомальних монооксигеназ печінки щурів показало, що  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП індукуює цитохром P-450, інгібує гемоксигеназу та перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) у печінці щурів (Головенко та ін., 1989). Ці дані дали змогу спрогнозувати здатність мезозаміщеного порфірину зменшувати рівень білірубину при гіпербілірубінеміях.

Беручи до уваги високий терапевтичний ефект ряду германійорганічних сполук (нететрапірольної природи) щодо лікування хвороб печінки, зокрема гепатиту, цирозу печінки та жирової дистрофії (Ishikawa et al., 1979; Sasaki et al., 1984; Sato et al., 1976), можна припустити, що серед германієвих комплексів синтетичних порфіринів можна відшукати сполуки з гепатозахисними властивостями.

### Мета й завдання дослідження.

Метою роботи було вивчення широкого спектру біологічної активності синтетичних мезозаміщених порфіринів та їхніх металокомплексів для відшукування нових потенційних фармакологічних засобів, а також з'ясування деяких механізмів їх дії. Згідно з цим вирішувались такі задачі:

1. Імунофармакологічна характеристика синтетичних мезозаміщених порфіринів та їх металокомплексів на моделях гуморального та клітинного імунітету.
2. Вивчити вплив ТМППТ<sub>8</sub> та його металокомплексів на функціональну активність макрофагів.
3. Вивчити ефективність олов'яних комплексів синтетичних порфіринів при гіпербілірубінеміях різного походження.
4. Дослідити вплив олов'яних комплексів синтетичних порфіринів на активність гемоксигенази, а також інтенсивність ПОЛ та вміст цитохрому P-450.
5. Вивчити вплив Ge<sup>4+</sup>-ТФП на функціональний стан печінки при експериментальній інтоксикації CCl<sub>4</sub>.

Наукова новизна роботи полягає у тому, що в ній вперше:

- встановлено, що синтетичні мезозаміщені порфірини та їх металокомплекси (за винятком  $\text{Ge}^{4+}$ -ТМППТ<sub>g</sub>) пригнічують нормальний та послаблений циклофосфаном гуморальний імунітет;

- показано, що синтетичні мезозаміщені порфірини та їх металокомплекси мають як інгібіруючий, так і стимулюючий вплив на клітинно-опосередкований імунітет;

- показано, що характер модуляції залежить як від наявності і природи центрального атома металу, так і від структури замісників в мезо-положеннях тетрапірольного кільця порфірину;

- встановлено, що синтетичні порфірини (ТМППТ<sub>g</sub> та його металокомплекси з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$ ) стимулюють *in vivo* активність лізосомальних ферментів (кислої фосфатази і катепсину Д), не впливаючи на фагоцитарну активність макрофагів та інтенсивність НСТ-тесту;

- серед синтетичних порфіринів виявлені сполуки з протизапальною активністю ( $\text{Cu}^{2+}$ -ТФП і  $\text{Cu}^{2+}$ -ТМППТ<sub>g</sub>);

- досліджено активність олов'яних комплексів синтетичних мезозаміщених порфіринів щодо різних за походженням гіпербілірубінемій (токсичних, індукованих токсикантами з різним механізмом дії та аутоімунних);

- показано, що гіпобілірубінемічний ефект олов'яних комплексів синтетичних мезозаміщених порфіринів пов'язаний з інгібуванням гемоксигенази. Окрім цього, сполуки понижують інтенсивність ПОЛ і стабілізують клітинні мембрани;

- встановлено, що германієвий комплекс тетрафенілпорфірину індукує цитохром Р-450 та залежні від нього монооксигенази, й бло-

кує ПОЛ у мікросомах печінки інтактних тварин;

- показано, що германієвий комплекс тетрафенілпорфірину залежно від схеми введення може підсилювати гепатотоксичність  $CCl_4$  або зашкоджувати токсичній дії  $CCl_4$ .

### Практичне значення роботи.

Здійснене дослідження дало змогу виявити нові імуномодулюючі, гіпобілірубінемічні та гепатопротективні засоби.

### Положення, винесені до захисту.

1. Синтетичні мезозаміщені порфірини та їх металокомплекси (за винятком  $Ge^{4+}TMPPTe$ ) пригнічують гуморальну відповідь у інтактних та у імунодефіцитних тварин.

2. Синтетичним мезозаміщеним порфіринам та їхнім металокомплексам притаманна як інгібіруюча, так і стимулююча дія на клітинно-опосередкований імунітет.

3. Характер модуляції залежить від наявності та природи центрального атома металу, та від структури замісників в мезо-положеннях тетрапірольного кільця порфірину, тобто має значення структура молекули в цілому.

4. Синтетичні порфірини ( $TMPPTe$  та його металокомплекси з  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Sn^{4+}$ ) стимулюють *in vivo* активність лізосомальних ферментів (кислої фосфатази й катепсину D), не впливаючи на фагоцитарну активність макрофагів та інтенсивність НСТ-тесту.

5. Олов'яні комплекси синтетичних мезозаміщених порфіринів ефективно понижують рівень білірубіну при різних гіпербілірубінеміях (токсичних та аутоімунних). Гіпобілірубінемічний ефект метало-

порфіринів пов'язаний з інгібуванням гемоксигенази. Окрім цього, сполуки понижують інтенсивність ПОЛ, що сприяє стабілізації клітинних мембран.

