

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

**РИЖЕНКО ВІКТОР ПАВЛОВИЧ**

УДК 004.659:[546.17+546.21]:615.31'857]]-048.34

**ОПТИМІЗАЦІЯ ЦІЛЕСПРЯМОВАНОГО ПОШУКУ  
СКАВЕНДЖЕРІВ NO В РЯДУ ПОХІДНИХ КСАНТИНУ**

14.03.05 - фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті, м. Запоріжжя.

**Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**Рижов Олексій Анатолійович,**  
Запорізький державний медичний університет,  
м. Запоріжжя, завідувач кафедри медичної та  
фармацевтичної інформатики і новітніх  
технологій

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор  
**Супрун Еліна Владиславівна,**  
Харківська медична академія післядипломної  
освіти МОЗ України, м. Харків, професор  
кафедри медичного та фармацевтичного права,  
загальної і клінічної фармації

доктор медичних наук, доцент  
**Нагорна Олена Олександрівна,**  
ТДВ "ІнтерХім" (Україна), медичний директор

Захист відбудеться «29» вересня 2020 р. о 13-00 годині, на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий «   » \_\_\_\_\_ 2020 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,  
кандидат біологічних наук



І.В. Данова



## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** У своєму патогенезі більшість поширених захворювань людини, в тому числі патології серцево-судинної системи, ЦНС, дихальних шляхів, злаякісні новоутворення, мають досить чітко окреслену вільнорадикальну фазу [Губский Ю.И., 2017; Чекман И.С., 2020; Беленичев И.Ф., 2020]. Утворення надмірної кількості високореакційних радикалів (супероксид-, аніон-, гідроксилрадикали) викликає окисну модифікацію ліпідів, білків, нуклеїнових кислот і, як наслідок, призводять до їх деструкції і загибелі клітин [Губский Ю.И., Левицкий Е.Л., 2012; Чекман И.С., 2020; Беленичев И.Ф., 2020]. Такі антиоксиданти як мексидол, емоксипін, тіотриазолін, а-токоферол міцно увійшли в клінічну практику і успішно застосовуються в лікуванні ішемічної хвороби серця, мозкових інсультів, гепатобіліарної системи, алкогольної хвороби [Горчакова Н.А., 2019; Мазур И.А., 2019; Супрун Э.В., 2019]. Останнім часом, з проясненням ролі NO в патогенезі порушень мозкового кровообігу, хронічної серцевої недостатності, гіпертонічної хвороби, фетоплацентарної недостатності, когнітивних розладів, хвороби Альцгеймера, а також в молекулярно-біохімічних механізмах апоптозу, мітохондріальної дисфункції, ендотеліальної дисфункції, ставиться питання про пошук селективних скавенджерів цього радикала [Raman P.N., 2011; Чекман И.С., 2019; Беленичев И.Ф., 2020]. Досить перспективними в цьому напрямку є похідні ксантину, які мають широкий спектр біологічної активності, в тому числі антиоксидантної [Чекман И.С., 2017; Александрова Е.В., 2018; Носач С.Г., 2020]. Традиційні дослідження, засновані на скринінгу і відборі біологічно активних сполук, трудомісткі і вимагають значних витрат. В наукових дослідженнях, що базуються на комп'ютерних програмах прогнозу фармакологічної активності хімічних сполук відсутній диференційований прогноз антиоксидантної активності щодо NO, а також дуже багато помилок [Hansch С., 1999; Супрун Э.В., 2011; Косолапов В.А., 2015; Free S.M., 2016]. Все вищесказане обґрунтовує актуальність даної роботи, а саме оптимізацію цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP<sub>70</sub>/HIF-1α-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

**Мета і задачі дослідження:** На підставі розробленого комплексного підходу (комп'ютерний прогноз, скринінг *in vitro* та *in vivo*) виявити серед похідних ксантину найбільш активну сполуку з властивостями скавенджера

NO, оцінити її протиішемичні, антиоксидантні властивості та особливості дії в умовах ішемії міокарда та головного мозку.

Виходячи з поставленої мети були визначені наступні задачі:

1. Дослідити антиоксидантну активність (АОА) *in vitro* по інгібуванню NO, квантово-хімічні розрахунки 122 похідних ксантина, провести вибір розрахункових базових структур як основи для створення комп'ютерної програми віртуального скринінгу антиоксидантної активності скавенджерів NO.

2. За допомогою комп'ютерної програми та скринінгу *in vitro* провести пошук скавенджерів NO серед знову синтезованих сполук похідних ксантину і виявити найбільш активну сполуку.

3. Оцінити вплив найбільш активної сполуки на показники глутатіонової системи (ГР, ГПР, GSH), вміст нітротирозину і HSP<sub>70</sub> в суспензії нейронів при моделюванні нітрозуючого стресу *in vitro*.

