

Національний університет "Чернігівський колегіум" імені Т. Г. Шевченка

Природничо-математичний факультет

Кафедра хімії, технологій та фармації

Кваліфікаційна робота

освітній ступінь: магістр

на тему

Дослідження властивостей похідних [1,2,4]триазоло[1,5-А]піридину
з використанням методів доклінічної діагностики

Виконав:

студент 6 курсу, групи 62

спеціальності 102 «Хімія»

Глушаков Володимир Володимирович

Науковий керівник:

доцент кафедри хімії, технологій та

фармації, кандидат біологічних наук

Смольський О.С.

Чернігів – 2022

Роботу подано до розгляду « 16 » серпня 2022 року.

Студент (ка)


(підпис)

Глушаков В. В.
(прізвище та ініціали)

Науковий керівник


(підпис)

СМОЛЬСЬКИЙ О. С.
(прізвище та ініціали)

Рецензент


(підпис)

Лукаш В. В.
(прізвище та ініціали)

Кваліфікаційна робота розглянута на засіданні кафедри хімії, технологій та фармації. Протокол № 6 від « 16 » серпня 2022 року.

Студент (ка) допускається до захисту даної роботи в екзаменаційній комісії.

Завідувач кафедри


(підпис)

Курмакова І.М.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Широке використання відомих, а також розробка нових оригінальних лікарських засобів визначає необхідність обов'язкової доклінічної оцінки як їх специфічної фармакологічної активності, так і токсичних властивостей.

Останнім часом у сучасній токсикологічній практиці широкого розповсюдження набули поруч із традиційними альтернативні методи дослідження.

Однією з причин для більш широкого введення у практику доклінічних токсикологічних досліджень альтернативних методів є етичні міркування щодо виключення чи обмеження експериментів на теплокровних тваринах.

Використання біологічних моделей *in vitro* є перспективним для скринінгу мутагенів і канцерогенів, встановленні ступеня токсичності нових хімічних речовин, готових форм і окремих компонентів лікарських засобів, консервантів, виробів медичного призначення та ін. В останні роки широкого розповсюдження набули методи оцінки антиоксидантних та антирадикальних властивостей за допомогою модельних систем *in vitro*.

Метою дослідження було за допомогою методів доклінічної діагностики дослідити антиоксидантні властивості і токсичність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-А]піридину.

В умовах *in silico* було доведено, що досліджувані похідні відносяться до 3-4 класів токсичності. З використанням методів *in vitro* діагностики нами встановлена наявність фізико-хімічної активності в ряду досліджених сполук.

Рекомендуємо в якості потенційних антиоксидантів розглядати похідні 2-аміно-[1,2,4]триазоло[1,5a]піридину з бром-замісниками у піридиновому фрагменті молекули.

ЗМІСТ

	стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ ДОКЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЯК АЛЬТЕРНАТИВА КЛАСИЧНИМ МЕТОДАМ ВИЗНАЧЕННЯ БАР	10
1.1. Загальна характеристика методів доклінічної діагностики.....	10
1.2. Методи доклінічної діагностики з використанням біологічних тест-систем.....	13
1.3. Методи доклінічної діагностики з використання фізико-хімічних систем.....	18
1.4. Методи доклінічної діагностики для оцінки небезпеки потенційних біологічно активних речовин (визначення токсичності).....	20
РОЗДІЛ 2. ДОКЛІНІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІЖЕННЯ ВІЛЬНО-РАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В УМОВАХ <i>in vitro</i>	25
2.1. Загальна характеристика природних антиоксидантів та їх класифікація.....	25
2.2. Вільно-радикальні процеси та оксидативний стрес.....	28
2.3. Штучні антиоксиданти як альтернатива: хімічна природа та особливості застосування.....	31
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ КОРЕКЦІЇ ВМІСТУ АФК ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА	36
3.1. АФК та їх характеристика.....	36
3.2. Методи корекції АФК	39
РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	43
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	48
5.1. Розрахунок токсичності похідних триазолопіридину з використанням	

моделі комп'ютерного PASS-прогнозу.....	50
5.2. Визначення цитотоксичності речовин з використанням моделі еритроцитарної мембрани.....	54
5.3. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]піридину на моделі емульсії жовткових ліпопротеїдів в умовах штучного оксидативного стресу <i>in vitro</i>	56
5.4. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]піридину на моделі аутоокиснення адреналіну в умовах штучного оксидативного стресу <i>in vitro</i>	58
ВИСНОВКИ.....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	60
ДОДАТКИ.....	66

СПИСОК ПРИЙНЯТИХ СКОРОЧЕНЬ

АОА – антиоксидантна активність

АО – антиоксиданти

АФК – активні форми кисню

БАР – біологічно активні речовини

ВРР – вільно-радикальні реакції

ВРО – вільно-радикальне окиснення

ЛЗ – лікарський засіб

МДА – малоновий діальдегід

МДД – методи доклінічної діагностики

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ФХМА – фізико-хімічні методи аналізу

ЖЛП – жовткові ліпопротеїди

ТХО – трихлороцтова кислота

ВСТУП

Актуальність проблеми дослідження. Широке використання відомих, а також розробка нових оригінальних лікарських засобів визначає необхідність обов'язкової доклінічної оцінки як їх специфічної фармакологічної активності, так і токсичних властивостей.

Останнім часом у сучасній токсикологічній практиці широкого розповсюдження набули поруч із традиційними альтернативні методи дослідження [3], до яких відносять: використання безхребетних організмів, рослин, мікроорганізмів, ембріонального і личинкового матеріалу, культур клітин, математичного моделювання, застосування ряду фізичних і хімічних методів.

Однією з причин для більш широкого введення у практику доклінічних токсикологічних досліджень альтернативних методів є етичні міркування щодо виключення чи обмеження експериментів на теплокровних тваринах.

Більш того позитивною стороною альтернативної оцінки *in vitro* є її економічність, можливість проведення експериментів на культурі клітин людини, високий ступінь відтворення результатів дослідів і оперативність отримання інформації.

Різні автори також наводять дані, що свідчать про високі коефіцієнти кореляції і достатню вірогідність результатів при визначенні залежності між даними, отриманими на простих моделях і у дослідях на лабораторних тваринах.

Використання біологічних моделей *in vitro* є перспективним для скринінгу мутагенів і канцерогенів, встановленні ступеня токсичності нових хімічних речовин, готових форм і окремих компонентів лікарських засобів, консервантів, виробів медичного призначення та ін. У якості простих біомоделей рекомендують використання дріжджів, *E. coli*.

Процеси вільно-радикального окислення біомолекул, що призводять до ушкодження мембранних структур і ядерного хроматинового апарату клітин, відіграють значну роль в патогенезі багатьох хвороб та патологічних станів, а саме серцево-судинних та онкологічних захворювань, інтоксикацій чужорідними хімічними сполуками і променевих уражень, тому доклінічні методи їх дослідження є досить актуальними та необхідними [3].

В останні роки широкого розповсюдження набули методи оцінки антиоксидантних та антирадикальних властивостей за допомогою модельних систем *in vitro*. До них відносяться системи емульсії жовткових ліпопротеїдів або препаратів полієнових ВЖК для оцінки антиоксидантних властивостей. Також за рахунок експресності та доступності широко використовують системи, де в якості субстрата використовується певна реактивна молекула, наприклад адреналін як об'єкт окиснення в модельованих умовах [8].

Наведені дані щодо перспективності використання альтернативних методів при вивченні подразнюючої дії препаратів з використанням шкіри свині або миші [10].

Однією із актуальних проблем сучасної токсикології є оцінка селективної мембранотоксичної дії вперше синтезованих препаратів ще на стадії їх експериментального вивчення. Оскільки дослідження токсичної дії хімічних речовин на біологічні мембрани у дослідах *in vivo* є складним процесом, все більшого поширення набуває скринінг мембранотоксичної дії біологічно активних речовин у дослідах *in vitro* з використанням простих моделей мембран, зокрема еритроцитів. Уніфікація цих методів дає можливість екстраполювати дані на людину, що має важливе токсиколого-гігієнічне значення.

Оскільки при визначенні токсичності за допомогою простих моделей зростає вірогідність помилки прогнозу, необхідно формулювати показання і протипоказання до використання того чи іншого методу. На сучасному етапі

вирішенням цієї проблеми може бути тестування речовин на декількох простих моделях одночасно.

Таким чином, проблема впровадження альтернативних методів вивчення токсичності та біологічної активності різних хімічних препаратів у систему доклінічних досліджень залишається актуальною [16].

Мета дослідження: за допомогою методів доклінічної діагностики дослідити антиоксидантні властивості і токсичність похідних [1,2,4]триазол[1,5-А]піридину.

Об'єкт дослідження: похідні [1,2,4]триазол[1,5-А]піридину досліджені методом *in vitro*, властивості даного класу сполук, їх токсичність та практичне значення.

Предмет дослідження: біологічна активність та токсичні властивості потенційних лікарських препаратів - похідних [1,2,4]триазол[1,5-А]піридину в дослідках *in vitro*.

Завдання дослідження:

За допомогою модельних систем дослідити потенційні біологічні властивості та токсичність похідних [1,2,4]триазол[1,5-А]піридину, а саме:

1. Вивчення АОА потенційних БАР шляхом неферментативного ферум (II)-залежного ПОЛ.
2. Дослідження антирадикальних властивостей на моделі автоокиснення адреналіну.
3. Вивчення токсичності на моделі гемолізу еритроцитів.
4. Визначення класу токсичності потенційних БАР з використанням математичної моделі енергії хімічних зв'язків.

РОЗДІЛ 1

МЕТОДИ ДОКЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЯК АЛЬТЕРНАТИВА КЛАСИЧНИМ МЕТОДАМ ВИЗНАЧЕННЯ БАР

1.1. Загальна характеристика методів доклінічної діагностики.

Ми повинні спочатку встановити, що собою являють методи доклінічної діагностики(МДД). МДД – це сукупність біохімічних, фізико-хімічних методів, що являють собою безупинний процес, суть та етапність проведення яких визначається прогресом наукових знань й досліджень в галузях, суміжних із розробкою та впровадженням ліків: починаючи від хімічного синтезу до різноманітних фаз клінічних досліджень, й також праці практикуючого лікаря, юриста системи охорони здоров'я. Доклінічне дослідження лікарських засобів містить хімічні, фізичні, біологічні, мікробіологічні, фармакологічні, токсикологічні й інші експериментальні дослідження.

Будь-які доклінічні дослідження неможливі без методу експерименту, спостереження та аналізу. Ми на початку висуваємо припущення стосовно того, як повинна відбутися певна реакція, якщо кажемо про похідних [1,2,4]триазол[1,5-*a*]піридину або будь-які інші речовини, які можуть мати практичне значення у біохімії та медицині. Провівши необхідні досліди необхідно проаналізувати якомога точніше отримані результати. Так, для репрезентативності наших дослідів треба провести контрольний дослід та серію основних експериментів з певними умовами(реагентами). Цей перелік методів є загальний і кожен з них розкривається по-різному в залежності від мети та цілей дослідження.

Предметом доклінічного вивчення лікарських засобів є визначення їх дії перед початком клінічних випробувань. Вивченню властивостей можуть сприяти досліди *in vitro* так й *in vivo*. Для лікарських засобів природного походження, котрі за структурою й фармакологічними особливостями можна

прирівняти до препаратів, відносно яких наявний великий досвід використання в клінічній практиці, наприклад, токсикологічні дослідження можуть бути проводитись не в повному обсязі.

При проведенні доклінічного дослідження лікарського засобу на тваринних біоматеріалах необхідно враховувати наступне:

- 1) вибір придатного для досліджень виду тварин;
- 2) вік;
- 3) фізіологічний стан;
- 4) спосіб уведення тест-зразка, включаючи дозу, шлях уведення та режим застосування,
- 5) стабільність тест-зразка в умовах використання.

Передбачається, що доклінічні дослідження виконуються у відповідності до принципів Належної лабораторної практики (НЛП, Good laboratory practice, GLP). Однак у деяких випадках, коли може використовуватися тест-система, яка є специфічною для певної категорії лікарських засобів природного походження, випробування можуть не повністю відповідати вимогам НЛП. Кількість таких досліджень повинна бути означена та їх значимість оцінена згідно до загальної оцінки безпеки. Може бути виключення, коли, наприклад, дані досліджень не будуть використовуватися для забезпечення клінічних дослідів та реєстрації лікарського засобу, то й повна відповідність вимогам Належної лабораторної практики не є суттєвою.

З огляду на різноманітність й унікальність структури препаратів природного походження, їх біологічні властивості, обумовлені видовою специфічністю, імуногенністю і неочікуваною плейотропією, тоді загальновизнані підходи стосовно вивчення токсичності даних лікарських засобів можуть бути непридатними [7].

Проведення дослідження

Застосування одного чи більше методів доклінічних досліджень визначається в кожному конкретному випадку окремо на основі наукового

обґрунтування. Зазвичай вважається достатньо обґрунтованим використання якогось затвердженого методу. Наприклад, кількісний аналіз радіоактивності осаду трихлороцтовою кислотою після введення радіоактивно міченого білка дає можливість отримати певну інформацію, однак перевага надається спеціальному аналізу досліджуваної речовини. Необхідно щоб методи, котрі використовуються у доклінічних дослідках на тваринах, так й у випробуваннях на людях, були однаковими, оскільки багато біохімічних аспектів можуть співпадати. Потрібно визначати можливий вплив зв'язування білків плазми та/або антитіл в плазмі або сироватці крові на результати випробувань. Це робиться, як правило, за допомогою вивчення гемолізу еритроцитів від дії конкретної речовини певної концентрації в плазмі крові або *in vitro*.

Метаболізм

Бажаним наслідком метаболізму лікарських засобів є розпад на малі пептиди та окремі амінокислоти. Саме тому метаболічний шлях, в загальних рисах вченим достатньо зрозумілий. Дослідження біотрансформації лікарських засобів у класичному розумінні не є пріоритетною вимогою.

Для усвідомлення фармакодинамічної дії важливою стає інформація стосовно поведінки ліків природного походження в біологічному середовищі (наприклад, у плазмі чи сироватці крові, спинномозковій рідині тощо) й можливого впливу зв'язування з білками [47].

Вивчення факторів розвитку нефропатії на доклінічному етапі шляхом збору анамнезу та проведення лабораторних біохімічних дослідів можна попередити цю хворобу. Так, згідно з інформації з анкетування, методом підрахунку суми діагностичних балів, оцінки ступеню ризику розвитку нефропатій проведений аналіз дозволив відібрати потрібну кількість людей, які за сумою діагностичних балів склали групу ризику. Наступний етап доклінічної діагностики стосувався вже тільки людей, які були відібрані згідно з даних анкет до групи ризику та включають дослідження сечі біохімічними та біофізичними методами [17].

Сеча фактично являє собою кінцевий продукт обміну речовин й може бути використана як маркер характеристики процесів гомеостазу і стану здоров'я в цілому. Тобто найменші патологічні зміни з'являються в сечі достатньо рано, що суттєво важливо безпосередньо на доклінічному етапі діагностики. Позитивним аспектом також є зручність та доступність у роботі з даним біоматеріалом, можливість без шкоди для здоров'я людини робити багаторазово забір цієї потрібної рідини.