6.  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП залежно від схеми уведення може підсилювати гепатотоксичність  $\text{CCl}_4$  або запобігати токсичній дії  $\text{CCl}_4$ .

#### Апробація роботи.

Матеріали дисертації представлені на II Всесоюзній конференції з хімії макроциклів (Одеса, 1984); Всесоюзному симпозиумі "Імунодефіцити і алергія" (Москва, 1986); У Всесоюзній конференції з координаційної та органічної хімії порфіринів (Іваново, 1988); III Всесоюзній конференції з хімії та біохімії макроциклічних сполук (Іваново, 1988); VI з'їзді фармакологів УРСР "Фармакологія: стан і перспективи досліджень" (Харків, 1990); Всесоюзній конференції "Актуальні проблеми лікарської токсикології" (Москва, 1990); XIII виїзної сесії Всесоюзного семінару з хімії порфіринів та їх аналогів (Самарканд, 1991).

#### Публікації.

По матеріалам дисертації опубліковано 11 робіт.

Конкретний особистий внесок автора полягає в тому, що експериментально вивчені різноманітні фармакологічні властивості синтетичних мезозаміщених порфіринів та їх металокомплексів, виявлені нові біологічно активні речовини та визначені деякі механізми їх дії.

#### Структура та обсяг роботи.

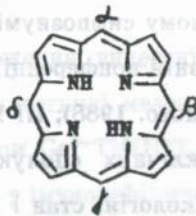
Дисертацію викладено на 139 сторінках машинописного тексту, у ній міститься 32 таблиці, 3 малюнки. Робота складається з вступу,

огляду літератури, матеріалів і методів, результатів та їх обговорення, висновків та списку літератури, котрий включає 200 найменувань.

## ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали і методи

Досліджені у роботі синтетичні порфірини синтезовані в ІНДЛ-5 Одеського держуніверситету ім.І.І.Мечникова під керівництвом доктора хімічних наук Жиліної З.І.



α, β, γ, δ мезо - положення порфіринового циклу

У роботі було вивчено такі синтетичні порфірини: мезо-тетрафенілпорфірин (ТФП) та його металокомплекси з  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$ ,  $\text{Ge}^{4+}$ ;

мезо-тетра - (N - метил - 3 - піридил) - порфіринілтетратозилат (ТМППТ<sub>3</sub>) та його металокомплекси з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$ ,  $\text{Ge}^{4+}$ ;

германієвий комплекс мезо-тетра - (3 - піридил) - порфірину ( $\text{Ge}^{4+}$ -ТПП).

У роботі використовувалися миші лінії СВА, F<sub>1</sub> (СВА-С<sub>57</sub>В1), безпородні масою 18-23 г. та безпородні щурі масою 80-150 г. Тварини, отримані з розплідника АМН Росії "Столбовая" і розплідника "Крюково", утримувались в стандартних умовах віварію.

ТФП та його металокомплекси вводились у вигляді твінової емульсії. ТМППТ<sub>3</sub> та його металокомплекси,  $\text{Ge}^{4+}$ -ТПП вводили у вигляді водних розчинів.

Імунотропну активність синтетичних порфіринів оцінювали за їх здатністю впливати на інтенсивність імунної відповіді мишей на тест-антиген. роль якого виконували еритроцити барана.

Показниками гуморальної імунної відповіді слугували: гемолітична активність сироватки та спленоцитів, кількість антитілоутворюючих (АУК) і розеткоутворюючих (РУК) клітин в селезінці, титри циркулюючих гемаглютининів і гемолізинів. Тварин імунізували через уведення внутрішньочеревинно еритроцитів барана в оптимальній дозі ( $5 \cdot 10^8$  клітин на мишу). При вивченні імуотропних властивостей германієвих комплексів синтетичних порфіринів мишей імунізували еритроцитами барана і в субоптимальній дозі ( $8 \cdot 10^6$  клітин на мишу). Дослідження здійснювались на пікові первинної імунної відповіді на даний антиген у мишей - 4-5 добу після імунізації. Сироватку крові та суспензію клітин отримували за загальноновизнаними методиками. Гемолітичну активність сироватки й спленоцитів оцінювали за методом Буркіна і Лосева (1976). Кількість АУК підраховували за методом Cunnigham і Scenberg (1968), а число РУК за методом Zaalberg (1969). Титри гемаглютининів і гемолізинів визначали методом послідовних розведень за допомогою мікротитратора Такачі.

Дію сполук на реакції клітинного імунітету вивчали на моделі гіперчуттєвості уповільненого типу (ГУТ) (Lagrange et al., 1974) на інтактних тваринах. Протизапальні властивості мідних комплексів синтетичних порфіринів вивчали на моделях гострого запалення, для чого використали карагеніновий набряк лапи у мишей (Winter et al., 1962) і набряк вуха, викликаний у мишей місцевою аплікацією арахідонової кислоти (Zarnack et al., 1988).