4. Оцінити вплив найбільш активної сполуки на показники ЕКГ, нітроксидергічної системи (мРНК eNOS, мРНК iNOS, активність NOS, L-аргінін, нітрит-аніон), енергетичного метаболізму (АТФ, АДФ, АМФ, лактат, піруват, малат, ізоцитрат, МДГ), оксидативного стресу (нітротирозин, АФГ, КФГ) і антиоксидантної системи (СОД, ГР, ГПР) серця при ізадрин-пітуїтринової моделі ІМ.

5. Оцінити вплив найбільш активної сполуки на показники енергетичного обміну (АТФ, лактат, піруват, малат), оксидативного стресу (нітротирозин, АФГ, КФГ) і фізичної витривалості в умовах моделювання робочої гіпоксії міокарда.

6. Оцінити вплив найбільш активної сполуки на показники тіол-дисульфідної системи (ГР, ГПР, GST, GSH, SH-групи), нітроксидергічної системи (iNOS, мРНК nNOS, мРНК iNOS, активність NOS, нітрит-аніон), нітротирозину, HSP<sub>70</sub>, робочу і референтну пам'ять в умовах моделювання внутрішньомозкового крововиливу.

*Об'єкт дослідження:* фармакологічна модуляція NO-залежних механізмів ішемічного пошкодження міокарда та головного мозку.

*Предмет дослідження:* антиоксидантна та протиішемична активність похідних ксантину, комп'ютерна програма віртуального скринінгу скавенджерів NO.

*Методи дослідження:* фармакологічні, біохімічні, ПЛР в реальному часі, гістоімунохімічні, імуноферментні, математичної статистики, віртуального скринінгу.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше для оптимізації цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду знову синтезованих сполук створена комп'ютерна програма віртуального скринінгу за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням моделі "градієнтного бустінга". Вперше за допомогою нової комп'ютерної програми для прогнозу антиоксидантної активності серед знов синтезованих похідних ксантину була виявлена сполука – гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3) з властивостями скавенджера NO, яка в досліджах *in vitro* гальмує реакції

нітрозуючого стресу. Встановлено, що С-3 підвищує активність глутатіонової системи та концентрацію HSP<sub>70</sub> у суспензії нейронів при моделюванні нітрозативного стресу *in vitro*. Вперше показано, що С-3 в умовах експериментального інфаркту міокарда, гострої робочої гіпоксії та ВК має антиоксидантну і протиішемічну дію, за силою якої перевершує референс-препарати (мілдронат, мексидол і пірацетам). Вперше показано, що С-3 на моделі інфаркту міокарда і ВК гальмує експресію мРНК iNOS та iNOS в головному мозку і міокарді, а на моделі ВК підвищує концентрацію HSP<sub>70</sub> (в гострий період) в головному мозку експериментальних тварин і покращує показник робочої та референтної пам'яті у експериментальних тварин (у відновний період). Вперше показано, що С-3 підвищувала толерантність до фізичних навантажень на тлі покращення біоенергетики міокарду та гальмування оксидативного стресу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено і створено програму віртуального скринінгу речовин з потенційною антиоксидантною активністю по інгібуванню NO у вигляді веб-додатка. Створена програма віртуального скринінгу скавенджерів NO, яка може бути використана для спрямованого пошуку нових високоактивних антиоксидантів серед знову синтезованих сполук, а також для планування синтезу нових речовин з антиоксидантною активністю шляхом прогнозу рівня заданого виду активності. Експериментально встановлений механізм дії похідного ксантину – С-3 може сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, що переривають NO-залежні ланки ішемічного пошкодження міокарда та головного мозку. Матеріали дисертаційного дослідження впроваджені в науково-дослідну роботу і навчальний процес кафедр: фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету, фармакології і клінічної фармакології Дніпропетровської медичної академії, фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, фармакології Буковинського державного медичного університету та в наукову роботу лабораторії фізико-хімічної фармакології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є особистою науковою працею автора. Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, визначено мету і завдання дослідження, розроблені математико-теоретичні основи комплексного підходу до створення комп'ютерної програми віртуального скринінгу, проведені квантово-хімічні розрахунки досліджуваних сполук, проведені всі види статистичного аналізу. Дисертантом самостійно відтворені експериментальні моделі та проведені фармакологічні, біохімічні дослідження з вивчення показників енергетичного обміну, антиоксидантної системи, нітроксидергічної системи і окисної модифікації білка міокарда і головного мозку. Дисертантом узагальнені і проаналізовані результати досліджень, сформульовані висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на Всеукраїнській науково-

практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015); двадцятому Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); двадцять четвертій Українській конференції з органічної хімії (Полтава, 2016); Всеукраїнській науково-методичній відеоконференції з міжнародною участю «Актуальні питання дистанційної освіти та телемедицини – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю з дня народження І.Г. Герцена «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» для студентів та молодих вчених (Одеса, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції (до 50-річчя заснування ЗДМУ) «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2018» (Запоріжжя, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2019» (Запоріжжя, 2019), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2020» (Запоріжжя, 2020).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 21 наукову роботу, у тому числі 8 статей у фахових журналах України, 13 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 258 сторінках друкованого тексту та складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 29 рисунками, 26 таблицями. Список використаних джерел містить 275 найменування, з них 88 кирилицею, 187 латиною.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи.** Для дослідження АOA *in vitro* було відібрано 122 сполуки похідних ксантину, синтезованих на кафедрі біологічної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувачка – д.хім.н., професор Александрова К.В.). АOA сполук при інгібуванні NO *in vitro* тестували за ступенем гальмування окиснення аскорбінової кислоти при 265 нм. Індукцію NO проводили опроміненням водних розчинів нітрит нітропрусида (10 мМ) і аскорбінової кислоти (40 мМ) перед джерелом світла (300 Вт) з довжиною хвилі 425нм [Губський Ю.І., 2002; Чекман І.С., 2016]. В якості референс-препарата при дослідженні АOA *in vitro* був обраний N-ацетилцистеїн ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$  М) (Sandoz, Німеччина), що виявляє властивості

скавенджера NO. Для моделювання нітрозуючого стресу використовували динітрозольний комплекс заліза (II)-цистеїна (DNIC) [Губський Ю.І., 2002; Чекман І.С., 2016]. Всі досліджувані речовини та референс-препарати вводили в інкубаційну систему в концентраціях, відповідних їх молекулярним масам. Експериментальна частина виконана на 261 білому безпородному щурі (самки та самці), масою 140-160 г отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». При догляді за тваринами, харчуванні та проведенні експериментів керувались базисними нормативними документами: рекомендаціями комітету з біоетики МОЗ України з експериментальної роботи та використання тварин, рекомендаціями ВООЗ, рекомендаціями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей. Дотримання етичних норм підтверджено комісією з питань біоетики ЗДМУ. Всі експерименти проведені на базі Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ, атестованому МОЗ України (атестат №039/14). Внутрішньомозковий крововилив (ВК) моделювали шляхом введення 0,1 мл аутокрові, узятій із хвостової вени, на 100 гр. ваги тварини в область внутрішньої капсули і стріопалідарних ядер головного мозку тварини з використанням стереотаксичної техніки [Ярош О.К., 2005; Чекман І.С., 2016]. Досліджувані препарати вводили за допомогою металевого зонда протягом 4 та 18 діб один раз на добу – С-3 (100 мг/кг) [Беленичев І.Ф., Носач С.Г., 2020], мексидол (200 мг/кг) (ЗАО «ЗиО-Здоровье», Російська Федерація) [Павлов С.В., 2014], пірацетам (500 мг/кг) (Шрея Лайф Саенсиз Пвт. Лтд., Індія) [Беленичев І.Ф., 2009]. Інфаркт міокарда (ІМ) моделювали за схемою: пітуїтрин (АВ "Endokrininiai", Літва) – 0,5 Ед/кг – в/о, через 20 хв. ізадрин (ВАТ"Нижфарм", Російська Федерація) – 100мг/кг – п/ш [Мохорт М.А., 1972; Стефанов А.В., 2001]. Після 6 годин вводиться ізадрин в тій самій дозі. Через добу вводився в тих же дозах обидва агенти. Досліджувані препарати вводили 3-х кратно протягом доби паралельно з формуванням інфаркту внутрішньошлунково С-3 (100 мг/кг), мілдронат – 250 мг/кг (АО Гриндекс, Латвія) [Чекман І.С., 2008]. Гостру робочу гіпоксію моделювали при фізичному навантаженні на третбані – тварин змушували бігти на тредбані до повного виснаження. Також гостру робочу гіпоксію моделювали на тлі попереднього (за 30 хв.) введення пітуїтрин (1 Од/кг). Швидкості руху стрічки 50 м/хв., нахил кута – 30°. Сполуку С-3 вводили внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг за 30 хв. до експерименту, референс-препарат мілдронат – 250 мг/кг. Аналіз ЕКГ проводився на аналізаторі CardioCom-2000plus (ХАІ-медика, Україна) під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг).

Тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Для біохімічних досліджень головний мозок подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану та гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища (при +2°C), що містить (в ммоль): сахароза – 250, трис-НСІ-буфер – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4). Цитоплазматичну і мітохондріальну фракції виділяли методом диференційного центрифугування на



рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30k» (Німеччина) при 14000 g 10 хв (при +4°C). [Прохорова М.И., 1982; Чекман І.С., 2016]. Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за вмістом маркерів окисної модифікації білка – альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і карбоксифенілгідрозонів (КФГ) за реакцією взаємодії окиснених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідрозоном (2,4-ДНФГ) [Halliwell В., 1999; Чекман І.С., 2016]. Стан тіол-дисульфідної системи головного мозку оцінювали за вмістом відновленого глутатіону (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) флуориметрично з о-фталеєвим ангідридом на флуориметрі Quantech [Чекман І.С., 2016]. Рівень вільних SH-груп (по реакції з 5,5-дітіо-біс-7-нітробензойною кислотою), активність глутатіонредуктази (ГР) (НАДФН-залежна реакція відновлення GSH), глутатіонпероксидази (ГПП) (по реакції з гідроперекису трет-бутилу) та глутатіонтрансферази (GST) вимірювали спектрофотометрично [Чекман І.С., 2016] – на спектрофотометрі Libra S 32 PC. Енергетичний обмін міокарда та головного мозку визначали за вмістом АТФ, АДФ, АМФ [Чекман І.С., 2016], стан гліколізу оцінювали за рівнем лактату [Hohorst Н.Ј., 1970; Чекман І.С., 2016] і пірувату [Czok R., Lamprecht W., 1972; Чекман І.С., 2016]; окислення в циклі Кребса визначали за вмістом малату та активності мітохондріальної НАДН-малатдегідрогенази (МДГ) [Hohorst Н.Ј., 1970; Lundblad R.L., 2010; Чекман І.С., 2016]. Стан нітросидергічної системи оцінювали за активністю NO-синтази (NOS), вмістом нітратів, концентрацією мРНК іNOS і мРНК eNOS. Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту визначали за реакцією з реактивом Грісса [Чекман І.С., 2010]. Активність NOS визначали спектрофотометрично при 340 нм методом, в основі якого знаходиться стехіометричне окиснення НАДФН в процесі реакції утворення NO із L-аргініну [Чекман І.С., 2014]. Для оцінки стану експресії мРНК іNOS і мРНК eNOS використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР), ампліфікатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Вміст HSP<sub>70</sub>, білку визначали методом вестерн-блот аналізу. Активність МВ-КФК в сироватці крові та активність КФК-мт і КФК-цт визначали на біохімічному аналізаторі Prestige 24i. Концентрацію аргініну, аспартату, метіоніну, цистеїну визначали методом тонкошарової хроматографії [Чекман І.С., 2016]. Концентрацію білка оцінювали за методом Бредфорда. Нітротирозин визначали твердофазним імуносорбентним сендвіч-методом ELISA (№ НК 501-02 фірми Nuncult Biotech). Дослідження референтної і робочої пам'яті у тварин з ВК проводили за допомогою радіального лабіринту LE760 (AgnTho's, Sweden). Захоплення і запис зображення проводився за допомогою кольорової відеокамери SSC-DC378P (Sony, Japan). Проведено квантово-хімічні розрахунки дескрипторів НОМОEnergy (вища зайнята молекулярна орбіталь) і LUMOEnergy (нижча вакантна молекулярна орбіталь) [Mariko Ishihara, 2010] за допомогою програмного комплексу WinMorac (v. 7.2). Оптимізація структури досягалася використанням напівемпіричного методу AM1 за параметрами: Calculation=SinglePoint, WaveFunction=ClosedShell

(RHF). Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилася перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk та Колмогорова-Смірнова). За умов нормального розподілу встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного *U*-критерію Мана-Уїтні. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію  $\chi^2$  з аналізом таблиць спряженості. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі, або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності  $p < 0,05$  (95%). Програму віртуального скринінгу реалізовано у вигляді веб-додатку мовою програмування Python, яка може використовуватися для створення комбінаторних бібліотек, опису когнітивних мереж, моделювання реакцій оксидативного стресу, роботи нітроксидергічної системи і активації нітрозуючого стресу.

### **Результати досліджень та їх обговорення.**

Для оптимізації пошуку скавенджерів NO серед похідних ксантину нами було розроблено та реалізовано електронно-топологічний підхід, що включає наступні етапи роботи: розрахунок квантово-хімічних характеристик молекул за допомогою програмного комплексу WinMOPAC (з використанням конформаційного аналізу); дослідження АОА in vitro по інгібуванню NO 122 похідних ксантину; розрахунок залежності між параметрами квантово-хімічних сполук і АОА; створення робочих баз даних показників АОА і квантово-хімічних параметрів сполук; створення програми віртуального скринінгу на основі алгоритму, що враховує залежність квантово-хімічних сполук та їх АОА; тестування комп'ютерної програми на знову синтезованих сполуках.

Фармакологічним скринінгом АОА in vitro серед 122 похідних ксантину було встановлено, що в діапазоні концентрації  $10^{-7}$  М- $10^{-3}$  М – 46-121 сполука відповідно проявляють властивості скавенджерів NO, із них по силі дії перевершують НАС 46-117 сполук відповідно. Після проведених квантово-хімічних розрахунків похідних ксантину та визначення АОА досліджуваних сполук на моделі інгібування NO, була встановлена залежність біологічної дії речовин від їх квантово-хімічних дескрипторів та визначена функція їх залежності. Була знайдена залежність між значеннями однієї випадкової величини і відповідними їй середніми значеннями іншої випадкової величини. Проведено аналіз залежності антиоксидантної