Таким чином, використавши методи спостереження та дослідження *in vitro* певний клас сполук ми маємо можливість з'ясувати властивості певної патології на біохімічному рівні. Так, у нормі певні сполуки мають бути відсутні, а їх наявність може свідчити про вміст, наприклад, прооксидантів, що є симптомом хвороби. Розділивши об'єкт нашого дослідження абстрагував його окремі, саме потрібні нам аспекти чи сторони, ми можемо проаналізувати певну речовину та її реакційні можливості і відповісти на поставлені запитання.

1.2. Методи доклінічної діагностики з використанням біологічних тест-систем

Потрібно ще раз зазначити основні методи проведення доклінічної діагностики у загальних аспектах:

1. *in vivo*
2. *in vitro*
3. *in situ*

In vivo не підходить у наших дослідженнях, оскільки цей метод передбачає проведення на живому організмі або на його живій тканині. Прикладами експериментів *in vivo* можуть бути експерименти на лабораторних тваринах чи клінічні випробування, наприклад, на бактеріальних клітинах.

In situ є вивченням процесу на тому самому місці, де він безпосередньо відбувається. Цей метод є щось середнє між умовами *in vivo* та *in vitro*. Якщо вивчення клітини усередині цілого органу відбувається, наприклад, під

перфузією — це і є *in situ* експеримент, але такі клітини найвірогідніше загинуть.

Нашим основним методом буде *in vitro*. Він є найбільш поширеним та зручним для лабораторних досліджень, коли немає часу чи можливості проводити експерименти, наприклад, на мишах або коли бактерії не є доцільним піддослідним об'єктом.

Якщо розглядати методи досліджень стосовно аспектів наук, яких ті безпосередньо торкаються, та які були використані у цій праці, то ми можемо виділити наступні

1. *Біохімічні*(специфічні реакції взаємодії при різних умовах та з різними реагентами до кожної відповідно: якісні та кількісні реакції)
2. *Біофізичні*(фотометрія, спектрографія, рентгенографія і т.д.)

Але що саме собою являють МДД з використанням біологічних тест-систем? Біологічні тест-системи – це послідовність проведення певних повторюваних досліджень з використання живих істот або їх біоматеріалу.

До найвідомішого застосування біохімічних методів дослідження можна віднести біохімічне дослідження крові. Так, наприклад, вчені, такі як В. І. Левченко, Ю. М. Новожицька та В. В. Сахнюк виділяють наступні біохімічні аспекти дослідження крові тварин:

- Дослідження білкового обміну
- Дослідження ліпідного обміну
- Дослідження вуглеводного обміну
- Ферментодіагностика
- Дослідження кислотно-основного балансу
- Дослідження пігментного обміну
- Дослідження обміну вітаміну А
- Дослідження обміну мікроелементів та мікроелементів

Кожен аспект складається з сукупності показників і є взаємопов'язаним з іншими факторами крові, оскільки кров – сполучна тканина, яка як і будь-яка

інша тканина характеризується анаболізмом та катаболізмом у клітинному та міжклітинному середовищі. Це обмінні реакції, накопичення корисних речовин та їх використання, виведення прооксидантів та інших речовин, що можуть заважати повноцінному функціонуванню живої біосистеми.

Використання біологічних тест-системи проводиться з наявністю відповідного біоматеріалу та спеціальних реактивів. Одним із найважливіших аспектів для первинного дослідження крові тварин та людей є вміст «цукру» - глюкози. Для цього є спеціалізований **глюкозо-оксидазний метод**.

Метод виглядає наступним чином: Глюкоза у присутності глюкозо-оксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти й водню пероксиду. Перекис за наявності пероксидази входить у реакцію з фенолом і 4-амінофеназоном із утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору. Насиченість та інтенсивність кольору визначається за допомогою фотометричного аналізу (тобто ми переходимо до біофізичних методів).

Що потрібно для дослідження:

- КФК-2, КФК-3 або спектрофотометр,
- центрифуга,
- водяна баня,
- піпетки 0,2; 0,5; 2 мл,
- пробірки.

Реактиви:

- 1) розчин ферментів (найчастіше пероксидаза);
- 2) фосфатний буферний розчин (рН 7,4), чда;
- 3) антикоагулянт (суха суміш 0,536 г натрію щавлевокислого і 3,4 г натрію хлориду), чда;
- 4) калібрувальний розчин (вміст глюкози – 10,0 ммоль/л), чда[2].

Біофізичні методи дослідження відрізняються від біохімічних тим, що вони безпосередньо не вступають в реакцію з досліджуваною речовиною. Дуже яскравим прикладом є методи спектрального аналізу та ядерно-магнітного резонансу, де хвилі певної довжини й частоти проходять крізь речовину, або суміш таких речовин, та спеціальний прилад реєструє зміну сигналу.

Основні спектральні методи для визначення будови і концентрації речовин поділяють на:

- 1) ІЧ-спектроскопія;
- 2) Спектр комбінаційного розсіювання;
- 3) УФ-спектроскопія;
- 4) Колориметричний метод (видима спектроскопія).

Біофізичні методи можуть включати в себе і інші, наприклад:

1. Рентгенографію;
2. Ультразвукову доплерографію[52];
3. Волюмометрію (наприклад кісток або органів з певним відносно постійним об'ємом);
4. Кондуктометрію;
5. Гравіметрію (зваження) і т.і.

Всі з вищеперерахованих методів можуть бути використані для отримання чіткого результату при аналізі крові, вивчення розчину похідних піримідину та інших органічних сполук, встановлення кількості та якості зразка, з'ясування вмісту то або іншої речовини у складному розчині (наприклад, лімфа, спинномозкова рідина і т.і.). Цей перелік можна продовжити й надалі, але зазначених методів та сфер їх застосування, вважаємо достатньо для ознайомлення і глобального розуміння.

На сьогодні відомо, що через різноманітні патологічні стани починається синдром ендогенної інтоксикації, обумовлений високим розпадом тканин, пришвидшеними процесами катаболізму, недостатністю функції печінки і нирок, яке виникає при порушенні процесів мікроциркуляції й регуляції

агрегатного стану крові та лімфи, порушення газообміну, функції імунореактивної системи. Можливість постійного моніторингу таких метаболітів з використанням клітинних тест-систем вигідно відрізняють їх від стандартних методів дослідження, що потребують більше матеріальних витрат та часу на власне виконання. Тому клітинні тест-системи як інструмент скринінг-діагностики є перспективним дослідницьким напрямком, а їх використання стає більш затребуваним у різноманітних сферах діяльності [19].

Достатньо інформативними стали результати біоіндикації цитотоксичних факторів із застосуванням клітинної тест-системи *D. viridis* у сироватці крові пацієнтів з різними зворотними патологічними станами [15]. Встановлено достовірні відмінності співвідношення кількості змінених клітин залежно від їх загального числа. Так, шляхом експерименту довели, що найвищий цитотоксичний ефект на клітини водорості *D. Viridis* спричиняла сироватка крові хворих на цироз печінки, а найменшу негативний вплив спричиняла сироватка крові хворих з судинними патологіями. Згідно з цими отриманими даними визначили та візуалізували образ формо-функціональних змін клітин. Які є як біосенсор у системі координат, розраховували сумарні коефіцієнти та індекси цитотоксичності сироватки для таких хвороб як цироз печінки, онкологію товстої кишки, панкреатит, міастенія, термічні опіки і судині захворювання.

Отже, ми можемо підтвердити високу специфічність клітин *D. viridis* щодо цитотоксичної дії різноманітних факторів. Саме через те комплексне оцінювання спектру морфо-функціональних показників клітин *D. viridis* з подальшим розрахунком інтегральних коефіцієнтів цитотоксичності можна розглядати як скринінговий метод біоіндикації патологічного стану.

У роботі Клімової О.М. і Лавінської О.В. приведені результати дослідження впливу цитотоксичних компонентів сироватки крові з різними критичними станами на клітини мікрowodорості *D. viridis* [14]. Показано, що при різних захворюваннях відмічається чітка гетерогенність ефектів у клітинній

тест-системі. Проведено серію експериментів щодо вивчення дозової залежності цитотоксичних ефектів шляхом послідовних розведень сироваток крові хворих з різними патологіями. Даний феномен дозволяє проводити не лише попередній скринінг патологічних станів, але й кількісно оцінити посилення або зниження цитотоксичності сироватки під впливом екзогенних біологічних та хімічних чинників.

1.3. Методи доклінічної діагностики з використання фізико-хімічних систем.

Спочатку треба дати визначення і пояснити, що собою являють «фізико-хімічні системи». Так, фізико-хімічні системи являють собою фізико-хімічний аналіз, який є методом дослідження перетворень речовини, заснований на вивченні залежності між величинами, що характеризують фізичні властивості рівноважної системи, та її хімічним складом.

Наслідки досліджень зображають на графіку «властивість — склад». Якщо обмежитись однією властивістю ε (наприклад, питома вага, електропровідність, в'язкість тощо) і з факторів рівноваги урахувати тільки склад, температуру та тиск, то для системи з компонентів (незалежні складові) шукана залежність може бути подана у вигляді емпіричного рівняння [28].

Фізико-хімічний аналіз є найзагальнішим методом дослідження речовин і тому широко застосовується в усіх галузях хімії та прикладних науках (мінеральній й органічній технологіях, металургії, мінералогії та інші).

Використання фізико-хімічних методів аналізу (ФХМА) (їх ще називають інструментальними методами), є окремим розділом аналітичної хімії, завданням якого є визначення кількісного і якісного складу речовин за зміною їх фізико-хімічних властивостей. Усі аналітичні методи ґрунтуються на одержанні і вимірюванні аналітичного сигналу, тобто будь-якого прояву хімічних і фізичних властивостей об'єкту аналізу, який можна використати для

визначення кількісної оцінки компонентів речовини або для визначення її якісного складу.

Аналітичним об'єктом може бути індивідуальна сполука в будь-якому агрегатному стані, суміш сполук, природний об'єкт (руда, вода, повітря, тощо), промислові та харчові вироби. ФХМА включають електрохімічні, спектроскопічні (оптичні), люмінесцентні, кінетичні, термометричні, хроматографічні методи. В цих методах вимірюють аналітичний сигнал, який утворюється за участю зовнішніх (валентних) електронів і функціонально пов'язаний з природою і концентрацією речовини [63].

У біохімії можуть застосовувати фізико-хімічні системи досліджень, які складаються з груп методів, а ті в свою чергу налічують окремі методи. Фізико-хімічні методи можуть ставати системою досліджень, оскільки ще немає єдиного методу, який здатний відповісти на всі питання стосовно певної досліджуваної сполуки, а саме структури молекули, хімічний склад, просторова форма, наявність і кількість ізомерів, реакційна здатність і т.д. Тому кожен біохімічний, фізичний чи фізико-хімічний метод досліджень слід брати окремо щоб скласти у купу отримані дані про речовину. Так, до фізико-хімічних методів належать наступні:

- 1) електрографія;
- 2) спектроскопія;
- 3) хроматографічні;
- 4) термометричні;
- 5) кінетичні.

Дана класифікація не є вичерпною. Кожен з наведених методів є загальною назвою групи методів. Наприклад, зміна температури веде за собою зміну тиску. Так, до спектроскопічних методів відноситься ІЧ та УФ спектрометрія. Також не слід нехтувати методом ядерно-магнітного резонансу, на основі якого зараз використовують МРТ-апарати, які незамінні при діагностуванні багатьох хвороб та є набагато ефективніші й безпечніші за рентгенографію.

1.4. Методи доклінічної діагностики для оцінки небезпеки потенційних біологічно активних речовин (визначення токсичності).

Є 4 класи токсичності різних речовин, які використовуються у якості ліків, пестицидів, отрути і т.і. Токсичність можна визначити методами доклінічної діагностики. Розглянемо на прикладі пестицидів.

Пестициди підрозділяються на чотири класи небезпечності:

I - надзвичайно небезпечні;

II - небезпечні;

III - помірно небезпечні;

IV - малонебезпечні.

1.2. Клас небезпечності пестицидів встановлюється в залежності від показників, наведених у таблиці.

1.3. Віднесення пестициду до конкретного класу небезпечності ґрунтується на принципі комплексної оцінки властивостей з урахуванням лімітуючого критерію шкідливості, тобто оцінка здійснюється за критерієм, який визначає найбільшу небезпеку пестициду для здоров'я людини.

1.4. Клас небезпечності пестициду визначається фахівцями-експертами медико-біологічного профілю.

1.5. Класифікації підлягають діюча речовина та її препаративні форми.

Якщо препаративна форма відрізняється за ступенем небезпечності від діючої речовини, вона може бути віднесена до іншого класу небезпечності. Враховують особливості препаративної форми (летючість, можливість виділення пилу, та ін.). Якщо пестицид утворює в процесі трансформації та розпаду більш небезпечні хімічні сполуки, клас небезпечності пестициду визначається властивостями таких сполук [21].

Таблиця 1

Пестициди. Класифікація за ступенем небезпечності

Критерії небезпечності*	Класи небезпечності			
	I	II	III	IV
Середня смертельна доза при введенні в шлунок, мг/кг:				
- тверді форми препарату	менше 15	15-50	51-500	більше 500
- рідкі форми препарату	менше 50	50-200	201-2000	більше 2000
Середня смертельна доза при нанесенні на шкіру, мг/кг:				
- тверді форми препарату	менше 10	10-100	101-1000	більше 1000
- рідкі форми препарату	менше 40	40-400	401-4000	більше 4000
Середня смертельна концентрація в повітрі, мг/куб. м	менше 500	500-5000	5001-50000	більше 50 000
Коефіцієнт можливості інгаляційного отруєння	більше 10	10-2,1	2-0,5	менше 0,5
Коефіцієнт кумуляції	менше 1	1-3	3,1-5	більше 5
Подразнююча дія	Сильний подразник	Помірним подразник	Слабкий подразник	Подразнюючої дії не виявлено
Алергенність	Сильний алерген	Помірний алерген	Слабкий алерген	Алергенної дії не виявлено
Мутагенність	Індукує генні і хромосомні мутації у всіх тест-об'єктів, тому числі ссавців in vivo	Індукує генні і хромосомні мутації у окремих тест-об'єктів, за винятком ссавців in vivo	Індукує або генні, або хромосомні мутації у обмеженого кола тест-об'єктів - нессавців	Порушення у структурі та функції генетичного апарату не можна кваліфікувати як мутації
Канцерогенність	Канцероген для людини	Ймовірний канцероген для людини	Малоймовірний канцероген для людини	Канцерогенність не встановлена
Тератогенність	Доведено тератогенність для людини	Сильний тератоген для тварин	Слабкий тератоген для тварин	Ефект не спостерігається
Ембріотоксичність	Ефект на	Сильний	Слабкий	Ефект не

	людях обліку не піддається	ефект при дії доз, не- токсичний для самок	ефект. Спо- стерігаєть- ся поряд з іншими токсичними ефектами	спостері- гається
Репродуктивна токсичність	Виражена	Помірна	Слабка	Репродук- тивна токсичність відсутня
Стабільність у воді, Т-33, діб**	Більше 30	30-11	10-5	Менше 5
Стабільність у грунті, Т-30, діб	Більше 60	60-31	30-11	Менше 11
Глибина міграції по грунтовому профілю, см	Більше 50	50-21	20-10	Менше 10
Коефіцієнти міграції: грунт-рослини	Більше 0,5	0,5-0.11	0,1-0,02	Менше 0,02
грунт-вода	Більше 0,1	0,1-0,05	0,04-0,01	Менше 0,01
грунт-повітря	Більше 0,1	0,1-0,02	0,01-0,005	Менше 0,005
Стійкість у вегетуючих сільсько- господарських культурах та сільськогоспо- дарській сировині, Т-30, діб	Більше 30	30-13	14-5	Менше 3

* тлумачення термінів та критеріїв, що згадуються в таблиці, викладено в додатках 1 та 2.