Дослідження впливу ТМІПТ<sub>s</sub> та ряду його металокомплексів на фагоцитарну і ферментативну активність макрофагів здійснювали на нестимульованих перитонеальних макрофагах мишей (Учитель, 1978). Фагоцитарну активність макрофагів визначали за методом (Kaminski et al., 1985). Стан бактерицидних систем, пов'язаних з продукцією високоактивних метаболітів кисню, оцінювали спектрофотометричним методом відновлення пітросинього тетразолію (НСТ-

тест) (Маянський, Галлиулін, 1984). Активність кислій фосфатази визначали за методом Бесія у модифікації Левицького (1973), а активність катепсину Д згідно з Учителем (1978).

Токсичні гіпербілірубінемії індукували у мишей за допомогою уведення солянокислого фенілгідрозину (60 мг/кг, підшкірно, двічі за 96 та 48 годин до дослідів), геміну (100 мкМ/кг, підшкірно, однократно, за 24 години до дослідів),  $\text{CCl}_4$  (20 мкМ/кг, у вигляді масляного розчину, перорально, однократно за 24 години до дослідів). Аутоімунну гемолітичну анемію (АГА) викликали у мишей введенням внутрішньочеревинно  $2 \cdot 10^8$  еритроцитів щура. Рівень сироваткового білірубину визначали за методом Roth (1967). Кількість ретикулоцитів підраховували після пофарбування їх метиленовим синім (Козловська, Мартинова, 1975). Виділення мікросомальної фракції печінки здійснювали методом висалювання (Albrecht et al., 1973). Вміст цитохрому Р-450 визначали за методом Omura і Sato (1964). Активність гемоксигенази визначали за методом King і Brown (1978). Інтенсивність ПОЛ оцінювали згідно з Орехович (1977). Крім спонтанного ПОЛ визначали інтенсивність аскорбат-залежного (неферментативного) й НАДФН-залежного (ферментативного) процесів.

Критеріями оцінки функціонального стану печінки при інтоксикації  $\text{CCl}_4$  (2 мл/кг, у вигляді 50% масляного розчину) слугували: активність гемоксигенази, активність цитохром Р-450 - залежних монооксигеназ та інтенсивність ПОЛ в мікросомальній мембрані, вміст у сироватці крові загального білірубину та його фракцій, активність у сироватці крові лужної фосфатази й амінотрансфераз. Активність гемоксигенази селезінки й печінки, інтенсивність ПОЛ визначали за допомогою описаних вище методів. Активність анілінгідроксилази та N-деметилази оцінювали згідно з Орехович (1977). Вміст у сироватці крові загального білірубину визначали за методом Єндрасика-Клегорна-Грофа (Меньшиков, 1987). Активність лужної фосфа-

тази визначали за методом Бесія та Лоурі (Алейнікова, Рубцова, 1988), а активність амінотрансфераз колориметричним методом (Кушмапова, Івченко, 1983).

Вміст білка визначали за методом Лоурі (Loury et al., 1951).

Статистична обробка результатів здійснювалась за методом середньої арифметичної та її середньої квадратичної помилки за критерієм вірогідності Стьюдента.

### Результати та їх обговорення

#### 1. Імуномодулюючі властивості синтетичних порфіринів.

Ми вивчали дію синтетичних порфіринів на показники гуморальної відповіді у нормальних та імунодефіцитних тварин. Стан імунодепресії у мишей викликали через однократне уведення циклофосфану у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревинно, одночасно з антигеном. Слід зазначити, що ми досліджували дію синтетичних порфіринів на ослаблених тваринах у зв'язку з тим, що порфірини використовуються при ракових захворюваннях, котрі, як правило, супроводжуються зниженням імунологічної реактивності.

В літературі відсутні будь-які відомості про використання порфіринів як імуноотропних засобів, тому необхідно було визначити оптимальні умови їх застосування для скринінгових досліджень.

Вивчення дії різних доз (5, 15, 45 та 100 мкМ/кг) синтетичних порфіринів на імунну відповідь інтактних тварин показало, що найбільший імуносупресивний ефект порфіринів спостерігається при використанні дози 15 мкМ/кг, подальше збільшення дози призводить до зменшення ефекту. Встановлено також залежність імуносупресивних ефектів порфіринів від часу їх уведення щодо моменту імунізації. Найбільша дія сполук спостерігається при уведенні одночасно з антигеном.

Аналогічні дослідження, здійснені на циклофосфановій моделі імунодепресії, показали, що найбільш виражений супресивний ефект порфіринів і у цьому випадку спостерігається при уведенні в дозі 15 мкМ/кг, одночасно з антигеном.

Дослідження ТФП та його металокомплексів з  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  показало, що у інтактних тварин сполуки викликають пониження числа РУК й АУК у селезінці (до 50%), у той же час гемолітична активність脾еноцитів або не змінюється, або зростає (лише у випадку ТФП вона понижується), титри циркулюючих гемаглютининів і гемолізинів не змінюються - залишаються на рівні контрольних величин.

Уведення цих сполук на фоні циклофосфану дещо збільшує імунодепресивну дію цитостатика - кількість АУК в селезінці, гемолітична активність脾еноцитів і титри антитіл у крові вище рівня, створеного уведенням циклофосфану.