активності від квантово-хімічних показників похідних ксантину за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням наступних моделей : Linear Regression, Support Vector Machine Regression, Random Forest Regression, Gradient Boosting Regression, K-Nearest Neighbors Regression. В результаті проведеного аналізу нами були перевірені кілька моделей для вирішення задач регресії. Кращими моделями без застосування оптимізації виявилися моделі "опорних векторів" і "к-найближчих сусідів". При оптимізації досліджуваних моделей найкращу узагальнюючу здатність показала модель "градієнтного бустінга" з помилкою в межах 16%. Дана модель може бути використана для предикту антиоксидантної активності на підставі квантово-хімічних показників. Подальше поліпшення якості моделі можливо за рахунок збільшення навчальної та тестової вибірок, а також розширення ознак для поглиблення моделі та поліпшення узагальнюючої здатності. Розроблено і створено програму віртуального скринінгу речовин з потенційною АОА по інгібуванню NO. Нами було визнано за доцільне випробувати дану програму на знову синтезованих сполуках. Дизайн структури та синтез нових похідних ксантину здійснювався на підставі виявленої нами закономірності залежності між квантово-хімічними параметрами вивчених сполук та їх АОА по інгібуванню NO. В процесі тестування 7 нових синтезованих похідних ксантину комп'ютерна програма надала можливість прогнозу найбільш виражених властивостей скавенджера NO у гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3). Дослідами *in vitro* прогноз властивостей скавенджера NO у С-3 був підтверджений (267,3%). Базуючись на даних попередніх досліджень і результатів програми віртуального скринінгу та для її більш поглибленого випробування було прийняте рішення вивчення антиоксидантної дії С-3 в дослідях *in vitro* в суспензії нейронів та *in vivo* на моделях ішемії головного мозку і міокарду. Дослідженнями *in vitro* було встановлено, що внесення нейротоксичних доз DNIC у суспензію нейронів призводило до розвитку нітрозуючого стресу (підвищення рівня нітротирозину на 230%) на тлі пригнічення глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи (зниження GSH на 68,4%, підвищення його окисненої форми на 321%, падіння активності ГПП на 79,6% і ГР на 74,7%). Моделювання нітрозуючого стресу *in vitro* призводило і до зниження концентрації ендogenous цитопротектора HSP<sub>70</sub> на 51%. Надлишок NO і його цитотоксичних форм призводить до депривації GSH-залежних ланок ендogenous нейропротекції, а саме до дефіциту HSP<sub>70</sub> [Belenichev I., Pavlov S., 2014]. Внесення в інкубаційну суміш С-3 (10<sup>-5</sup> М) призводить до зниження нітротирозину на 45% і окисненого глутатіону на 53,2% на тлі збільшення концентрації GSH на 43,8% і підвищення активності GSH-залежних ферментів – ГПП на 337% і ГР на 195% (p<0,05). Варто відзначити, що антиоксидантна дія С-3 відбувається на тлі підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> на 34,7% (p<0,05). Регулюючи рівень NO і його цитотоксичних форм, С-3 здатний знижувати депресію GSH, який визначає концентрацію HSP<sub>70</sub> [Беленичев И.Ф., Горбачева С.В., 2020]. За силою дії С-3 достовірно перевершує мексидол (10<sup>-5</sup> М). Отримані результати експериментально