** відповідно діючого ГОСТ 17.1.3.04-82 "Гидросфера. Общие требования к охране поверхностных и подземных вод от загрязнения пестицидами 7"

Істотним фактором при підготовці доклінічних досліджень токсичності є правильність вибору тест системи. Ще у XIX сторіччі французький фізіолог Клод Бернар (1813–1878) вперше довів, що досліди на тваринах дозволяють зробити висновок стосовно токсичності речовини для людини. С тих часів і до сьогодні використання лабораторних тварин, особливо при проведенні токсикологічних досліджень, здатних викликати біологічний стрес, більшові

відчуття, й навіть часто смерть, є предметом стурбованості суспільства. Так у зв'язку з цим у 1959 році Руссел та Бірч вперше сформулювали важливу концепцію «*трьох R*»:

- *replacement* (заміна) – під час проведення досліджень тварини можуть використовуватись тільки у тому випадку, коли альтернативна модель не забезпечує отримання необхідної інформації;
- *reduction* (скорочення) – необхідно використати чим меншу кількість тварин, необхідну для отримання обґрунтованих та статистично значимих даних;
- *refinement* (удосконалення) – необхідність у зменшенні дії стресогенних факторів, які здатні впливати на адекватність результатів експерименту, використовувати максимально гуманні, позбавлені насилля методів.

На протязі наступних років дана концепція знайшла власне відображення у політиці, законодавчих документах та настановах державних та наукових установ у всьому світі, стала основним принципом в діяльності вчених, зумовила суттєві зміни в методах проведення досліджень. Вчені спрямували свої зусилля на розробку прийнятних альтернативних методів, котрі б передбачували страждання тварин у експериментах на культурі клітин, тканин, мікроорганізми тощо. Слід додати, що з 1999 року за рекомендацією регламентуючих органів у сфері реєстрації ЛЗ на міжнародному рівні гармонізовано оцінку генотоксичності за стандартною батареєю тестів, до яких, поряд з вивченням хромосомних пошкоджень у клітинах гематопоезу гризунів *in vivo*, входять методи *in vitro*. [7; 4].

Аналітичним сигналом встановлення різноманітних цитотоксичних сполук у біологічних рідинах стає його реакція на подразник, котрим, наприклад, можуть являтися токсичні речовини середовища, біологічних рідин або будь-які подібні біологічно активі речовини, які стають причинами порушення життєвих функцій індикаторного організму або навіть його загибель [18].

Для того, щоб оцінити токсичність біологічних рідин у доклінічній діагностиці вже досить тривалий час використовують парамеційний тест. Суть методу полягає у визначенні часу життєздатності парамецій (інфузорій) – «парамеційного часу» за наявності токсичного чинника, котрий знаходиться в біологічній рідині. Для контролю визначають час виживання інфузорій у присутності плазми або сироватки крові здорових людей. Для цього до досліджуваної біологічної рідини додають стільки ж завісі 11-15 добової культури парамецій, старанно перемішують та за допомогою мікроскопіювання встановлюють час повної загибелі парамецій. Тривалість життєздатності парамецій при додаванні їх культури в біологічні рідини здорових людей складає 25-30 хвилин. Вираховують кількість токсичного фактору досліджуваної рідини, яка виражається в умовних токсичних одиницях [11].

Піримідин з його похідними являються дуже важливими об'єктами для біохімічного синтезу і розробки на їхній основі новіших лікарських засобів. Популярне практичне застосування ряду речовин з піримідиновим гетероциклом в медичній практиці. Ми можемо провести прогнозований скринінг біологічної активності, цитотоксичності й токсикологічної дії на щурах деяких синтезованих тіосульфонатів піримідину з використанням відповідних комп'ютерних програм. Приблизно розраховано, що такі речовини є малотоксичними із широким спектром біологічної дії й високим значенням вірогідної активності, що засвідчує доцільність продовження експериментальних досліджень їхньої біологічної дії, наприклад, протиракової. Особливої уваги для поглибленого вивчення заслуговує S-(4,6-диметилпіримідин-2-іл) бензенсульфонотіоат [22].

РОЗДІЛ 2

ДОКЛІНІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІЖЕННЯ ВІЛЬНО-РАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В УМОВАХ IN VITRO

2.1. Загальна характеристика природних антиоксидантів та їх класифікація

Антиоксиданти - це сполуки, які пригнічують окислення, хімічну реакцію, яка може призвести до утворення вільних радикалів. Це може призвести до полімеризації та інших ланцюгових реакцій. Їх часто додають до промислових продуктів, таких як паливно-мастильні матеріали, щоб запобігти окисленню, а також до харчових продуктів, щоб запобігти псуванню, зокрема прогорканню олій і жирів. У клітинах антиоксиданти, такі як глутатіон, мікотіол або бацілітіол, та ферментні системи, такі як супероксиддисмутаза, можуть запобігти пошкодженню внаслідок окисного стресу.

Зараз антиоксиданти класифікують за такими критеріями:

- 1) походження;
- 2) хімічна будова;
- 3) механізм дії.

Стосовно походження антиоксиданти ділять на природні (біоантиокисники) та синтетичні [5]. Механізм дії та безпосередньо хімічна будова залежать від розташування основи і замісників у молекулі, адже чим складніші неорганічні й органічні – тим більше ізомерів вони можуть мати. Багато сполук мають однакову брутто-формулу, але є дуже різними, то їх структуру потрібно писати завжди повністю або через назву на номенклатурою IUPAC.

Єдиними дієтичними антиоксидантами є вітаміни А, С і Е, але термін антиоксидант також застосовувався до багатьох інших дієтичних сполук, які мають антиоксидантні властивості лише *in vitro*, з незначними доказами

антиоксидантних властивостей *in vivo* [59]. Дієтичні добавки, що продаються як антиоксиданти, не здатні підтримувати здоров'я, замінити «прогалини» у харчуванні або запобігти захворюванням у людей [32].

Слід зазначити, що є т.з. «парадокс у метаболізмі», який полягає в тому, що, хоча переважна більшість складного життя на Землі потребує кисню для свого існування, кисень є дуже реактивним елементом, який завдає шкоди живим організмам, утворюючи активні форми кисню. Отже, організми містять складну мережу антиоксидантних метаболітів і ферментів, які працюють разом, щоб запобігти окислювальному пошкодженню клітинних компонентів, таких як ДНК, білки та ліпіди[55]. У цілому, антиоксидантні системи або запобігають утворенню цих реактивних видів сполук, або видаляють їх до того, як вони можуть пошкодити життєво важливі компоненти клітини[38]. Але активні форми кисню також виконують корисні клітинні функції, такі як передача окисно-відновних сигналів. Таким чином, функція антиоксидантних систем полягає не в повному видаленні окислювачів, а в підтримці їх на оптимальному рівні.

У якості дуже відомого антиоксиданту слід розглянути аскорбінову кислоту. Вітамін С – зокрема, у формі аскорбату – виконує численні фізіологічні функції в організмі людини, служачи ферментним субстратом або кофактором і донором електронів . Ці функції включають синтез колагену , карнітину та нейромедіаторів; синтез і катаболізм тирозину; і метаболізм мікросом. Під час біосинтезу аскорбат діє як відновник, віддаючи електрони та запобігаючи окисненню, щоб утримувати атоми заліза та міді у відновленому стані.

Вітамін С функціонує як кофактор для таких ферментів:

- Три групи ферментів (проліл-3-гідроксилази, проліл-4-гідроксилази та лізилгідроксилази), необхідні для гідроксилювання проліну та лізину в синтезі колагену [53]. Ці реакції додають гідроксильні групи до амінокислот проліну або лізину в молекулі колагену через пролілгідроксилазу та лізилгідроксилазу ,

для обох потрібен вітамін С як кофактор. Роль вітаміну С як кофактора полягає в окисненні пролілгідроксилази та лізилгідроксилази з Fe²⁺ до Fe³⁺ і у відновленні з Fe³⁺ до Fe²⁺.

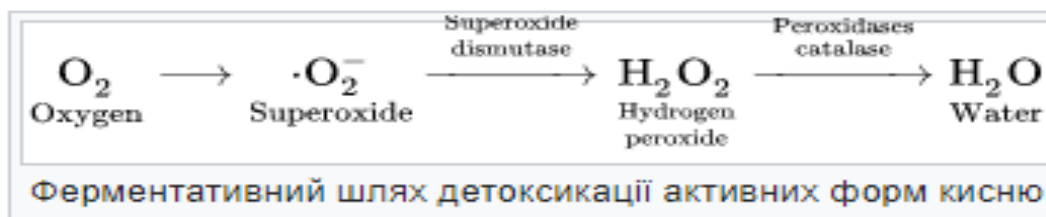
- Для синтезу карнітину необхідні два ферменти (ε-N-триметил-L-лізин гідроксилаза та γ-бутиробетаїн гідроксилаза) [31]. Карнітин необхідний для транспортування жирних кислот у мітохондрії для генерації АТФ.

- Ферменти проліндіоксигенази фактора, індукованого гіпоксією (ізоформи: EGLN1, EGLN2 та EGLN3) [31].

- Дофамін-бета-гідроксилаза бере участь у біосинтезі норадреналіну з дофаміну.

- Пептидилгліцинальфа-амідуєча монооксигеназа амідуює пептидні гормони, видаляючи залишок гліоксилату з їхніх С-кінцевих залишків гліцину. Це підвищує стабільність і активність пептидного гормону.

Як і у випадку з хімічними антиоксидантами, прооксиданти захищають клітини від окислювального стресу взаємодіючою мережею антиоксидантних ферментів. Тут супероксид, що вивільняється в результаті таких процесів, як окисне фосфорилування, спочатку перетворюється на перекис водню, а потім далі відновлюється з утворенням води. Цей шлях детоксикації є результатом кількох ферментів, причому супероксиддисмутази каталізують перший етап, а потім каталази та різні пероксидази видаляють перекис водню. Як і у випадку з антиоксидантними метаболітами, вклад цих ферментів у антиоксидантний захист може бути важко відокремити один від одного, але створення трансгенних мишей, у яких відсутній лише один антиоксидантний фермент, може бути інформативним [46].



2.2. Вільнорадикальні процеси та оксидативний стрес.

В даний час встановлено, що виникнення та розвиток широкого кола запальних захворювань супроводжується активацією вільнорадикальних реакцій (ВРР) перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), денатурації білків та нуклеїнових кислот. Ці реакції називаються так, тому що вони ініціюються та розвиваються за участю т.зв. вільних радикалів. Вільні радикали – це молекули або частинки, що володіють не спареними електронами.

Радикали, що утворюються в клітині, можуть ініціювати вторинні вільнорадикальні реакції, вступаючи у взаємодію з різними клітинними компонентами: білками, нуклеїновими кислотами і ліпідами. В результаті цих ВРР відбувається деградація молекул-мішеней з утворенням більш менш стабільних продуктів реакцій, ідентифікація та визначення кількості яких може бути параметром або маркером, що визначає швидкість ВРР. Найчастіше використовуваним маркером ініціації ВРР є визначення продуктів перекисної деградації фосфоліпідів клітинних мембран та ліпопротеїдів плазми крові: кон'югованих дієнів та гідроперекисів ненасичених жирних кислот, алканів та альдегідів, зокрема малонового діальдегіду[64].

Вивчення антиоксидантної активності (АОА) потенційних біологічної активності речовин (БАР) шляхом неферментативного ферум (II)-залежного перехресного окиснення ліпідів(ПОЛ) є основою вивчення вільно радикальних процесів та оксидативного стресу.

Перекисне окислення ліпідів є основним наслідком окисного стресу та важливою причиною пошкодження нейронів при ішемічних пошкодженнях і нейродегенеративних розладах, таких як хвороба Паркінсона.

Як приклад можна привести дослідження, яке було зосереджене на розробці антиоксидантних препаратів, які можуть затримати або мінімізувати нейродегенерацію. Тому для оцінки нових антиоксидантних сполук необхідні швидкі та надійні аналізи. Широко поширеним методом вимірювання

перекисного окислення ліпідів є аналіз речовин, що реагують на тіобарбітурову кислоту (TBARS). У літературі з'явилося кілька варіантів цього методу, деякі з яких були протестовані нами безуспішно. Таким чином, ми створили надійну процедуру, яка враховує найважливіші фактори, раніше виявлені, що впливають на метод TBARS. коротко, різні концентрації препарату додавали до гомогенатів головного мозку щурів (10% мас./об. у 20 мМ Трис-НСІ буфері, рН 7,4) та інкубували при 37°C протягом 10 хв перед додаванням сульфату заліза амонію (100 або 1000 мкМ) і подальша інкубація при 37°C протягом 30 хв. Потім білки осаджували 8,1% додецилсульфатом натрію, реакцію зупиняли 20% оцтовою кислотою, а потім зразки центрифугували протягом 15 хв. Аликвоти супернатанту додавали до рівного об'єму тіобарбітурової кислоти (0,8%), зразки нагрівали при 95°C протягом 30 хвилин, а потім охолоджували на льоду перед зчитуванням при 532 нм.

Ця адаптація являє собою простий і високовідтворюваний аналіз, який не потребує складних процедур екстракції з небезпечними хімічними речовинами та забезпечує стабільний хромаген. Метод було оцінено з використанням ряду структурно відмінних антиоксидантів і хелаторів заліза. ІС₅₀ значень (мкМ) для відсоткового інгібування утворення TBARS були такими: десфероксамін (1,1), U83836E (1,7), бутильований гідрокситолуол (13), U74500A (20), LY231617 (22), ідебенон (89) і тролокс (110).). Цей порядок ефективності можна порівняти з тим, що був знайдений у комерційно доступному, але дорогому наборі, розробленому спеціально для вимірювання малонового діальдегіду (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена, $p < 0,01$)[33].

Оксидативний стрес відображає дисбаланс між системним проявом активних форм кисню та здатністю біологічної системи легко детоксикувати реактивні проміжні продукти або відновлювати отримані пошкодження. Порушення нормального окисно-відновного стану клітин може спричинити токсичні ефекти через утворення перекисів і вільних радикалів, які пошкоджують усі компоненти клітини, включаючи білки, ліпіди та ДНК .