Дослідження ТМППТ<sub>s</sub> та його металокомплексів з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  показало, що у інтактних тварин сполуки блокують усі вивчені імунні реакції гуморального типу. Особливо виражений супресивний ефект порфіринів на розеткоутворюючі клітини (число РУК понижується в 2,2-3,4 рази порівняно з контролем).

При уведенні на фоні цитостатика ТМППТ<sub>s</sub> і його металокомплекси з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  виявляють імуносупресивну дію щодо усіх вивчених реакцій. У ряді випадків інтенсивність реакцій складає лише 24-45% від рівня, створеного уведенням циклофосфану.

Отже, ТМППТ<sub>s</sub> та його металокомплексам з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$ , котрі містять N-метил-3-піридил в мезо-положеннях тетрапірольного кільця, притаманна більш висока імунодепресивна активність ніж ТФП та його відповідним металокомплексам, що мають фенільний радикал. Однак, необхідно враховувати, що сполуки ряду ТМППТ<sub>s</sub> містять у молекулі й аніони  $\text{C}_7\text{H}_7\text{SO}_3$ , хоча раніше (Бритва та ін.,

1987) було показано, що уведення тваринам тозилхлориду не впливає на інтенсивність імунних реакцій. Особливо слід звернути увагу на здатність вивчених порфіринів збільшувати імунодепресивну дію циклофосфану при спільному застосуванні, оскільки цей факт свідчить про необхідність обережного використання порфіринів в онкологічній практиці одночасно з цитостатиками.

Дослідження германієвих комплексів синтетичних порфіринів показало, що сполукам притаманний рівний спектр дії на нормальну імунну відповідь. Так,  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП (R=феніл) за характером дії на гуморальний імунітет нагадує інші металокомплекси ТФП, тобто знижує число АУК й РУК в селезінці, підсилює гемолітичну активність脾enoцитів і не впливає на гемолітичну активність сироватки й титри антитіл.  $\text{Ge}^{4+}$ -ТМППТ<sub>5</sub> (R=N-метил-3-піридил) у певній мірі стимулює гуморальну відповідь, тоді як інші сполуки ряду ТМППТ<sub>5</sub> пригнічують імунну відповідь на ксеногенні еритроцити.  $\text{Ge}^{4+}$ -ТПП (R-3-піридил) має деяку стимулюючу дію лише на число АУК у селезінці, а щодо синтезу антитіл зазначено імуносупресивний ефект.

Зіставлення імуностропних ефектів усіх вивчених сполук з їх структурою показало, що інтенсивність дії, а у ряді випадків і її спрямованість залежать як від наявності і природи центрального атома металу, так і від структури замісників в мезо-полеженнях тетрапірольного кільця, тобто має значення структура молекули в цілому.

На моделі ГУТ для ТФП і його металокомплексів при уведенні протягом 3-х днів після сенсibilізації у дозах 15 та 45 мкМ/кг відзначені відмінності зумовлені характером координованого атома металу. Так, вільний порфірин не впливав на неличиву набряку, викликаного уведенням вирішальної дози антигену. А  $\text{Co}^{2+}$ -ТФП та  $\text{Fe}^{3+}$ -ТФП стимулюють (на 23-54%) реакцію ГУТ. До того ж їх ефект відмінний не лише від дії ТФП, але й від впливу солей відповідних металів. Комплекси з  $\text{Ni}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  незалежно від дози викликають як і їх

відповідні хлориди помірно пригнічення реакції ГУТ. Найцікавішими уявляються дані про вплив мідного комплексу:  $\text{Cu}^{2+}$ -ТФП в дозі 15  $\mu\text{M}/\text{kg}$  викликає пониження інтенсивності реакції ГУТ у 2,6 рази, а при уведенні в іще менших дозах (5 і 2,5  $\mu\text{M}/\text{kg}$ ) інтенсивність реакції ГУТ знижується в 2,9 та 4,8 рази відповідно, тобто чим менше уведена доза, тим більший ефект цієї сполуки.

ТМППТ<sub>8</sub> та його металокомплекси з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  в дозах 5 і 15  $\mu\text{M}/\text{kg}$  при одночасному уведенні з вирішальною дозою антигену знижують інтенсивність клітинної відповіді (на 12-85%). До того ж у більшості випадків більший ефект відзначається при використанні меншої дози. У разі, коли ТМППТ<sub>8</sub> і його металокомплекси вводились протягом 3-х днів після сенсibiliзації спостерігається стимуляція клітинної відповіді.

За характером дії на гуморальну і клітинну відповіді ТМППТ<sub>8</sub> і його металокомплекси з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  нагадують природні порфірини - протопорфірин IX і гемін.