підтвердили прогноз програми віртуального скринінгу щодо наявності у сполуки С-3 властивостей скавенджера NO. Подальші дослідження на експериментальних тваринах показали, що курсове введення шурам з ІМ сполуки С-3 (100 мг/кг) приводило к поліпшенню електрофізіологічних показників серця, що свідчило про протиішемічну дію С-3 – зниження ЧСС на 22,3% та зменшення відхилення ST на 78,4% ( $p < 0,05$ ). При експериментальному ІМ спостерігалось гальмування активності СОД на 59,6%, ГПР на 56,7% і підвищення рівня маркерів окисної модифікації білка АФГ на 194,1%, КФГ на 111,5% і маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину на 70,1% в міокарді ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Введення сполуки С-3 тваринам з експериментальним ІМ надавало значний антиоксидантний ефект, що проявлялося в підвищенні активності СОД на 140% і ГПР на 118,7% в цитозолі міокарда ( $p < 0,05$ ). Відзначено найбільш виражену позитивну дію С-3 на активність СОД – ферменту, що нейтралізує супероксидрадикал і регулює багато АФК-залежних механізмів регуляції метаболізму, пригнічує запалення та апоптоз [Супрун Э.В., 2016; Ren X., 2018]. Введення С-3 призводило і до зниження маркерних продуктів оксидативного і нітрозуючого стресів – АФГ на 61%, КФГ на 48,3% і нітротирозину на 40,9% в міокарді ( $p < 0,05$ ). Антиоксидантний механізм грає важливу роль в реалізації загальної кардіопротективної дії, оскільки збільшення продукції АФК та продуктів окисної модифікації білка може мати вирішальне значення в активації апоптозу, який є важливим фактором прогресування ІХС та є важливим механізмом у розвитку ендотеліальної дисфункції, яка сприяє системній вазоконстрикції і підвищенню навантаження на серце [Хлопонин Д.П., 2012; Чекман І.С., Нагорна О.О., 2019]. За силою антиоксидантної дії С-3 перевершує мілдронат. Введення тваринам з ІМ сполуки С-3 призводить до нормалізації експресії мРНК eNOS і мРНК iNOS в міокарді. Так, було відмічено підвищення експресії мРНК eNOS під дією С-3 в 6,9 разів ( $p < 0,01$ ) і зменшення експресії мРНК iNOS на 92,7% ( $p < 0,05$ ). Наслідком цієї дії стало підвищення активності загальної NOS на 42%. Можливо С-3, будучи скавенджером NO, здатний впливати на АФК-залежні механізми регуляції експресії NOS. Не виключена можливість і прямої протективної дії С-3 на NOS від окисної модифікації, що підтверджується дослідями *in vitro* [Беленичев І.Ф., 2014]. С-3 здійснює вплив і стосовно транспорту NO за рахунок збереження SH-вмістних сполук. Так, введення С-3 тваринам з експериментальним інфарктом міокарда підвищує рівень SH-вмістних сполук на 48% в міокарді ( $p < 0,05$ ). Подібна дія може забезпечуватися за рахунок прямої антиоксидантної дії С-3. Ми припускаємо, що сполука С-3 проявляючи властивості спінової пастки NO [Беленичев І.Ф., Левич С.В., 2018], може виступати в якості транспортної молекули. Також зростання загальних тіолів при введенні С-3 може забезпечуватися за рахунок підвищення активності ГР в цитоплазмі міокарда на 124,7% ( $p < 0,05$ ). Нормалізація системи NO в ішемізованому міокарді дуже важлива з точки зору кардіопротекції. Відомо, що формування ішемії міокарда протікає на тлі пригнічення експресії eNOS, що бере участь у реалізації механізмів

ендогенної кардіопротекції і посиленні експресії iNOS, яке бере участь в реалізації програми апоптозу [Warner T.D., 2009].

Таблиця 1

**Вплив С-3 і мілдронату на показники системи NO, оксидативного стресу, енергетичного метаболізму міокарда при ізадрин-пітуїтриновому ІМ**

Групи тварин (n=10)	Нітритрозин, нм/г тканини	КФГ, у.о./г білка	NOS, нМ/мг/хв	мРНК eNOS, у.о.	мРНК iNOS, у.о.	АТФ, мкм/г
Інтакт	18,4±1,4	8,7±0,39	32,4±2,28	1,00±0,0105	1,00±0,012	2,87±0,097
ІМ (контроль)	31,3±2,72	18,4±1,05	15,0±2,16	0,102±0,001	1,48±0,011	1,75±0,14
ІМ + С-3, 100 мг/кг	18,5±1,46* <sup>1</sup>	9,5±0,94* <sup>1</sup>	21,3±2,12* <sup>1</sup>	0,71±0,005* <sup>1</sup>	1,07±0,001* <sup>1</sup>	2,66±0,12*
ІМ + мілдронат, 250 мг/кг	30,7±2,12	14,7±1,51*	16,5±1,07	0,179±0,007	1,51±0,012	2,28±0,11*

Примітки: \* –  $p < 0,05$  по відношенню до контрольної групи; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  по відношенню до групи мілдронату; n – кількість тварин в групі.

Призначення тваринам з ІМ сполуки С-3 призводило до посилення продукції АТФ на 52% ( $p < 0,05$ ) за рахунок інтенсифікації аеробних процесів. Слід підкреслити, що підвищення рівня АТФ в міокарді тварин з ІМ, які отримували С-3, відбувалося на тлі збільшення АДФ на 138,6% ( $p < 0,05$ ) і зменшення вмісту АДФ на 60%. Сполука С-3 обмежувала активність малопродуктивного анаеробного гліколізу в умовах ішемії, про що свідчило зниження рівня лактату на 48,4% ( $p < 0,05$ ). Сполука С-3 призводила до підвищення активності МДГ в ішемізованому міокарді на 109%, збільшення вмісту малату на 112,3% і глутамату на 33,3% ( $p < 0,05$ ), що може свідчити про підвищення активності малат-аспартатного човникового механізму. Малат-аспартатний шунт грає важливу роль в механізмах адаптації кардіоміоцитів до ішемії, від його активності залежить ресинтез АТФ, і зростання малата свідчить про збільшення потужності відповідного компенсаторного механізму [Тишкин В.С., 1991; Дунаев В.В., 2010]. Введення С-3 призводило до підвищення активності КФК-мх на 76,7% і КФК-цт на 40,2% ( $p < 0,05$ ). Виявлений факт свідчить про те, що введення С-3 призводить до збільшення транспорту енергії та її утилізації скорочувальними структурами міокарда. В сироватці крові тварин з ІМ, які отримували С-3, було виявлено зменшення гіперферментемії МВ-КФК на 64,6% ( $p < 0,05$ ), що підтверджувало протиішемічну дію цієї сполуки. Призначення мілдронату в умовах ішемії міокарда призводить до збільшення синтезу АТФ за рахунок активації анаеробного гліколізу. За силою протиішемічної дії С-3 перевершує мілдронат. Можна припустити, що домінуючим механізмом кардіопротективної і протиішемічної дії С-3 є антиоксидантний за рахунок якого можуть знижуватися АФК/NO-залежні процеси окислювальної модифікації мембран мітохондрій та гальмування процесів формування дисфункції мітохондрій кардіоміоцитів в умовах ішемії.