Окислювальний стрес, викликаний окисним метаболізмом, викликає пошкодження основ, а також розриви ланцюгів ДНК [34].

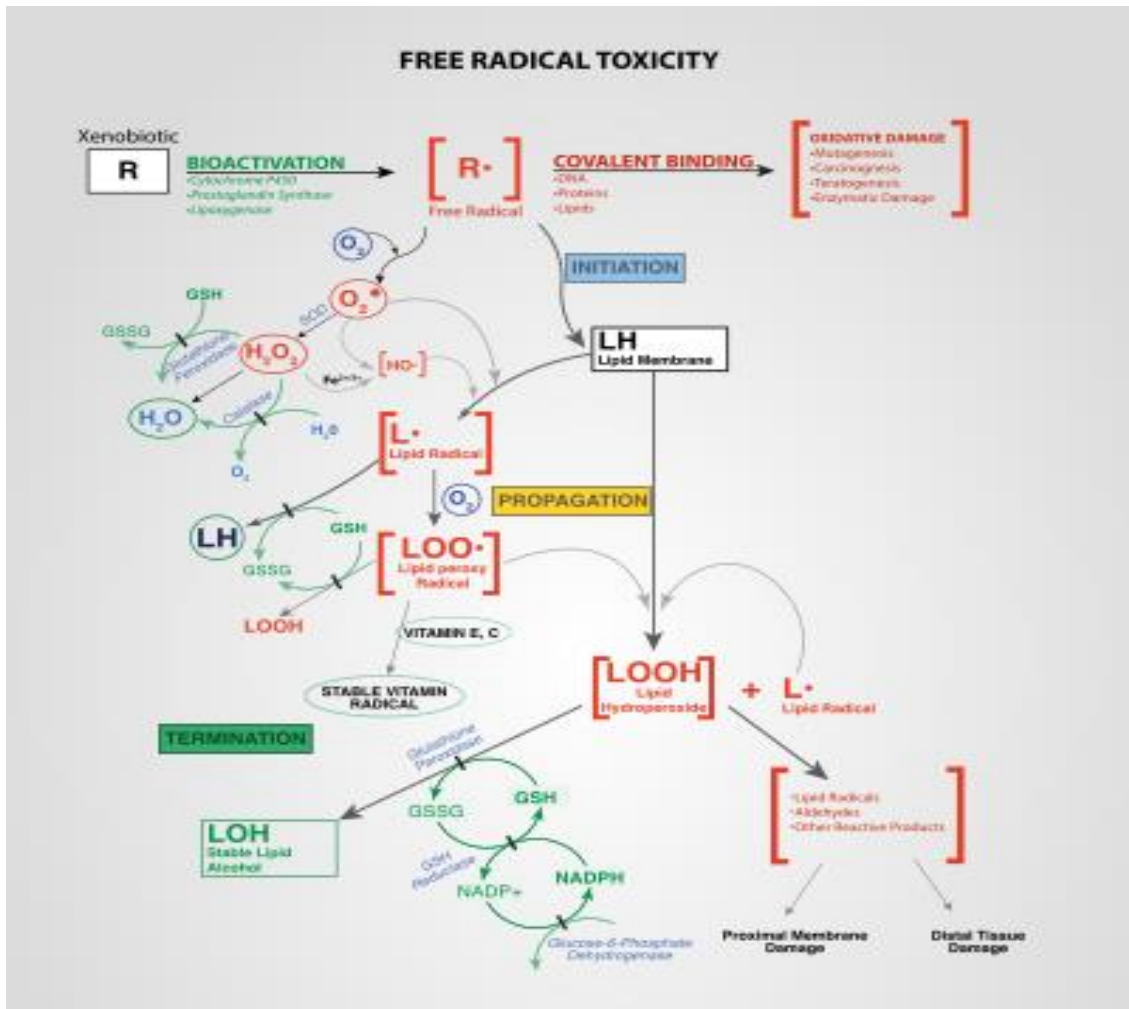


Схема 2.1. Механізми окисного стресу при пошкодженні тканин. Токсичність вільними радикалами, викликана ксенобіотиками, і подальша детоксикація клітинними ферментами (термінація).

Окисник	опис
$\cdot\text{O}_2^-$, супероксид-аніон	Одноелектронний стан відновлення O_2 , що утворюється в багатьох реакціях автоокислення та ланцюгом транспортування електронів . Швидше не реагує, але може вивільняти Fe^{2+} із залізо-сірчаних білків і феритину . Зазнає дисмутації з утворенням H_2O_2 спонтанно або шляхом ферментативного каталізу і є попередником утворення $\cdot\text{OH}$, яке каталізується металом.
H_2O_2 , перекис водню	Двоелектронний стан відновлення, утворений дисмутацією $\cdot\text{O}_2^-$ або прямим скороченням O_2 . Ліпідорозчинний і тому здатний дифундувати через мембрани.
$\cdot\text{OH}$, гідроксильний радикал	Триелектронний відновний стан, утворений реакцією Фентона та розкладанням пероксинітриту . Надзвичайно реактивний, атакує більшість клітинних компонентів
ROOH , органічний гідропероксид	Утворюється в результаті радикальних реакцій з клітинними компонентами, такими як ліпіди та нуклеоснови .
$\text{RO}\cdot$, алкокси та $\text{ROO}\cdot$, пероксирадикали	Киснецентровані органічні радикали. Ліпідні форми беруть участь у реакціях перекисного окислення ліпідів . Утворюється в присутності кисню радикальним приєднанням до подвійних зв'язків або відривом водню.
HOCl , хлорноватиста кислота	Утворений від H_2O_2 за допомогою мієлопероксидази . Ліпідорозчинний і високоактивний. Легко окислює білкові складові, включаючи тіолові групи , аміногрупи та метіонін .
ONOO^- , пероксинітрит	Утворюється в швидкій реакції між $\cdot\text{O}_2^-$ і HNO . Ліпідорозчинний і подібний за реакційною здатністю до хлорноватистої кислоти. Протонування утворює пероксиазотисту кислоту, яка може зазнавати гомолітичного розщеплення з утворенням гідроксильного радикалу та діоксиду азоту .

Оксидативний стрес має свої складові – окисники. Кожному з них притаманні певні властивості. У цій таблиці зібрані дані, що достатньо описують кожен окисник [39].

2.3. Штучні антиоксиданти як альтернатива: хімічна природа та особливості застосування.

Слід зазначити, що антиоксиданти бувають природні та штучні. Природні АО можуть бути синтезовані у лабораторіях. Але є такі АО, які повністю створені і синтезовані людиною штучним шляхом.

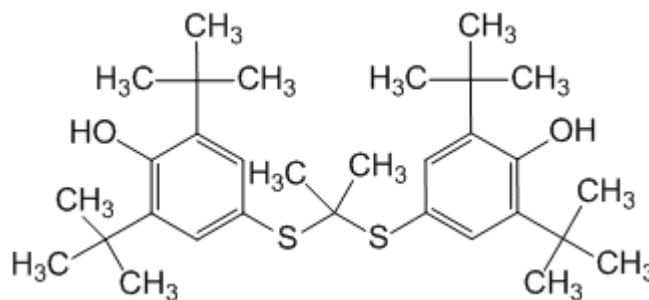
Речовин, що мають вплив безпосередньо на швидкість перекисного окиснення ліпідів, розділяють на такі групи: прооксиданти (хімічні сполуки, що пришвидшують процеси перекисного окиснення) і антиоксиданти хімічні сполуки, котрі гальмують процеси ПОЛ) [40].

Антиоксидантом може бути визнана будь-яка хімічна речовина, яка при наявності у відносно малих концентраціях порівняно з субстратом, який окиснюється, суттєво гальмує чи навіть повністю перешкоджає окисленню цього субстрату [42].

Не дивлячись на те, що процес перекисного окиснення безпосередньо розвивається у формі ланцюгових реакцій в ліпідній фазі клітинних мембран й ліпопротеїнів, початкові (вірогідно, й проміжні) стадії цієї складної реакційної системи проходять у водній фазі. Певна частина систем захисту клітини також знаходиться у ліпідній фазі, а частина – у водній фазі. В залежності від цього ми можемо говорити про гідрофільні та гідрофобні антиоксиданти.

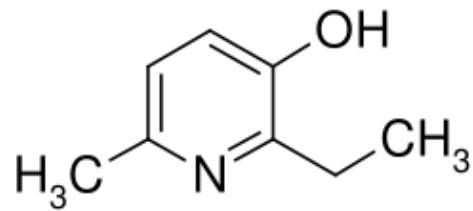
До відомих синтетичних антиоксидантів належать *пробукол*, *мексидол*, *групи оксипіридинів і тіотриазолін*. Їх перелік може бути продовжений і надалі. Але ми розберемо такі найвідоміші речовини та їх стисло опишемо їх АОА.

Пробукол (торгова назва Lorelco) - це лікарський засіб, який є антигіперліпідемічним препаратом [60], спочатку розробленим для лікування ішемічної хвороби серця. Клінічна розробка була припинена після того, як було виявлено, що препарат може мати небажаний ефект зниження рівня ЛПВЩ у пацієнтів із серцевими захворюваннями в анамнезі. Це також може спричинити подовження інтервалу QT.



Структурна формула пробуколу

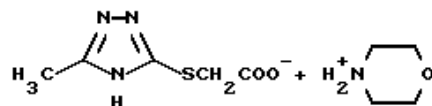
Мексидол (також Мексифін або 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридин) – за заявою виробника є антиоксидантом, який надає антигіпоксичну, мембранопротекторну, ноотропну, протисудомну та анксиолітичну дію. Його хімічна структура нагадує піридоксин (по типу вітаміну B₆).



Структурна формула мексидолу

Окспіридини – це група азотовмісних гетероциклічних фенолів, синтетичних аналогів вітаміну В6. Їх перевагою є розчинність у воді. У клінічній практиці використовуйте 3-гідрокси-6-метил-2-етилпіридин або 6-метил-2-етилпіридин-3-ол гідрохлорид є похідним 3-гідроксипіридину. Препарат має пряму антирадикальну дію. Ефективний під час швидкого надмірного зростання вільнорадикальних процесів. Препарат призначають при гострій променевої хворобі, при впливі високої освітленості інтенсивності (ретинопротекторний ефект) використовується для місцевого лікування с пародонтит, гінгівіт, стоматит. Побічні ефекти зазвичай не спостерігаються. Іноді в у місці введення емоксипіну може виникнути біль, свербіж, почервоніння. Відзначено індивідуальна непереносимість [61].

Тіотриазолін – це синтетичний лікарський препарат, що застосовується як кардіопротектор та гепатопротектор, який має антиоксидантну, мембраностабілізуючу, антиішемічну, антиаритмічну, імуномодулюючу, протівірусну та регенеративну дію. Тіотриазолін є першим оригінальним лікарським препаратом, створеним українськими науковцями[2], та запровадженим у широку клінічну практику.

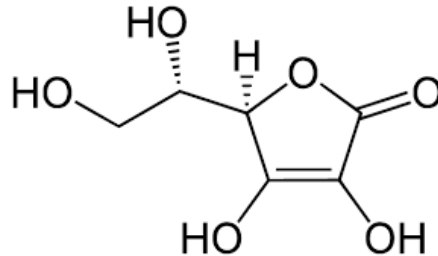


Структурна формула тіотриазоліну

Тіотриазолін зв'язується з білками крові не більше ніж на 10%. При внутрішньом'язовому введенні максимальна концентрація тіотриазоліну у крові спостерігається через 50-60 хвилин, при внутрішньовенному через 0,1 години.

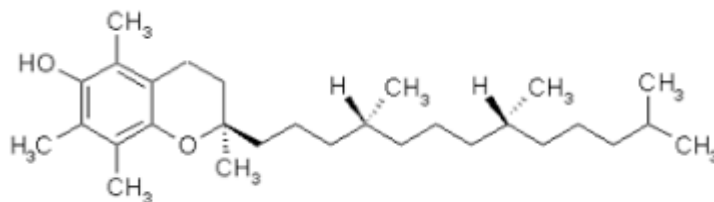
Тіотриазолін накопичується та виводиться переважно, близько до 30 %, нирками. У відчутних концентраціях він виявляється у товстій кишці, серці, селезінці. Найменше, близько 1-2%, накопичується в тонкій кишці та легенях.

Необхідно додати про штучні вітаміни. Серед них найвідомішими є аскорбінова кислота та «Вітамін Е».



Структурна формула аскорбінової кислоти

Аскорбінова кислота або вітамін С є моносахаридним окислювально-відновним (окисно-відновним) каталізатором, який зустрічається як у тварин, так і в рослин[51]. Оскільки один із ферментів, необхідних для виробництва аскорбінової кислоти, був втрачений через мутацію під час еволюції приматів, люди повинні отримувати його зі свого раціону; тому це дієтичний вітамін. Більшість інших тварин здатні виробляти цю сполуку у своїх організмах і не потребують її в своєму раціоні. Аскорбінова кислота необхідна для перетворення проколагену в колаген шляхом окиснення залишків проліну в гідроксипролін. В інших клітинах він підтримується у відновленій формі шляхом реакції з глутатіоном, яка може каталізуватися протеїн-дисульфід-ізомеразою та глутаредоксинами.



Структурна формула α -токоферолу

Вітамін Е – фактично торговельна назва, оскільки це не є окрема сполука. Вітамін Е є загальною назвою для набору з восьми споріднених токоферолів і токотрієнолів, які є жиророзчинними вітамінами з

антиоксидантними властивостями. З них найбільш досліджено α -токоферол, оскільки він має найвищу біодоступність, причому організм переважно поглинає та метаболізує цю форму[44]. Було стверджено, що форма α -токоферолу є найважливішим жиророзчинним антиоксидантом і що він захищає мембрани від окислення, реагуючи з ліпідними радикалами, що утворюються в ланцюговій реакції перекисного окислення ліпідів[57]. Це видаляє проміжні вільні радикали та запобігає продовженню реакції поширення. Ця реакція виробляє окислені α -токофероксильні радикали, які можуть бути перероблені назад до активної відновленої форми шляхом відновлення іншими антиоксидантами, такими як аскорбат, ретинол або убіхінол. Це узгоджується з результатами, які показують, що α -токоферол, але не водорозчинні антиоксиданти, ефективно захищає клітини з дефіцитом глутатіонпероксидази 4 (GPX4) від загибелі клітин.

РОЗДІЛ 3

МЕТОДИ КОРЕКЦІЇ ВМІСТУ АФК ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА

3.1. АФК та їх характеристика.

У нормальному стані функціонування організму швидкість ВРР пероксидації ліпідів клітинних та мембран та ліпопротеїдів відносно мала, що обумовлено низьким рівнем утворення радикалів-ініціаторів та дією збалансованої системи антиоксидантного захисту. Однак у процесі виникнення та розвитку запальних захворювань ця рівновага порушується, різко зростає продукція радикалів-ініціаторів та спостерігається інактивація системи антиоксидантного захисту, розвивається т.зв. оксидативний стрес.