Враховуючи високу протизапальну активність мідних комплексів різної природи (Frechilla et al., 1990; Sorenson, 1977), а також виявлену здатність  $\text{Cu}^{2+}$ -ТФП і  $\text{Cu}^{2+}$ -ТМППТ<sub>8</sub> пригнічувати реакції клітинного імунітету, було здійснено експерименти по вивченню впливу цих порфіринів на запалення. У тесті з карагеніном сполуки вводились внутрішньочеревинно у дозі 5  $\mu\text{M}/\text{kg}$ , а у тесті з арахідоновою кислотою накладались на вуха у дозі 0,5  $\mu\text{M}$  за 30 хвилин до арахідонової кислоти. Показано, що порфірини при уведенні за 1 годину до карагеніну сильніше пригнічують карагенінове запалення (14-40%), ніж при уведенні через 1 годину після індукції запалення (до 20%). При аплікації на шкіру інгібуючий ефект більш виражений на пізній стадії запалювальної реакції (44-56%), хоча відзначається і через 10 хвилин після нанесення арахідонової кислоти (17%). До того ж  $\text{Cu}^{2+}$ -ТФП більш ефективно, ніж  $\text{Cu}^{2+}$ -ТМППТ<sub>8</sub>.

пригнічує розвиток запалювальних реакцій як при внутрішньочеревинному, так і при місцевому застосуванні.

Дослідження дії ТМППТ<sub>8</sub> і його металокомплексів з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  (15 мкМ/кг, за 24 години до досліджу) на фагоцитарну й ферментативну активність макрофагів показало, що порфірини стимулюють активність кислій фосфатази і катепсину Д, не впливаючи на фагоцитоз та інтенсивність НСТ-тесту. Так, ТМППТ<sub>8</sub> і його металокомплекси з  $\text{Fe}^{3+}$  і  $\text{Sn}^{4+}$  стимулюють приблизно в 1,5-2 рази гідроліз п-нітрофенілфосфату і швидкість відщеплення тирозину.

Таким чином, здійснене дослідження є, поая сумнівами, свідченням здатності синтетичних порфіринів впливати на гуморальний та клітинний імунітет, і фактори неспецифічного імунітету.

## 2. Активність олов'яних комплексів синтетичних порфіринів при гіпербілірубінеміях різного походження.

Токсичні гіпербілірубінемії моделювалися за допомогою фенілгідразина, який викликає гемоліз еритроцитів, чотирхлористого вуглецю, який пошкоджує мембранні структури гепатоцитів, а також індуктора гемоксигенази-геміна.  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП і  $\text{Sn}^{4+}$ -ТМППТ<sub>8</sub> вводили підшкірно у дозі 100 мкМ/кг, яку було вибрано з урахуванням даних літератури щодо застосування  $\text{Sn}^{4+}$ -протопорфірина ІХ при індукованих неонатальних гіпербілірубінеміях (Drummond, Karras, 1984).  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП і  $\text{Sn}^{4+}$ -ТМППТ<sub>8</sub> вводили за такими схемами: 1) за 24 години до токсиканту; 2) через 24 години після ін'єкції геміну та ін'єкції  $\text{CCl}_4$ , і через 48 годин після останньої ін'єкції фенілгідразину, а рівень сироваткового білірубіну визначали через 48 годин після уведення сполук.

Виявилось (табл. 1), що при уведенні за 24 години до токсиканта металопорфірини у випадках фенілгідразину і геміну понижують рівень сироваткового білірубіну приблизно в 1.6 рази, а у випадку

ССІ<sub>4</sub> вони повністю запобігають піднесенню рівня білірубіна у сироватці.

Таблиця 1.

Вплив Sn<sup>4+</sup>-ТФП і Sn<sup>4+</sup>-ТМППТ<sub>8</sub> на рівень сироваткового білірубіну при токсичних гіпербілірубінеміях ( $M \pm m$ ; n=5-7)

Сполука	Білірубін сироватки, мг/л			
	Контроль	Фенілгідр- аин	Гемін	Тетрахлор- метан
Профілактичне уведення				
	2,6 ± 0,3	11,5 ± 1,3 <sup>x</sup>	5,3 ± 0,3 <sup>x</sup>	5,6 ± 0,4 <sup>x</sup>
Sn <sup>4+</sup> -ТФП	---	7,2 ± 0,8 <sup>xx</sup>	3,4 ± 0,3 <sup>xx</sup>	2,6 ± 0,2 <sup>xx</sup>
Sn <sup>4+</sup> -ТМППТ <sub>8</sub>	---	7,4 ± 0,5 <sup>xx</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>xx</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>xx</sup>
Лікувальне уведення				
	1,7 ± 0,2	7,5 ± 1,0 <sup>x</sup>	4,4 ± 0,3 <sup>x</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>x</sup>
Sn <sup>4+</sup> -ТФП	---	3,5 ± 0,5 <sup>xx</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>xx</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>xx</sup>
Sn <sup>4+</sup> -ТМППТ <sub>8</sub>	---	3,7 ± 0,4 <sup>xx</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>xx</sup>	2,9 ± 0,4 <sup>xx</sup>

Примітка: x - відмінності вірогідні порівняно з контролем; p<0,05  
xx - відмінності вірогідні порівняно з гіпербілірубінемічним контролем, p<0,05.

При уведенні металопорфіринів після впливу токсиканту у всіх випадках спостерігається пониження рівня білірубіну у сироватці в 1,8-2,3 рази. Таким чином, отримані дані показують, що олов'яні комплекси синтетичних мезозаміщених порфіринів ефективні як при профілактичному, так і при лікувальному застосуванні.