Моделювання гострої робочої гіпоксії призводило до формування ішемії міокарда – дефіциту енергії, підвищення рівня лактату, дискоординації в циклі Кребса, активації оксидативного і нітрозуючого стресів, а також зниження толерантності до фізичного навантаження, що виражалося в зменшенні тривалості бігу (табл. 2). Профілактичне введення сполуки С-3 (100 мг/кг) надавало значний антиоксидантний ефект, спрямований на пригнічення реакцій оксидативного стресу. Так, в міокарді експериментальних тварин, які отримували С-3 спостерігалось зниження маркерів окисної модифікації білка – АФГ на 40,4%, КФГ – на 45,8% і нітротирозину на 35,2% ( $p<0,05$ ). Введення сполуки С-3 призводило до збільшення активності СОД в цитоплазмі міокарда на 56,0%. Введення сполуки С-3 надавало і протиішемичну дію, сприяючи більш «економному» витрачання енергетичних ресурсів міокарда при робочій гіпоксії, викликаній різким анаеробним навантаженням. С-3 призводило до збільшення вмісту АТФ в міокарді на 34,1% збільшувало вміст малату на 53,3% і пірувату на 17,5% та зменшувало вміст лактату на 43,4% в міокарді ( $p<0,05$ ). Введення С-3 приводило і до підвищення толерантності до фізичних навантажень (збільшення тривалості бігу на третбані на 177,9%).

Таблиця 2

**Вплив С-3 і мілдронату на показники фізичної витривалості, оксидативного стресу, енергетичного метаболізму міокарда при гострій робочій гіпоксії на фоні введення пітуїтрину**

Групи тварин (n=10)	Тривалість бігу, хв.	Нітротирозин, нм/г білка	Лактат, мкм/г	Малат, мкм/г	АТФ, мкм/г
Інтакт	11,88±2,6	21,3±1,98	2,427±0,58	0,71±0,03	2,9±0,11
Біг до виснаження (контроль)	2,66±0,67	49,43±3,8	5,56±0,47	0,469±0,04	1,92±0,10
Біг до виснаження + С-3, 100 мг/кг	6,2±0,48* <sup>1</sup>	30,1±3,5* <sup>1</sup>	2,82±0,26* <sup>1</sup>	0,61±0,02* <sup>1</sup>	2,52±0,08*
Біг до виснаження + мілдронат, 250 мг/кг	3,53±0,37	40,9±3,7	7,07±0,61*	0,483±0,03	2,27±0,05*

Примітки: \* –  $p<0,05$  по відношенню до контрольної групи; <sup>1</sup> –  $p<0,05$  по відношенню до групи мілдронату; n – кількість тварин в групі.

Введення сполуки С-3 тваринам, підданим фізичному навантаженню на тлі коронарспазму, надавало антиоксидантну дію, знижуючи утворення маркерів окисної модифікації білка в міокарді – АФГ на 31,3%, КФГ на 39,7% і нітротирозину на 39,1% та призводило до підвищення активності СОД на 77,9% ( $p<0,05$ ). Введення сполуки С-3 надавало протиішемичну дію, покращуючи енергетичний обмін міокарда на піку фізичної втоми. Так, зміст АТФ в міокарді тварин, які отримували С-3 збільшувався на 31,2%, вміст лактату знизився на 49,2%, при цьому збільшився вміст малату на 30% і пірувату на 22,3% ( $p<0,05$ ). В умовах відтворення моделі робочої гіпоксії в якості домінуючого механізму дії С-3 ми також розглядаємо антиоксидантний. В результаті реалізації антиоксидантної і протиішемичної дії С-3 в умовах більш жорсткої моделі робочої гіпоксії стало і підвищення

толерантності до фізичних навантажень на 133% у тварин цієї групи ( $p < 0,05$ ). Введення С-3 призводить і до зниження гіперферментемії МВ-КФК на 49,2% ( $p < 0,05$ ). За силою антиоксидантної, актопротективної та протиішемичної дії С-3 перевершує мілдронат. Моделювання ВК призводить до порушення нітросидергічної системи і ініціюванню нітрузуючого стресу в мозку експериментальних тварин (табл. 3). Курсове призначення С-3 (100 мг/кг) тваринам з ВК призводило до зниження в СА1-зоні гіпокампа експресії мРНК nNOS стосовно значень контролю на 95,3% і підвищенню експресії мРНК nNOS на 24,4% стосовно значень хибнооперованих тварин ( $p < 0,05$ ). Експресія мРНК iNOS при введенні С-3 знижувалася на 99,4% щодо контролю і була на рівні значень хибнооперованих тварин ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 3