Яка природа радикалів, здатних ініціювати процес пероксидації ліпідів мембран та ліпопротеїдів? Всі радикали, що утворюються в нашому організмі як у нормі, так і при виникненні та розвитку т.зв. «вільнорадикальних патологій» можна поділити на дві групи: природні та чужорідні.

Природні радикали у свою чергу поділяються за способом їх утворення та участі у подальших реакціях на первинні, вторинні та третинні. Первинні радикали утворюються у реакціях за участю спеціалізованих молекулярних механізмів. Для безпосереднього утворення вторинних радикалів спеціалізованих молекулярних машин у клітці немає, вони формуються з первинних радикалів внаслідок наступних реакцій. До вторинних радикалів слід віднести гідроксильний радикал, що утворює з перекису водню за участю іонів металів змінної валентності, і певною мірою пероксинітрит (ONOO), який є продуктом реакції між оксидом азоту (NO) і супероксид-аніон радикалом кисню [64].

Вторинні радикали мають значно більшу активність і через це завдають організму великої шкоди. І нарешті, до третинних радикалів слід віднести радикали, які утворюються при взаємодії первинних і вторинних з молекулами антиоксидантів і будь-яких інших речовин, що легко окислюються.

Чужорідні радикали утворюються в організмі при дії екзогенних фізико-хімічних факторів: іонізуюча та ультрафіолетова радіація, техногенні токсичні продукти тощо [6].

Первинні та вторинні радикали є переважно продуктами модифікації молекулярного кисню. Молекулярний кисень зазвичай не входить у прямі неферментативні хімічні реакції з органічними сполуками тканин організму. Реакції з участю кисню у живої клітині найчастіше відбуваються з участю ферментів – оксидаз. У ході цих реакцій можуть утворюватися проміжні вільнорадикальні продукти відновлення кисню, які отримали назву – активні форми кисню (АФК):

- А. O_2^- - супероксид аніон радикал кисню,
- Б. 1O_2 – синглетний кисень,
- В. H_2O_2 – перекис водню,
- Г. OH^\cdot - гідроксильний радикал.

Під час протікання окисно-відновних реакцій у організмі тварин постійно проходить генерація активних форм кисню (АФК: O_2^- , OH^\cdot , HO_2^\cdot , H_2O_2 та інші), котрі відіграють суттєву роль в багатьох фізіологічних й біохімічних процесах: регуляції тонуусу судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів, мікробіцидній дії фагоцитів. До АФК належать вільні радикали, продукти неповного відновлення атомарного кисню, а також пероксид водню, синглетний кисень, озон, гіпохлорит, пероксинітрит.

Відомо, що близько 95-98 % кисню всередині клітин використовується при окисному фосфорилуванні мітохондріальним ферментом таким, як Цитохромоксидаза, яка каталізує чотирьох електронне відновлення кисню до води ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$). При цьому відбувається 4 етапи одноелектронного відновлення, внаслідок цього виникають проміжні продукти радикальної природи. В ланцюгу переносу електронів можливе неповне відновлення кисню:

у випадку приєднання одного електрону утворюється супероксидний радикал, а двох — пероксид водню. Кожна клітина людського організму за нормальних фізіологічних умов продукує 1010 молекул (0,15 моля) супероксиду на добу, або 1,75 кг у рік.

Активні форми кисню, що утворюються в клітинах, включають перекис водню (H_2O_2), хлорноватисту кислоту ($HClO$) і вільні радикали, такі як гідроксильний радикал ($OH\cdot$) і супероксид-аніон ($O_2^{\cdot-}$)[58]. Гідроксильний радикал є особливо нестабільним і швидко та неспецифічно реагує з більшістю біологічних молекул. Цей вид виробляється з перекису водню в окисно-відновних реакціях, які каталізуються металами, наприклад реакція Фентона. Ці окислювачі можуть пошкоджувати клітини, запускаючи ланцюгові хімічні реакції, наприклад перекисне окислення ліпідів або окислення ДНК або білків. Пошкодження ДНК може спричинити мутації та, можливо, рак, якщо його не скасувати механізми відновлення ДНК, тоді як пошкодження білків спричиняє інгібування ферментів, денатурацію та деградацію білків. [56].

Використання кисню як частини процесу генерації метаболічної енергії утворює активні форми кисню[54]. У цьому процесі супероксид-аніон утворюється як побічний продукт кількох етапів ланцюга транспортування електронів[50]. Особливо важливим є відновлення коензиму Q у комплексі III, оскільки високореакційноздатний вільний радикал утворюється як проміжний продукт ($Q\cdot-$). Цей нестабільний проміжний продукт може призвести до «витоку» електронів, коли електрони перескакують безпосередньо на кисень і утворюють супероксид-аніон, замість того, щоб рухатися через звичайну серію добре контрольованих реакцій ланцюга транспортування електронів[41]. Перекис також утворюється в результаті окислення відновлених флавопротеїнів, таких як комплекс I[45]. Однак, незважаючи на те, що ці ферменти можуть виробляти окислювачі, відносна важливість ланцюга перенесення електронів для інших процесів, які генерують пероксид, незрозуміла. У рослинах, водоростях і ціанобактеріях активні форми кисню також виробляються під час

фотосинтезу, особливо в умовах високої інтенсивності світла. Цей ефект частково компенсується залученням каротиноїдів до фотоінгібування, а у водоростях і ціанобактеріях — великою кількістю йодиду та селену, що залучає ці антиоксиданти до реакції з надмірно відновленими формами фотосинтетичних реакційних центрів, щоб запобігти виробленню активних форм кисню [49].

3.2. Методи корекції вмісту АФК.

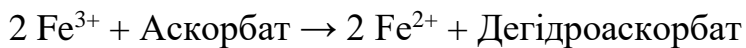
Серед відомих АФК можна виділити прооксиданти, які при накопиченні в клітині можуть призводити до метаболічних порушень або навіть смерті самої клітини. Прооксиданти – це хімічні речовини, які викликають окислювальний стрес або шляхом утворення активних форм кисню, або шляхом інгібування антиоксидантних систем. Окислювальний стрес, спричинений цими хімічними речовинами, може пошкодити клітини та тканини, наприклад, передозування анальгетика парацетамолу (ацетамінофену) може смертельно пошкодити печінку, частково через вироблення нею активних форм кисню[48].

Деякі речовини можуть служити або антиоксидантами, або прооксидантами, залежно від умов. Деякі з важливих умов включають концентрацію хімічної речовини та наявність кисню або перехідних металів. Хоча термодинамічно прооксиданти дуже сприятливі молекули, відновлення молекулярного кисню або пероксиду до супероксиду чи гідроксильного радикалу фактично не можливо.

Це значно знижує швидкість цих реакцій, таким чином дозволяючи існувати аеробним формам життя. Як наслідок, відновлення кисню зазвичай включає або початкове утворення синглетного кисню, або спін-орбітальний зв'язок шляхом відновлення металу перехідного ряду, такого як марганець, залізо або мідь. Потім цей відновлений метал передає єдиний електрон молекулярному кисню або пероксиду. На прикладі з залізом, яке може міняти

свій ступінь окиснення у сполуках, віддаючи електрон, можемо розглянути наступний процес.

Вітаміни, які є відновниками, можуть бути прооксидантами. Вітамін С має антиоксидантну дію, коли він відновлює окислювальні речовини, такі як перекис водню, однак він також може відновлювати іони металів, що призводить до утворення вільних радикалів через реакцію Фентона [36].



Іон металу в цій реакції може бути відновлений, окислений, а потім повторно відновлений у процесі, який називається окисно-відновним циклом, який може генерувати активні форми кисню.

Відносна важливість антиоксидантної та прооксидантної активності вітамінів-антиоксидантів є областю поточних досліджень, але, наприклад, вітамін С, як видається, має в основному антиоксидантну дію в організмі. Однак доступно менше даних щодо інших дієтичних антиоксидантів, таких як поліфенольні антиоксиданти, цинк і вітамін Е [43].

Після проведення дослідів, деякі факти вказують на те, що утворення АФК у мітохондріях є основним джерелом окислювального стресу в клітині. Було показано, що виробництво АФК супроводжує вивільнення цитохрому С у різних апоптотичних парадигмах, але точне місце(я) виробництва АФК залишається неясним. У нещодавніх дослідженнях продемонстровано, що втрата цитохрому С мітохондріями, які окислюють субстрати, пов'язані з НАД⁺, призводить до різкого збільшення виробництва АФК та пригнічення дихання. Це підвищене виробництво АФК може бути імітовано ротеноном, інгібітором комплексу I, а також іншими хімічними інгібіторами потоку електронів, які діють далі в ланцюзі транспортування електронів.

Ефекти цитохрому С є виснаження мітопластів, що впливає на виробництво АФК і дихання є оборотними після додавання екзогенного цитохрому С. Таким чином, у цих моделях пошкодження мітохондрій первинне

місце генерації АФК як у мітохондріях мозку, так і в серці є проксимальним до інгібіторного сайту ротенону, а не в комплексі III. Виробництво АФК у комплексі I критично залежить від сильно зниженого стану мітохондріального пулу НАД(Ф)⁺ і досягається після майже повного інгібування дихального ланцюга. Окисно-відновні експерименти з використанням пари ацетоацетат/ D-β-гідроксибутират у присутності максимально інгібуючої концентрації ротенону свідчать про те, що ділянка становить прибл. 50 мВ більш електронегативний, ніж НАДН/НАД⁺ пара. За відсутності інгібіторів цей сильно знижений стан мітохондрій може бути індукований зворотним потоком електронів від сукцинату до НАД⁺, враховуючи глибоке виробництво АФК у присутності сукцинату. Ці результати спонукають нас запропонувати модель термодинамічного контролю продукції мітохондріальних АФК, яка припускає, що місцем генерації АФК комплексу I є центр Fe-S N-1a[37].

Корекція АТФ проходить за допомогою певних ферментів, що були зазначені раніше. Наприклад, є цілий клас таких активних білків, як супероксиддисмутаза.

Супероксиддисмутази (СОД) є істотним у боротьбі з АФК класом ферментів, які каталізують дисмутацію супероксиду на кисень і пероксид водню. Таким чином, вони є важливим антиоксидантним захистом майже в усіх клітинах, які піддаються впливу кисню. У ссавців і більшості хордових тварин присутні три форми супероксиддисмутази. СОД1 знаходиться в основному в цитоплазмі, СОД2 в мітохондріях, а СОД3 є позаклітинним. Перший - це димер (складається з двох одиниць), а інші - тетрамери (чотири субодиниці). СОД1 і СОД3 містять іони міді та цинку, тоді як СОД2 містить іон марганцю в своєму реактивному центрі. Гени розташовані на хромосомах 21, 6 і 4 відповідно (21q22.1, 6q25.3 і 4p15.3-p15.1) [62].

Каталізована СОД дисмутація супероксиду може бути записана наступними напівреакціями:





де $M = \underline{Cu}$ ($n = 1$); \underline{Mn} ($n = 2$); \underline{Fe} ($n = 2$); \underline{Ni} ($n = 2$). У цій реакції ступінь окислення катіона металу коливається між n і $n + 1$.

Каталаза, яка зосереджена в пероксисомах, розташованих поруч з мітохондріями, реагує з перекисом водню, каталізуючи утворення води та кисню. Глутатіонпероксидаза відновлює перекис водню, передаючи енергію реакційноздатних пероксидів до сірковмісного трипептиду під назвою глутатіон . Сірка, що міститься в цих ферментах, діє як реактивний центр, переносючи реактивні електрони від пероксиду до глутатіону. Пероксиредоксини також розкладають H_2O_2 в мітохондріях, цитозолі та ядрі:

- $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ (каталаза)
- $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GS-SG + 2H_2O$ (глутатіонпероксидаза).

РОЗДІЛ 4

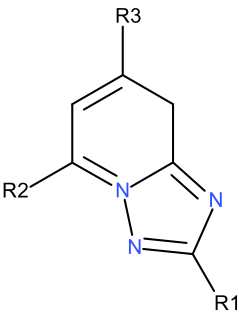
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Широке використання відомих, а також розробка нових оригінальних лікарських засобів визначає необхідність обов'язкової доклінічної оцінки як їх специфічної фармакологічної активності, так і токсичних властивостей.

Для доклінічних досліджень були обрані 6 похідних [1,2,4]триазол[1,5-А]піридину з різною локацією аміно- та галогенпохідних (таблиця 4.1.):

Таблиця 4.1.

Будова та локалізація замісників - [1,2,4]триазоло[1,5-А]піридину

Загальна формула досліджуваних сполук	Локалізація та природа замісників
	Сполука 1.1. R ₁ -NH ₂ ; Сполука 1.2. R ₁ -NH ₂ ; R ₃ -Br; Сполука 1.3. R ₁ -NH ₂ ; R ₂ -Br; Сполука 1.4. R ₁ -NH ₂ ; R ₃ -Cl; Сполука 2.1. R ₁ -Br; R ₂ -Br; Сполука 2.2. R ₁ -Br; R ₃ -Br; Сполука 2.3. R ₁ -Cl; R ₂ -Br;

На першому етапі потенційну токсичність визначали з використанням моделей комп'ютерного PASS-прогнозу та визначення цитотоксичності речовин шляхом індукції гемолізу еритроцитів.

Представлено метод QSAR-моделювання гострої токсичності щурів на основі комбінації дескрипторів QNA (Quantitative Neighborhoods of Atoms), прогнозів PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) і самоузгодженої регресії (SCR). Прогнозовані профілі біологічної активності PASS використовуються як незалежні вхідні змінні для моделювання QSAR за допомогою SCR. Моделі QSAR були розроблені з використанням значень LD₅₀

для сполук, випробуваних на щурах із чотирма типами введення (перорально, внутрішньовенно, внутрішньоочеревинно, підшкірно). Запропонований метод оцінено на сукупності сполук, досліджених на гостру щуротоксичність при пероральному введенні (7286 сполук), використаних для тестування відомих методів QSAR у Т.Е.С.Т. Програма 3.0 (Агентство з охорони навколишнього середовища США).

Також було використано кілька інших наборів сполук, перевірених на гостру токсичність для щурів різними шляхами введення, вибраних із бази даних токсичності SYMYX MDL. Метод порівнювали з результатами прогнозування гострої токсичності для гризунів для неконгенерних наборів, отриманих ACD/Labs Inc. Тестові набори були передбачені щодо області застосовності. Порівняння точності для моделей QSAR, отриманих окремо за допомогою дескрипторів QNA, прогнозів PASS, оцінки найближчих сусідів із консенсусними моделями, чітко продемонструвало переваги консенсусного прогнозу. Розроблено безкоштовний веб-сервіс для прогнозування значень LD₅₀ гострої токсичності щурів[9].

Експериментальна методика попереднього визначення токсичності ґрунтується на встановленні здатності речовин впливати на резистентність еритроцитів, що оцінюється за ступенем їх гемолізу у гіпотонічному (0,55%) розчині NaCl (500-560 нм) [24].

Оцінка антиоксидантної активності фармакологічних речовин повинна включати в себе кілька етапів, а саме скринінг біологічно активних речовин *in vitro* на моделях з генерацією певного радикалу та оцінку антиоксидантної активності речовин у різних тканинах при індукції вільно-радикальної патології [29].