Механізм розвитку анемії при АГА ґрунтується на підвищеному руйнуванні еритроцитів антитілами. Sn<sup>4+</sup>-ТФП вводили в дозі 100 мкМ/кг, підшкірно, однократно, одночасно з першою імунізацією. Спостереження протягом 6 тижнів показало, що Sn<sup>4+</sup>-ТФП не

впливає на динаміку розвитку процесу (табл.2, мал.1). У тварин обох груп на четвертому тижні відзначено пік числа ретикулоцитів, а на п'ятому - найвищий рівень білірубіну. Однак у мишей, що отримали  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП, за весь строк дослідження кількість ретикулоцитів і вміст білірубіну були в 1,5-2 рази меншими, ніж у нелікованих. Отже, металопорфірин не лише знижує рівень білірубіну, але й полегшує протікання аутоімунного процесу.

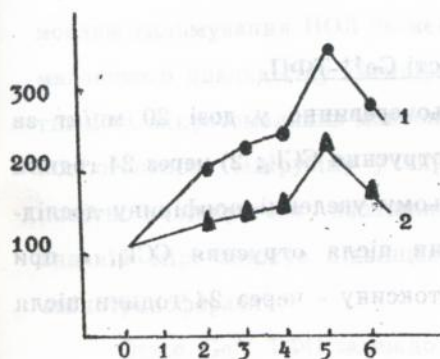
Таблиця 2.

Вплив  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП на рівень ретикулоцитів в крові мишей з аутоімунною гемолітичною анемією ( $M \pm m$ ;  $n=10-12$ )

Умови досліджу	Число ретикулоцитів серед $10^3$ еритроцитів					
	Тиждень після першої імунізації					
	0	2	3	4	5	6
АГА	$11,5 \pm 0,8$	$33,0 \pm 3,6$	$53,3 \pm 3,6$	$69,3 \pm 6,6$	$42,3 \pm 4,1$	$32,5 \pm 2,9$
АГА+ $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП	---	$17,8 \pm 1,5^x$	$38,0 \pm 6,4^x$	$49,8 \pm 8,1$	$30,5 \pm 4,3$	$26,3 \pm 1,8$

Примітка: x - відмінності вірогідні порівняно з нелікованими тваринами;  $p < 0,05$ .

Мал.1. Вплив  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП на рівень білірубіну у сироватці крові мишей з аутоімунною гемолітичною анемією.



По осі абсцис - тижні після першої імунізації.

По осі ординат - рівень загального білірубіну (в % до контролю).

1. - АГА;

2. - АГА+  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП.

У зв'язку з тим, що раніше (Головенко та ін., 1989) було показано, що  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП індукує цитохром P-450, інгібує гемоксигеназу

та ПОЛ у печінці щурів при внутрішньочеревинному уведенні, а здатність підвижувати рівень білірубіну при гіпербілірубінеміях виявлена при підшкірному уведенні мезозаміщених порфіринів, то вважалось за доцільне зіставити дію олов'яних комплексів на мікросомальні системи при різних шляхах їх проникнення у організм.

Враховуючи оптимальні умови застосування ТФП та його металокомплексів як модуляторів системи цитохрому Р-450,  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП вводили в дозі 25 мг/кг за добу до досліду. Виявилось, що незалежно від способу уведення (внутрішньочеревинного чи підшкірного)  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП викликає однотипні зміни: індукує цитохром Р-450, пригнічує активність гемоксигенази і інтенсивність ПОЛ у печінці. Відмінності відзначені лише щодо гемоксигенази селезінки, активність якої при підшкірному уведенні  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП не змінювалась. Експерименти *in vitro* показали, що активність гемоксигенази селезінки й печінки пригнічується за наявності  $\text{Sn}^{4+}$ -ТМППТ, і не змінюється при додаванні в інкубаційне середовище  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП. Ефективність  $\text{Sn}^{4+}$ -ТФП *in vivo* може, певно, пояснюватися появою в організмі його метаболітів, здатних до взаємодії з ферментом. Отже, сполуки інгібують активність гемоксигенази, а також понижують інтенсивність ПОЛ і сприяють цим стабілізації клітинних мембран.

### 3. Гепатопротекторні властивості $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП.

$\text{Ge}^{4+}$ -ТФП вводили внутрішньочеревинно у дозі 20 мг/кг за такими схемами: 1) за 24 години до отруєння  $\text{CCl}_4$ ; 2) через 24 години після отруєння  $\text{CCl}_4$ . При попередньому уведенні порфірину дослідження здійснювали через 24 години після отруєння  $\text{CCl}_4$ , а при уведенні  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП після дії гепатотоксину - через 24 години після ін'єкції порфірину.

Дослідження дії  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП на систему мікросомальних монооксигеназ печінки показало, що при уведенні  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП ітактним тва-

ривам через 24 години активність N-деметилази амідопіріну і п-гідроксилази авіліну зростає відповідно в 2,2 і 2,4 рази, а інтенсивність ПОЛ в усіх випадках зменшується і складає 19-29% від норми. Отже,  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП індукує цитохром P-450 і залежні від нього монооксигенази й блокує ПОЛ в мікросомах печінки щурів.