Доклінічне дослідження органічних сполук звичайно проводять *in vitro*, використовуючи хімічні тест-системи [29], які дають дані про антирадикальну активність (АРА). Однак, останнім часом виникає інтерес щодо доповнення цих

досліджень вивченням здатності речовин інгібувати вільно-радикальні процеси в тканинах тварин *in vitro*.

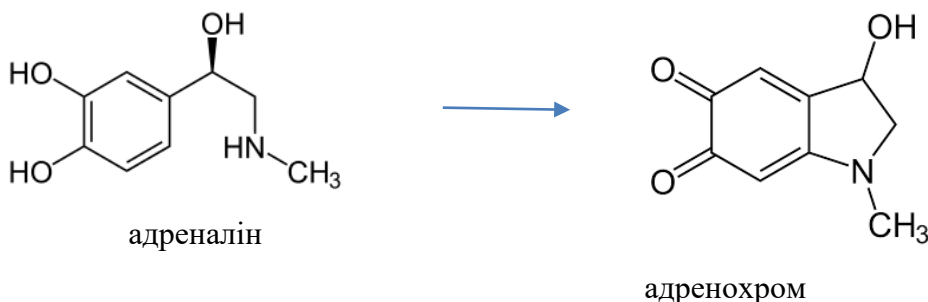
Для дослідження антиоксидантної активності потенційних лікарських засобів, особливо на початкових етапах їх біологічного скринінгу, виправданим є використання методів первинної оцінки антиоксидантної та антирадикальної активності сполук у дослідах *in vitro* [1].

При цьому фармакологічне вивчення АОА нових речовин доцільно проводити на декількох моделях ініціювання вільно-радикальних реакцій у дослідах *in vitro*, які відображають різні етапи складного ланцюгового процесу активації ВРО. Дослідження антирадикальної та антиоксидантної активності похідних тетразолу при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідах *in vitro* вивчали на чотирьох моделях хімічних тест систем, які являються адекватними розвитку вільно-радикальних процесів у живому організмі.

На другому етапі визначали АОА похідних [1,2,4]триазол[1,5-А]піридину на моделях аутоокиснення адреналіну та ліперпероксидації ЖЛП *in vitro*.

АОА похідних триазолопіридину визначали по реакції аутоокиснення адреналіну. Інкубаційна суміш містила: 2,5 мл карбонатного буферу (0,2 М, рН=10,6), 50 мкл 0,1% розчину адреналіну, 50 мкл 0,5мМ розчину Натрій нітропрусиду ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot\text{H}_2\text{O}$) та 50 мкл досліджуваної речовини - ретельно і швидко перемішували, поміщали в спектрофотометр і вимірювали величину оптичної щільності при довжині хвилі 347 нм через 30 секунд протягом 3 хв [27].

Схема окиснення адреналіну в адренохром:



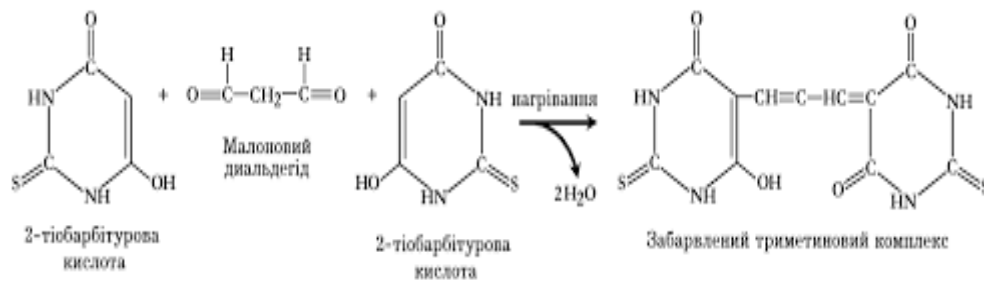
У контрольну пробу, проти якої проводилося вимірювання, додавали карбонатний буфер, розчин адреналіну, розчин $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, а замість досліджуваної речовини вносили 50 мкл ДМСО. Ефективність гальмування окиснення адреналіну визначали шляхом реєстрації оптичної густини розчину при 347 нм на спектрофотометрі СФ-46. АРА виражали у відсотках інгібування окиснення адреналіну.

На третьому етапі для оцінки впливу досліджуваних речовин на інтенсивність протікання процесів ПОЛ у біологічному матеріалі в якості субстрату використовували емульсію жовткових ліпопротеїдів (ЖЛП). В якості системи генерування ПОЛ використовували суміш ферум сульфату (II) та аскорбінової кислоти. До суспензії ліпопротеїдів яєчного жовтка додавали калій-фосфатний буферний розчин ($\text{pH}=7$) у співвідношенні 1:1 та розводили 1 мл отриманого розчину цим же буфером в 25 разів. Окиснювальний стрес створювали на моделі аскорбат-залежного неферментативного ПОЛ. Для цього до 2 мл біологічного матеріалу додавали 0,5 мл системи « Fe^{2+} + аскорбат». Остання містила 0,2 мм FeSO_4 та 0,5 мм розчин аскорбінової кислоти. Потім в отриманий розчин вносили 20 мкл ДМСО-розчинів досліджуваних речовин та інкубували протягом 60 хв при 37 °С у водяному термостаті ІТЖ-0-03. Вибір моделі окислювального стресу ґрунтувався на тому, що дана суміш при 37 °С генерує супероксид аніон – O_2^\bullet , який є ініціатором процесів при різних інтоксикаціях, патологіях, дії радіації тощо [25, 30].

Інтенсивність протікання окиснювальних процесів оцінювали за накопиченням кінцевого продукту ПОЛ - малонового діальдегіду. Для цього до 1 мл отриманого після інкубації розчину додавали 2 мл охолодженої 20% трихлороцтової кислоти (ТХО). Утворений розчин поміщали на 12 год у холодильник, після чого проби центрифугували при 4000 об/хв. До 1 мл супернатанту додавали 2 мл 0,8 % розчину тіобарбітурової кислоти та поміщали на 10 хв у киплячу водяну баню. Відомо, що при високій температурі в кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою

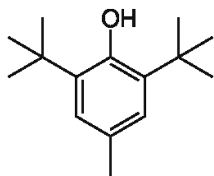
кислотою, утворюючи забарвлений азометиновий комплекс, з максимумом поглинання при 532 нм.

Рівняння реакції між МДА та тиобарбітуровою кислотою:

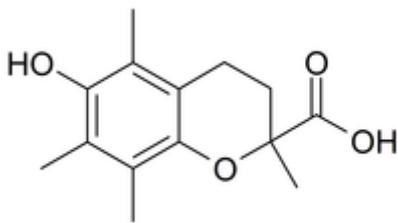


Для підвищення ефективності визначення саме МДА в проби вносили 4 мл н-бутанолу та вимірювали оптичну густину бутанольних екстрактів. Молярний коефіцієнт екстинкції цього комплексу — $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ [35].

Експериментальні показники всіх досліджуваних речовин порівнювали з загально-відомими антиоксидантами – іонолом [12] та тролоксом [26], які широко застосовується в медицині в якості інгібітора вільно-радикальної патології.



іонол (2,5-дитретбутил-4-метил-фенол)



тролокс (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота)

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням t-критерію Ст'юдента [20].

РОЗДІЛ 5

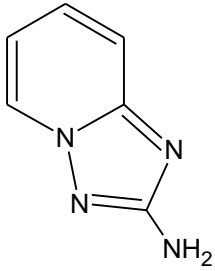
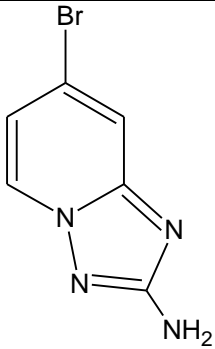
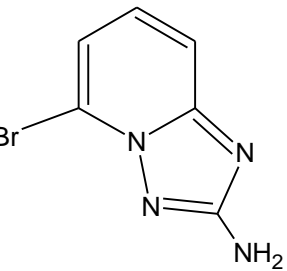
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

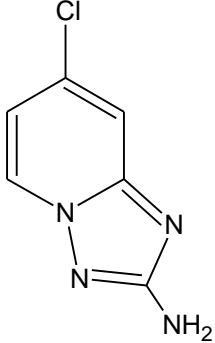
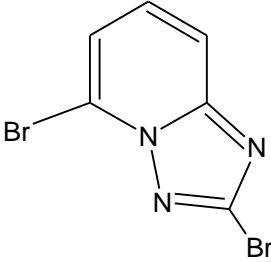
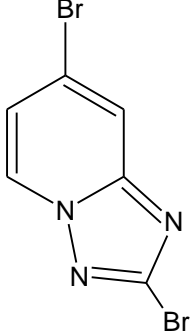
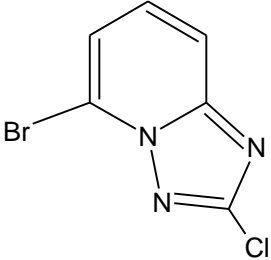
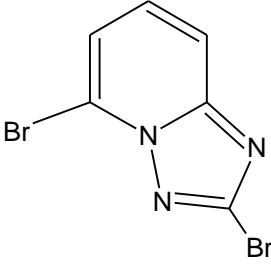
Широке використання відомих, а також розробка нових оригінальних лікарських засобів визначає необхідність обов'язкової доклінічної оцінки як їх специфічної фармакологічної активності, так і токсичних властивостей.

Загальна характеристика досліджуваних сполук представлена у таблиці 5.1.:

Таблиця 5.1.

Будова похідних [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]піридину

Структурна формула речовини	Систематична назва	Код речовини
	[1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i>]pyridin-2-amine	1.1
	7-bromo-[1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i>]pyridine-2-amine	1.2
	5-bromo[1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i>]pyridine-2-amine	1.3

 <p>Chemical structure of 7-chloro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridine-2-amine. It features a fused bicyclic system consisting of a pyridine ring and a 1,2,4-triazole ring. A chlorine atom is attached to the 7-position of the pyridine ring, and an amino group (-NH₂) is attached to the 2-position of the triazole ring.</p>	<p>7-chloro[1,2,4]triazolo[1,5-<i>a</i>]pyridine-2-amine</p>	<p>1.4</p>
 <p>Chemical structure of 2,5-dibromo[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridine. It features a fused bicyclic system consisting of a pyridine ring and a 1,2,4-triazole ring. Two bromine atoms are attached to the 2 and 5 positions of the triazole ring.</p>	<p>2,5-dibromo-[1,2,4]triazolo[1,5-<i>a</i>]pyridine</p>	<p>2.1</p>
 <p>Chemical structure of 2,7-dibromo[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridine. It features a fused bicyclic system consisting of a pyridine ring and a 1,2,4-triazole ring. Two bromine atoms are attached to the 2 and 7 positions of the pyridine ring.</p>	<p>2,7-dibromo[1,2,4]triazolo[1,5-<i>a</i>]pyridine</p>	<p>2.2</p>
 <p>Chemical structure of 5-bromo-2-chloro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridine. It features a fused bicyclic system consisting of a pyridine ring and a 1,2,4-triazole ring. A bromine atom is attached to the 5-position of the pyridine ring, and a chlorine atom is attached to the 2-position of the triazole ring.</p>	<p>5-bromo-2-chloro[1,2,4]triazolo[1,5-<i>a</i>]pyridine</p>	<p>2.3</p>
 <p>Chemical structure of 2,5-dibromo[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridine. It features a fused bicyclic system consisting of a pyridine ring and a 1,2,4-triazole ring. Two bromine atoms are attached to the 2 and 5 positions of the triazole ring.</p>	<p>2,5-dibromo-[1,2,4]triazolo[1,5-<i>a</i>]pyridine</p>	<p>2.1</p>

5.1. Розрахунок токсичності похідних триазолопіридину з використанням моделі комп'ютерного PASS-прогнозу

Потенційну токсичність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піридину розраховували на основі комбінації дескрипторів QNA (Quantitative Neighborhoods of Atoms), прогнозів PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) і самоузгодженої регресії (SCR). Прогнозовані профілі біологічної активності PASS використовуються як незалежні вхідні змінні для моделювання QSAR за допомогою SCR.

Моделі QSAR були розроблені з використанням значень LD50 для сполук, випробуваних на щурах із чотирма типами введення (перорально, внутрішньовенно, внутрішньоочеревинно, підшкірно). Запропонований метод оцінено на сукупності сполук, досліджених на гостру щуротоксичність при пероральному введенні (7286 сполук), використаних для тестування відомих методів QSAR у T.E.S.T. Програма 3.0 (Агентство з охорони навколишнього середовища США). Також було використано кілька інших наборів сполук, перевірених на гостру токсичність для щурів різними шляхами введення, вибраних із бази даних токсичності SYMYX MDL.

Метод порівнювали з результатами прогнозування гострої токсичності для гризунів для неконгенерних наборів, отриманих ACD/Labs Inc. Тестові набори були передбачені щодо області застосовності. Порівняння точності для моделей QSAR, отриманих окремо за допомогою дескрипторів QNA, прогнозів PASS, оцінки найближчих сусідів із консенсусними моделями, чітко продемонструвало переваги консенсусного прогнозу. Розроблено безкоштовний веб-сервіс для прогнозування значень LD50 гострої токсичності щурів [9].

Встановлено, що більшість сполук відносяться до 4 класу токсичності (малотоксичних сполук) та можуть бути рекомендовані для подальших

досліджень в якості біологічно-активних сполук – потенційних лікарських засобів (рис.5.1 -5.4, Додаток А, табл. 5.2).

Таблиця 5.2.

Розрахунок токсичності похідних триазолопіридину з використанням моделі комп'ютерного PASS-прогнозу

	Rat IP LD₅₀ (mg/kg)	Rat IV LD₅₀ (mg/kg)	Rat Oral LD₅₀ (mg/kg)	Rat SC LD₅₀ (mg/kg)
1.1	156,200	117,700	323,500	509,300
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD
1.2	247,000	109,600	143,400	628,700
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 3 in AD	Class 5 in AD
1.3	236,900	107,000	345,200	932,500
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 out of AD	Class 4 in AD
1.4	228,800	109,500	261,900	412,400
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD
2.1	347,800	45,570	145,900	208,100
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 3 out of AD	Class 4 in AD
2.2	285,200	92,100	46,970	430,200
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 3 in AD	Class 4 in AD
2.3	20,300	54,710	344,200	276,100
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 out of AD	Class 4 in AD

Виключення становлять лише сполуки 2.1. та 2.2. – 3 клас токсичності (помірно токсичні речовини) при розрахунку орального шляху введення препарату. Характерно, що обидві сполуки містять 2 атоми бром у положеннях 2,5 та 2,7 триазолопіридинового циклу.