Уведення  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП перед інтоксикацією  $\text{CCl}_4$  посилює пошкоджуючу дію гепатотоксину на печінку. Попереднє введення  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП збільшує інтенсивність ПОЛ і пониження мікросомальних монооксигеназ, викликані інтоксикацією  $\text{CCl}_4$ . Концентрація загального білірубину у сироватці крові щурів цієї групи на 14% підвищується (переважно за рахунок некон'югованої форми пігменту) порівняно з такою у щурів, лише отруєних  $\text{CCl}_4$ . Активність гемоксигенази селезінки й печінки щурів, отруєних  $\text{CCl}_4$ , котрим попередньо зробили ін'єкцію  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП, вище (на 20-30%), ніж у тварин, які не отримували порфірину. Дана схема введення порфірину зумовлює, ймовірно, лише індуктивний ефект, збільшення вмісту цитохрому P-450 в мембранах ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів підвищує утворення токсичних метаболітів  $\text{CCl}_4$ .

Уведення  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП після інтоксикації  $\text{CCl}_4$  заважає пошкоджуючій дії гепатотоксину на печінку. Уведення металопорфірину зумовлює гальмування ПОЛ біомембран печінки, внаслідок чого рівень малонового діальдегіду зменшується до вихідного, та відновлює активність мікросомальних монооксигеназ. Завдяки дії  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП рівень кон'югованого білірубину у сироватці крові щурів, отруєних  $\text{CCl}_4$ , помітно понижується і наближається до норми. Уведення  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП у значній мірі знижує підвищену активність сироваткової аспартат-амінотрансферази.

Отже,  $\text{Ge}^{4+}$ -ТФП залежно від схеми введення може підсилювати гепатотоксичність  $\text{CCl}_4$  або перешкоджати токсичній дії  $\text{CCl}_4$ .

## ВИСНОВКИ

1. Синтетичні мезозаміщені порфірини і їх металокомплекси в основному пригнічують гуморальну відповідь, у інтактних та у імунодефіцитних тварин. Найбільший імуносупресивний ефект відзначається при застосуванні дози 15 мкМ/кг і у спільному з антигеном уведенні сполук.
2. Сполуки ряду ТМППТ<sub>8</sub> (за винятком Ge<sup>4+</sup>-ТМППТ<sub>8</sub>) мають більш виразну імуносупресивну дію на гуморальний імунітет порівняно з ТФП та його металокомплексами, тобто активність порфіринів залежить як від наявності й природи центрального атома металу, так і від структури замісників в мезо-положеннях тетрапірольного кільця.
3. Досліджувані порфірини залежно від будови, дози та схеми уведення можуть виявляти як інгібіруючу, так і стимулюючу дію на клітинно-опосередкований імунітет.
4. Мідний комплекс тетрафенілпорфірину (Cu<sup>2+</sup>-ТФП) більш ефективно ніж Cu<sup>2+</sup>-ТМППТ<sub>8</sub> пригнічує розвиток запалювальних реакцій як при внутрішньочеревинному, так і при місцевому застосуванні.
5. Синтетичні порфірини (ТМППТ<sub>8</sub> та його металокомплекси з Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Sn<sup>4+</sup>) стимулюють in vivo активність лізосомальних ферментів (кислої фосфатази і катепсину Д), не впливаючи на фагоцитарну активність макрофагів та інтенсивність НСТ-тесту.
6. Олов'яні комплекси синтетичних порфіринів ефективно понижують рівень білірубіну при гіпербілірубінеміях різного походження (токсичних, індукованих токсикантами з різним механізмом дії та аутоімунних).
7. Олов'яні комплекси синтетичних порфіринів інгібують гемоксигеназу і понижують інтенсивність ПОЛ.

8. Германієвий комплекс тетрафенілпорфірину залежно від схеми уведення збільшує гепатотоксичність  $CCl_4$  чи перешкоджає токсичній дії  $CCl_4$ .

Список робіт, які опубліковано за темою дисертації

1. Василенко Л.С., Филиппова Т.О., Жилина З.И., Бритва И.Э. Порфирины как регуляторы иммунных реакций //Тез. докл. II Всес. конф. по химии макроциклов. - Одесса, 1984. - С. 194.

2. Филиппова Т.О., Галкин Б.Н., Жилина З.И., Головенко Н.Я., Стефанская О.Н., Василенко Л.С. Использование металлокомплексов тетрафенілпорфірина для коррекции окислительных процессов и иммунных реакций организма //Тез. докл. XV Всес. чугаевского совещания по химии комплексных соединений. - Киев, 1985. - С. 256.

3. Филиппова Т.О., Бритва И.Э., Василенко Л.С., Жилина З.И., Попков Ю.А. Поиск иммуномодулирующих средств среди синтетических макрогетероциклических соединений //Тез. докл. V съезда фармакологов УССР. - Запорожье, 1985. - С. 167-168.

4. Филиппова Т.О., Галкин Б.Н., Головенко Н.Я., Бритва И.Э., Василенко Л.С. Поиск иммуномодулирующих средств среди соединений циклической структуры //Тез. докл. Всес. симп. "Иммунодефициты и аллергия". - Москва, 1986. - С. 211.

5. Филиппова Т.О., Головенко Н.Я., Василенко Л.С., Водзинский С.В. Иммунофармакологическое изучение синтетических мезозамещенных порфиринов //Тез. докл. V Всес. конф. по координационной и органической химии порфиринов. - Иваново, 1988. - С. 93.