При аналізі токсичності сполук по способу введення спостерігається певна динаміка. Так, при аналізі гострої токсичності по Rat IP (внутрішньоочеревинне введення речовини, рис.5.1) відмічаємо, що усі речовини відносяться до 4 класу токсичності – малотоксичних речовин. При цьому найменшою токсичністю характеризуються сполуки дві сполуки жругої підгрупи – 2.1-2.2, а найбільше значення маємо для сполуки 2.3. Отже, при заміні атому бром на атом хлору у триазоловому фрагменті токсичність суттєво збільшується. Водночас, сполуки першої групи 1.1.-1.4 мають більш близькі значення токсичності, при цьому

найбільший показник характерний для вихідної речовини – 1.1., яка містить лише аміно-групу у триазоловому фрагменті.

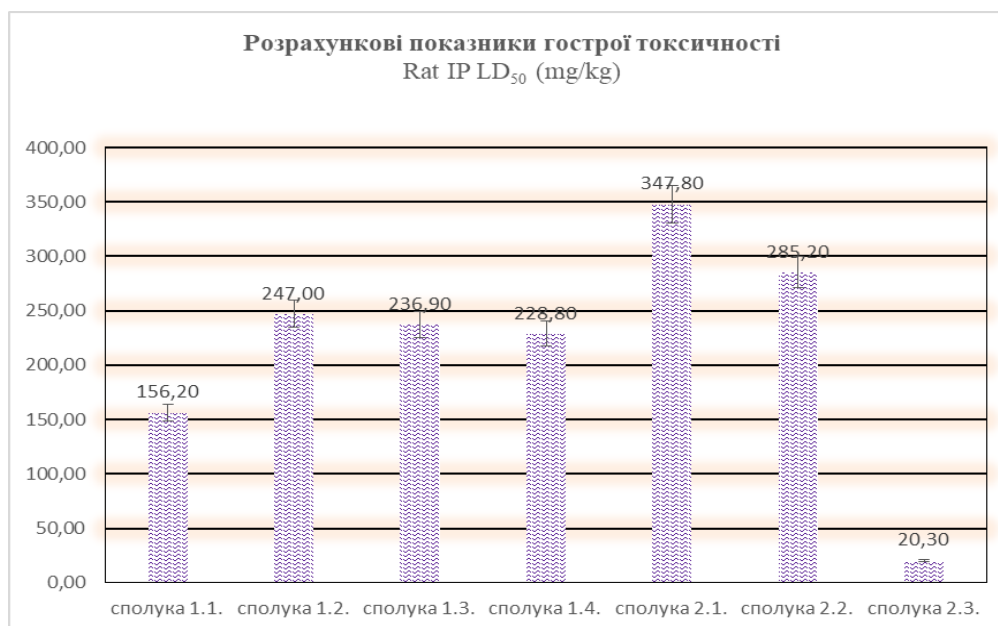


Рис.5.1.1. Розрахункові показники гострої токсичності Rat IP LD₅₀ (mg/kg) для внутрішньоочеревинного введення

Так, при аналізі гострої токсичності по Rat IP (внутрішньовенне введення речовини, рис.5.2) відмічаємо, що найменшою токсичністю характеризуються сполуки першої підгрупи – 1.1-1.4, а найбільше значення маємо для сполуки 2.3. Отже, при заміні аміно-групи на атом галогену (особливо Cl-) у триазоловому фрагменті токсичність дещо збільшується.

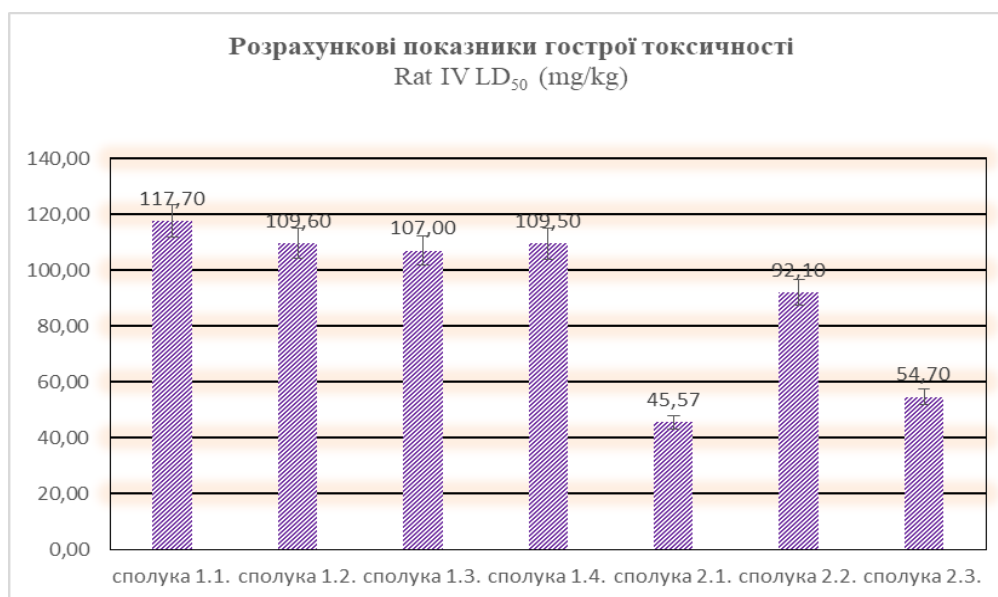


Рис.5.1.2. Розрахункові показники гострої токсичності Rat IP LD₅₀ (mg/kg) для внутрішньоочеревинного введення

При аналізі гострої токсичності по Oral IP (пероральне введення речовини, рис.5.3) відмічаємо, що для сполук даного ряду не характерна точна залежність токсичності від будови.



Рис.5.1.3. Розрахункові показники гострої токсичності Rat Oral LD₅₀ (mg/kg) для перорального введення

Так, найменші значення мають сполуки 1.1.,1.3 та 2.3, які мають різні замісники в різних положеннях. Найбільше ж значення токсичності характерне для сполуки 2.2 з бром-замісниками 2 та 7. Дану динаміку можемо розглядати як неспецифічну щодо системи «будова-токсичність». Важливо також те, що по даному типу визначення токсичності сполуки 2.1 та 2.2. відносяться до 3 класу токсичності – помірно токсичних речовин, та їх не можна рекомендувати як потенційні лікарські засоби.

При аналізі гострої токсичності по Rat SC (підшкірне введення речовини, рис.5.4) відмічаємо, що для досліджуваних сполук характерні найменші значення токсичності. Максимально небезпечні показники характерні для сполук 2.1. та 2.3. Вважаємо, що даному типу розрахунку токсичності її

зростання пов'язане з заміною аміно-групи у триазоловому фрагмент на хлор-замісник. Найбільш небезпечними є сполуки 1.2 та 1.3 з бром-замісниками у піридиновому фрагменті молекули.

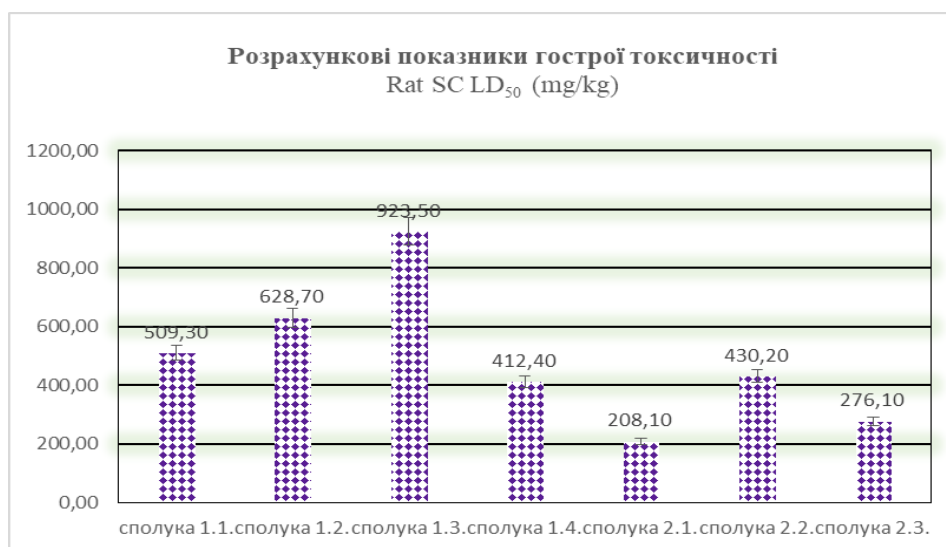


Рис.5.1.4. Розрахункові показники гострої токсичності Rat SC LD₅₀ (mg/kg) для підшкірного введення

Проте всі сполуки за даним методом розрахунку є малотоксичними (4 клас токсичності).

Отже, при визначенні гострої токсичності за математичними прогнозами на основі моделі QSAR відзначаємо залежність протгнозованої токсичності від природи та локалізації замісників, більшість сполук є малотоксичними, а найменші показники токсичності характерні для сполук, що містять аміногрупу у триазоловому фрагменті.

5.2. Визначення цитотоксичності речовин з використанням моделі еритроцитарної мембрани.

Визначення цитотоксичності включало визначення прямої гемолітичної дії випробуваного агента, а також визначення здатності останнього викликати зміну динаміки гемолізу кислоти - "зсув еритрограми". Випробуваний агент вважали цитотоксичним, якщо інкубація суспензії еритроцитів з агентом, за умови подальшого його видалення, призводила до зсуву еритрограми.

Встановлено, що в ізотонічних розчинах натрію хлориду гемоліз еритроцитів посилюється усіма досліджуваними сполуками по відношенню до обох стандартних речовин, як іонолу (рис. 5.2.1) так і тролоксу (рис.5.2.2).



Рис.5.2.1. Показники цитотоксичності для похідних похідних [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]піридину (відносно іонолу)

Проте, відмічаємо певну динаміку. Так, найменші значення цитотоксичності характерні для сполук першої групи – 1.1-1.3, а найменші – для сполук 2.1 та 2.2.

Відносно тролоксу динаміка подібна, проте показники цитотоксичності збільшуються (рис.5.2.2):



Рис.5.2.2. Показники цитотоксичності для похідних похідних [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]піридину (відносно тролоксу).

Таким чином найбільший вплив на стійкість еритроцитарних мембран чинять сполуки 2.1. та 2.2, що містять замісники бром у 2,5 та 7 положеннях піридинотриазолового гетероциклу.

5.3. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]піридину на моделі емульсії жовткових ліпопротеїдів в умовах штучного оксидативного стресу *in vitro*.

Антиоксидантну активність речовин визначали шляхом інгібування утворення активних форм кисню в умовах штучного оксидативного стресу. Інтенсивність протікання вільно-радикального окиснення ліпідів оцінювали спектрофотометрично за утворенням ТБК-активних продуктів [23].

Показники всіх досліджуваних речовин порівнювали з відомими антиоксидантами – іонолом та водорозчинним аналогом вітаміну Е - тролоксом, який широко застосовується в медицині в якості інгібітора вільно-радикальної патології [13].

Встановлено, що найвищі значення АОА характерні для сполук ряду 1.1-1.4, а саме сполук 1.2 та 1.3, для яких характерним є присутність бромід-замісника у 1-му та 5-му положенні піридинового фрагменту молекули (рис.5.3.1, 5.3.2).

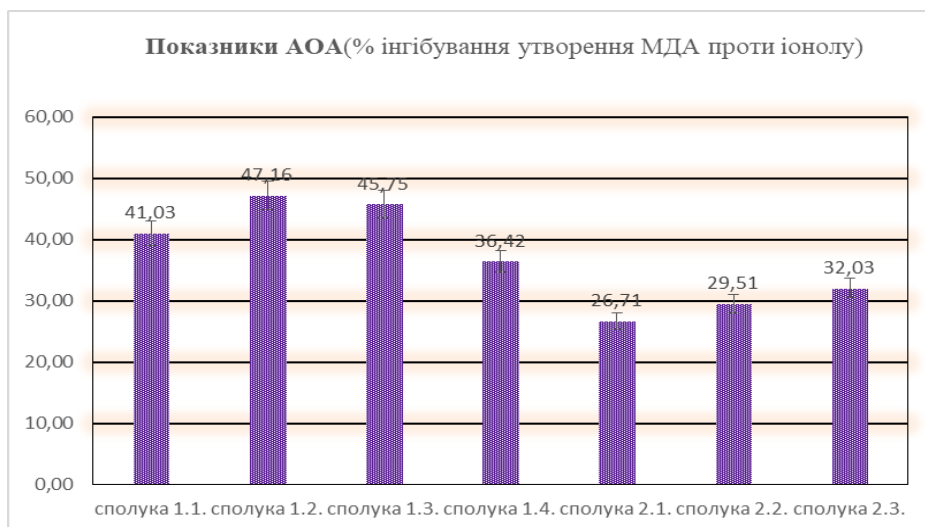


Рис.5.3.1. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піридину на моделі емульсії жовткових ліпопротеїдів в умовах штучного оксидативного стресу *in vitro* (відносно іонолу)

Проте заміна аміно-групи на галоген, а саме бром у триазоловому фрагменті (сполуки 2.1. та 2.2) різко зменшує здатність речовин інгібувати вільно-радикальні процеси. Слід відмітити, що заміна бром-замісника та хлор-замісник в сполуці 2.3 майже на 20% збільшує АОА даної сполуки та наближається до активності сполуки 1.4.

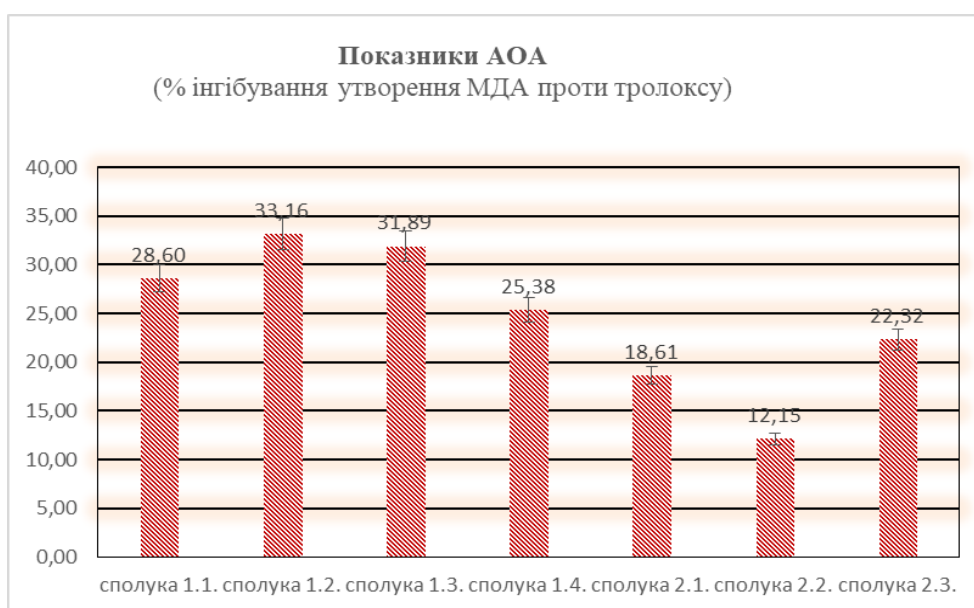


Рис.5.3.2. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піридину на моделі емульсії жовткових ліпопротеїдів в умовах штучного оксидативного стресу *in vitro* (відносно тролоксу)

На нашу думку, зміна здатності речовин до інгібування вільно-радикальних процесів може бути пов'язана із перерозподілом електронної густини та можливим створенням «антирадикальної пастки» на триазоловому фрагменті молекули.