6. Галкин Б.Н., Филиппова Т.О., Жилина З.И., Василенко Л.С., Олешко Т.И., Водзинский С.В. Воздействие ТФП- $Sn^{4+}$  на иммунитет и систему цитохрома P-450 //Тез. докл. III Всес. конф. по химии и биохимии макроциклических соединений. - Иваново, 1988. - С. 243.

7. Филиппова Т.О., Василенко Л.С., Жилина З.И., Водзинский С.В. ТФП-Sn<sup>4+</sup> - средство для снижения уровня билирубина при гипербилирубинемиях //Тез. докл. VI съезда фармакологов УССР "Фармакология: состояние и перспективы исследований". - Харьков, 1990. - С. 319.
8. Филиппова Т.О., Василенко Л.С., Жилина З.И., Водзинский С.В. Использование оловянных комплексов синтетических порфиринов при токсических гипербилирубинемиях //Тез. докл. Всес. конф. "Актуальные проблемы лекарственной токсикологии". - Москва, 1990. - С. 324.
9. Головенко Т.О., Филиппова Т.О., Василенко Л.С., Жилина З.И., Водзинский С.В. Иммунотропные свойства синтетических порфиринов //Респ. межведомственный сборник "Физиологически активные вещества". - Киев: Наукова думка, 1990. - №22. - С. 9-13.
10. Галкин Б.Н., Филиппова Т.О., Василенко Л.С. Биологическая активность оловянных комплексов синтетических порфиринов //Тез. докл. XII выездной сессии Всес. семинара по химии порфиринов и их аналогов. - Самарканд, 1991. - С. 118.
11. Жилина З.И., Головенко Н.Я., Филиппова Т.О., Василенко Л.С., Галкин Б.Н. Защитные свойства оловянных комплексов синтетических порфиринов при токсических гипербилирубинемиях //Материалы научно-практической конф. "Актуальные вопросы общей и корабельной токсикологии". - Санкт-Петербург, 1994. - С. 73-74.

#### АННОТАЦИЯ

Василенко Л.С. "Фармакологическая активность синтетических порфиринов и их металлокомплексов".

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.08 - фармакология.

Одесский государственный университет им. И.И. Мечникова,  
Одесса, 1995.

Защищается рукопись кандидатской диссертации, которая содержит результаты исследования фармакологической активности синтетических порфиринов и их металлокомплексов. Среди ряда синтетических мезозамещенных порфиринов выявлены соединения с иммуномодулирующей, противовоспалительной, гипобилирубинемической и гепатозащитной активностью. Обсуждаются некоторые механизмы их действия, связь биологической активности со структурой, вопросы применения в клинике.

### SUMMARY

Vasilenko L. S. "Pharmacological activity of synthetic porphyrins and their metallocomplexes".

Dissertation for obtaining the degree of candidate of biological science, speciality 14.03.08 - pharmacology.

I.I. Mechnikov State University, Odessa, 1995.

The pharmacological activity of some synthetic porphyrins and their metallocomplexes are represented in the Manuscript offered for defending. It has been shown that in the series of synthetic mezo-substituted porphyrins there are compounds exhibiting immunomodulating, anti-inflammatory, hypobilirubinemic and hepatoprotective activity. Some mechanisms of their action, a structure-biological activity relationship, problems of clinical use are discussed.

Ключові слова: синтетичні порфірини, імунна система, гіпербілірубінемія.

*Василь -*

Одобрены методические указания к выполнению кандидатской диссертации на тему: "Фармакологическая активность синтетических порфиринов и их металлокомплексов".

Одобрено 1998

Занимается изучением фармакологической активности синтетических порфиринов и их металлокомплексов. В работе описаны методы синтеза и исследования фармакологической активности синтетических порфиринов и их металлокомплексов. Приведены результаты исследования фармакологической активности синтетических порфиринов и их металлокомплексов. Описаны методы синтеза и исследования фармакологической активности синтетических порфиринов и их металлокомплексов. Приведены результаты исследования фармакологической активности синтетических порфиринов и их металлокомплексов.

SUMMARY

Vasilenko I. S. "Pharmacological activity of synthetic porphyrins and their metallocomplexes". Dissertation for obtaining the degree of candidate of biological science, specialty 14.03.08 - pharmacology. I.I. Mechnikov State University, Odessa, 1998. The pharmacological activity of some synthetic porphyrins and their metallocomplexes are represented in the manuscript. It has been shown that in the series of synthetic meso-substituted porphyrins there are compounds exhibiting immunomodulating, anti-inflammatory, hypohirudinemic and hepatoprotective activity. Some mechanisms of their action, a structure-biological activity relationship, problems of clinical use are discussed.

*Handwritten signature*



Сдано в набор 15.03.96 г. Подписано к печати 22.03.96 г. Формат 60x84/16. Бумага офсет. Объем 1 п. л. Тираж 100 экз. Заказ 90.

Отпечатано в НПФ «Астропринт». Адрес: Одесса, Французский бульвар, 24/26. Тел. (0482) 68-77-33, 22-64-84.

445196

AB 34.472

**AB 34.472**