Відзначаємо, що динаміка активності відносно іонолу та тролоксу дещо подібна, проти відносно іонолу показники мають більші значення.

5.4. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піридину на моделі аутоокиснення адреналіну в умовах штучного оксидативного стресу *in vitro*

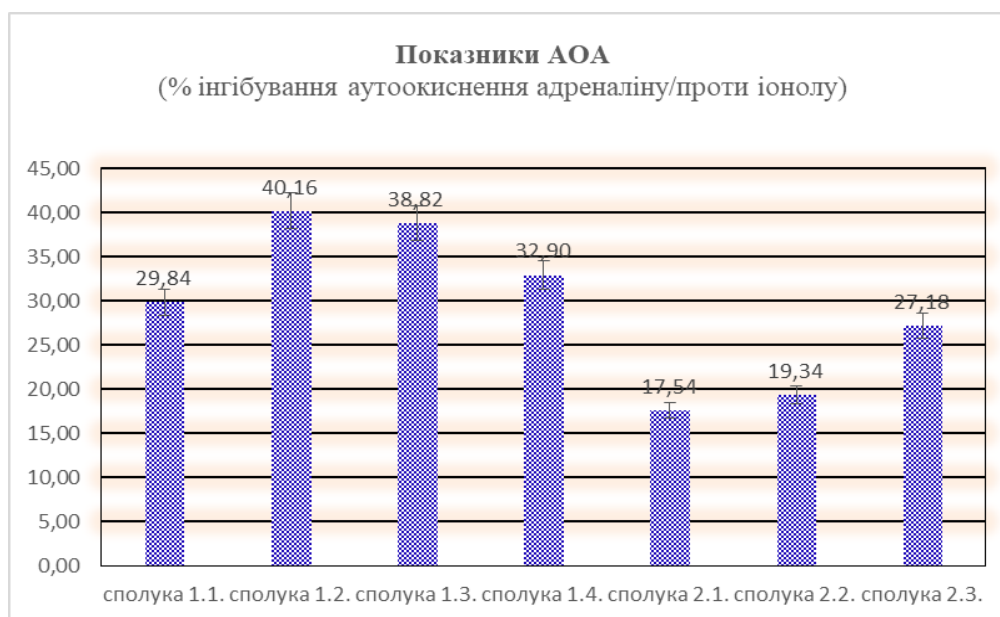


Рис.5.4.1. Антиоксидантна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піридину на моделі аутоокиснення адреналіну в умовах штучного оксидативного стресу *in vitro* (відносно іонолу)

Динаміка антиоксидантної активності на моделі інгібування окиснення адреналіну підтверджує думку про найменшу токсичність та, відповідно, найвищу здатність до інгібування утворення активних форм кисню сполук 1.2. та 1.3. (40,16 та 38,82% відносно іонолу). Проте найменшу здатність до знешкодження АФК проявляють сполуки другої групи, а саме 2.1. та 2.2. з бром-замісниками у 2.5 та 2.7 положення триазолопіридинового гетероциклу.

ВИСНОВКИ

1. При визначенні гострої токсичності за математичними прогнозами на основі моделі QSAR відзначаємо залежність прогнозованої токсичності від природи та локалізації замісників, більшість сполук є малотоксичними та відносяться до 4 класу токсичності, а найменші показники токсичності характерні для сполук, що містять аміногрупу у триазоловому фрагменті

2. Найбільший вплив на стійкість еритроцитарних мембран чинять сполуки 2.1. та 2.2, що містять замісники бром у 2,5 та 7 положеннях піридинотриазолового гетероциклу.

3. Встановлено, що найвищі значення АОА характерні для сполук ряду 1.1-1.4, а саме сполук 1.2 та 1.3, для яких характерним є присутність бромід-замісника у 1-му та 5-му положенні піридинового фрагменту молекули

4. Динаміка антиоксидантної активності на моделі інгібування окиснення адреналіну підтверджує думку про найменшу токсичність та, відповідно, найвищу здатність до інгібування утворення активних форм кисню сполук 1.2. та 1.3. (40,16 та 38,82% відносно іонолу).

Отже, з використанням методів доклінічної діагностики нами доведена наявність фізико-хімічної активності в ряду досліджених сполук та в якості потенційних антиоксидантів слід розглядати похідні 2-аміно-[1,2,4]триазоло[1,5a]піридину з бром-замісниками у піридиновому фрагменті молекули.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Альберт Э. Избирательная токсичность. М.: переиздание Мир, 431 с.
2. Ангельські С., Якубовські З., Домінічак М.Г. Клінічна біохімія: пер. з пол. Сопот, 1998. 451 с.
3. Березовская И.В. Иванова В.М., Спасский Ю.А. Альтернативные методы в лекарственной токсикологии в настоящем и будущем. *1-ый съезд токсикологов*: тез. докл., г.Москва, 1990 г. С. 269.
4. Левченко В.І., Новожицька Ю.М., Сахнюк В.В. Біохімічні методи дослідження крові тварин: метод. реком. Київ, 2004. 104 с.
5. Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О. Основні біохімічні поняття, визначення і терміни. Київ:Вуга школа, 1993. 528 с.
6. Гуніна Л. М., Олійник С.А. Оксидативний стрес і його роль в канцерогенезі. *Фізіологічний журнал*. Київ, 2006. Т. 52, № 4. С. 78-89.
7. Доклінічне вивчення безпеки лікарських засобів біотехнологічного походження: метод. реком. / За ред. В.Л. Коваленко. Київ, 2011. С.8
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком. / За ред. О.В. Стефанова. Київ:Авіцена, 2001. 527 с.
9. Доступно з сайту <http://www.pharmaexpert.ru/GUSAR/AcuToxPredict>
10. Дядищев Н.Р., Рыбалкин С.П. Биологические модели *in vitro* в токсикологии *1-ый съезд токсикологов*: тез. докл., г.Москва, 1990 г. С. 299.
11. Зубанов П.А., Виноходов Д.О., Филимон Е.В. Зависимость чувствительности *Ragametium caudatum* к токсичным веществам от условий обитания. *IV съезд Общества биотехнологов им. Ю. А. Овчинникова*: мат.конф. 17-19 октября 2006 г., Пущино. С.60-64.
12. Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З. Фенольные биоантиоксиданты.- СО РАМН, 2003. 328 с.

13. Кулагин О.Л., Куркин В. А., Додонов Н. С. Антиоксидантная активность некоторых фитопрепаратов, содержащих флавоноиды. *Фармация*. 2007. Т. 55, № 2. С. 30–32.
14. Клімова Е.М., Лавинская Е.В. Використання микроводоростей *Dunaliella viridis* Teodor.(Chlorophyta) в якості клітинного біоіндикатора. *Альгологія*. 2012. Т.22, №2. С.208-218.
15. Клімова Е.М., Лавинська Е.В., Божков А.І. Оцінка ступеню цитотоксичності компонентів патологічних сироваток з використанням клітинної тест-системи. *Біотехнологія*. Київ. 2010. Т.3, №6. С.85-91.
16. Трахтенберг И. М., Кокшарева Н.В., Лобода Ю.И. Приоритетные аспекты экспериментальных исследований безопасности лекарственных средств. *Сучасні проблеми токсикології*. Київ. 2003. №1. С. 7 – 16.
17. Няньковський С.Л. Формування здоров'я дітей і профілактика його порушень. Львів: Аверс, 1997. 191 с.
18. Лавриненко И.А., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Створення цільноклітинної біосенсорної тест-системи для знаходження генотоксичних впливів на клітину. *Вісник Серія: Біологія, клінічна медицина*. Київ. 2007.Т.5, №1. С.95-99.
19. Крашуров Е.С. Островский А.Г., Лузина Е.В. Методи визначення ступеню інтоксикації. *Лікарська справа*. Київ. 1990. № 7. С. 47 - 49.
20. Лакин Г. В Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 351 с.
21. Постанова Першого заступника Головного державного санітарного лікаря України від 28.08.1998 № 2: Гігієна і токсикологія пестицидів, полімерних та синтетичних матеріалів
22. Монька Н. Я., Стадницька Н.Є., Чарка Р.В. Прогнозований скринінг біологічної активності тіосульфонатних похідних піримідину. *Хімія, технологія та застосування речовин*. Льві. 2020. Т.3, № 2. С. 53-60.
23. Ніженковська І.В., Ніженковський О. І., Вільчинська В. В. Процеси ліпопероксидації та стан АО системи в міокарді щурів за умов інтоксикації

антрацикліновими антибіотиками. *Сучасні проблеми токсикології*. Київ. 2012. № 2. С. 45–47.

24. Новиков В.Э., Макаров С.Н., Шемякина Е.В. Применимость эритроцитарной модели для определения токсичности ксенобиотиков. 2-й Съезд биофизиков РФ, г.Москва, 23-27 авг., 1999: Тез. докл. Т. 3. С. 899.

25. Овсяннікова Л. М., Альокіна С.М., Дробінська О.В. Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гомеостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС: метод. реком. Київ: Друкарня Агентства "Чорнобильінтерінформ", 1999. 18 с.

26. Роберта Р., Пеллегрині Н., Протеггенте А. Антиоксидантна активність тролоксу, що застосовується як покращений тест на знебарвлення катіон-радикала *ABTS*. *Free Radical Biology and Medicine*. Амстердам 1999, Vol. 26. С. 1231-1237.

27. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии*. 1999, № 3 . С. 14 - 15.

28. Українська енциклопедія: у 12 т. / гол. ред. М. П. Бажан ; редкол.: О. К. Антонов та ін. — 2-ге вид. — К.: Головна редакція УРЕ, 1986–1991.

29. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы. *Современные наукоёмкие технологии*. 2006, №6. с.28-34.

30. Шиманський І. О., Кучмеровська Т.М., Донченко Г.В. Корекція нікотинамідом та нікотиноїл-ГАМК оксидативного стресу за діабетичної нейропатії. *Український біохімічний журнал*. Київ. 2002. Т. 74, № 5. С. 89-95.

31. Ang A., Pullar J.M., Curri M.J. Vitamin C and immune cell function in inflammation and cancer. *Vissers M. Biochemical Society Transactions*. 2018. 46, V.5. P. 1147–1159.

32. Antioxidants: In Depth: *CCIH*. November 2013. Retrieved 17 April 2021.

33. A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates /Jennifer K., Philip M., Bevyn Jarrott // Department of Pharmacology, Monash University, Wellington Rd., Clayton, Vic. 3168 Australia Received 13 January 1998.

34. Birnboim H.C. NA strand breaks in human leukocytes induced by superoxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation. *Carcinogenesis*. 2002, V. 7 (9). P. 1511–1517.

35. Buddi R., Lin B., Atilano S.R. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases (АНГЛ.) *J. Histochem. Cytochem.* 2002.March (vol. 50, no. 3). P. 341—351.

36. Carr A. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1 June 1999, 13 (9). P. 1007–1024.

37. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation–reduction state / Y. Kushnareva, A. N. Murphy, A. Andreyev // *Biochem J.* – 368 (2), 2002. – P. 545–553.

38. Davies K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*. 1995, V.61. P. 1–31.

39. Docampo R. Antioxidant mechanisms:0 In Marr J, Müller M (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. London: Academic Press. P. 147–160.

40. Ferreira I .C. F. R., Carocho M. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013. Vol. 51. P. 15–25.

41. Finkel T., Holbrook N.J., Finkel T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000, 408 (6809). P. 239–247.

42. Halliwell B., Gutteridge J. M. The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological Systems. *Free Radical Bio Med*. 1995. Vol. 18. P. 125–126.

43. Hao Q., Maret W. Imbalance between pro-oxidant and pro-antioxidant functions of zinc in disease. *J. Alzheimers Dis.* 2005. 8 (2). P. 161–70.
44. Herrera E., Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry.* 2001. 57(2). P. 43–56.
45. Hirst J., King M.S., Pryde K.R. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society Transactions.* 2008. 36 (Pt 5). P. 976–980.
46. Ho Y.S, Magnenat J.L., Gargano M. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environmental Health Perspectives.* 1998. 106 (Suppl 5). P. 1219–1228.
47. ICH Topic S6 (R1) Document “Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals”
48. James L. P., Mayeux P. R., Hinson J.A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 2003. 31 (12). P. 1499–1506.
49. Kerfeld C. A. Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics (Submitted manuscript).* 2004. 430 (1). P. 2-9.
50. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life.* 2001. 52 (3–5). P. 159–164.
51. Linster C.L., Van Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal.* 2007. 274 (1). P. 1–22.
52. Nevoit G.V., Potiazhenko M.M., Mintser O.P. Bioelectrical impedance determining body composition and hardware-software recording of heart rate variability during an Objective Structured Clinical Examination as a diagnostic tool. *World Med Biol.* 2020 2. P. 89-93.
53. Prockop D. J., Kivirikko K.I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry.* 2005, 64. P. 403–434.
54. Raha S., Robinson B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences.* 2000. 25 (10). P. 502–508.

55. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997. 82(2). P. 291–295.
56. Stohs S.J., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine (Submitted manuscript)*. 1995. V.18, № 2. – P. 321–336.
57. Traber M. G., Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007. 43 (1). P. 4–15.
58. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007. V. 39, №1. P. 44–84.
59. Withdrawn: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010):. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 16 May 2012. Retrieved 13 June 2012.
60. Yamamoto A. A Unique Antilipidemic Drug - Probucol. *J. Atheroscler. Thromb.* 2008. 15 (6). P. 304–305.
61. Zhigacheva I. V., Rusina I. F., Generozova I. P. Antiradical and Anti-Stress Properties of N-Acetylcysteinate 2-Ethyl-6-Methyl-3-Hydroxypyridine. *Russ. J. Phys. Chem.* 2018. Vol. 12. P. 1055–1060.
62. <https://enzyme.expasy.org/EC/1.15.1.1>
63. <https://vo.uu.edu.ua/mod/page/view.php?id=209547>
64. <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1289>

ДОДАТКИ

Додаток А

Розрахунок токсичності похідних триазолопіридину з використанням моделі комп'ютерного PASS-прогнозу

	Rat IP LD₅₀ (mg/kg)	Rat IV LD₅₀ (mg/kg)	Rat Oral LD₅₀ (mg/kg)	Rat SC LD₅₀ (mg/kg)
1.1	156,200	117,700	323,500	509,300
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD
1.2	247,000	109,600	143,400	628,700
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 3 in AD	Class 5 in AD
1.3	236,900	107,000	345,200	932,500
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 out of AD	Class 4 in AD
1.4	228,800	109,500	261,900	412,400
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 in AD
2.1	347,800	45,570	145,900	208,100
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 3 out of AD	Class 4 in AD
2.2	285,200	92,100	46,970	430,200
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 3 in AD	Class 4 in AD
2.3	20,300	54,710	344,200	276,100
	Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 4 out of AD	Class 4 in AD