**Вплив С-3, мексидолу і пірацетаму на молекулярно-біохімічні показники NO-залежної нейродеструкції в мозку щурів на 4-ту добу після ВК**

Групи тварин	мРНК iNOS, у.о.	Нітротирозин (мітох), нм/г білка	iNOS (мітох), у.о./г білка	NOS (мітох), нмоль/мг белка/хв	мРНК nNOS, у.о.
ХО (n=20)	-	7,11±0,42	0,08 ± 0,005	1,22±0,03	-
ВК (контроль) (n=20)	1,00±0,067	21,1±1,12	0,32 ± 0,012	5,21±0,31	1,00±0,0211
ВК+С-3, 100 мг/кг (n=24)	0,0057±0,00011 <sup>*1,2</sup>	10,7±0,88 <sup>*1,2</sup>	0,16 ± 0,0022 <sup>*2</sup>	2,55±0,22 <sup>*1,2</sup>	0,047±0,0091 <sup>*1,2</sup>
ВК+ пірацетам, 500 мг/кг (n=24)	1,07±0,0018	18,5±1,32 <sup>*</sup>	0,28 ± 0,016	5,22±0,42	1,24±0,053
ВК+ мексидол, 200 мг/кг (n=22)	0,123 ± 0,00012 <sup>*</sup>	15,2±1,16 <sup>*</sup>	0,21 ± 0,010 <sup>*</sup>	4,11±0,33 <sup>*</sup>	0,917±0,0013

Примітки: \* –  $p < 0,05$  по відношенню до контрольної групи; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  по відношенню до групи мілдронату; n – кількість тварин в групі.

Призначення сполуки С-3 тваринам з ВК призводило до зниження в мітохондріях головного мозку активності NOS на 51%, нітритів на 38,9%, нітротирозину на 49,3% відповідно ( $p < 0,05$ ). Введення С-3 призводило до зниження експресії iNOS в мітохондріях головного мозку на 50% ( $p < 0,05$ ). Зниження експресії iNOS в умовах ішемії головного мозку можна пояснити здатністю С-3 пов'язувати АФК, які продукуються енергетичними реакціями мітохондрій та беруть участь в її експресії, а також можливим впливом на найбільш важливі ІЛ-1b-залежні механізми експресії iNOS [Suprun E., 2014]. За ступенем впливу на показники системи NO С-3 достовірно перевершує мексидол и пірацетам. Моделювання ВК у щурів призводить до зміщення тіол-дисульфідної системи у вигляді зменшення пулу її відновлених форм і підвищення окиснених на тлі пригнічення активності GSH-залежних ферментів на 4-ту добу експерименту. Введення тваринам з ВК сполуки С-3 приводило до підвищення активності ГР на 77,3%, ГПР на 82,3% і Г-S-T на 79% відповідно ( $p < 0,05$ ). Мексидол та пірацетам за ступенем впливу на активність GSH -залежних ферментів достовірно поступались сполуці С-3.

Таблиця 4

**Вплив С-3, мексидолу і пірацетаму на молекулярно-біохімічні показники  
ендогенної нейропротекції в мозку щурів на 4-ту добу після ВК**

Групи тварин	GSH (цітопл), мкмоль/г тканини	Г-S-T (цітопл), мкмоль/мг білка /хв	SH-групи (цітопл), мкмоль/г тканини	HSP <sub>70</sub> (цітопл), у.о./ г білка	HSP <sub>70</sub> (мітох), у.о./ г білка
ХО (n=20)	4,7 ± 0,21	16,8±1,12	58,3 ±2,7	15,7 ±0,37	7,1 ±0,22
ВК (контроль) (n=20)	1,32 ± 0,03	8,1±0,57	18,4 ± 1,4	7,7 ± 0,61	3,7 ± 0,14
ВК + С-3, 100 мг/кг (n=24)	3,14 ±0,14* <sup>1,2</sup>	14,5±1,22* <sup>1,2</sup>	42,6 ± 2,5* <sup>1,2</sup>	14,7 ± 1,2* <sup>2</sup>	7,2 ± 0,34* <sup>1,2</sup>
ВК + пірацетам, 500 мг/кг (n=24)	1,55 ± 0,02	8,1±0,77	19,2 ± 1,7	7,3 ± 0,81	3,9 ± 0,21
ВК + мексидол, 200 мг/кг (n=22)	1,87 ± 0,12*	10,8±0,82*	25,4 ± 1,2*	11,7 ± 0,72* <sup>2</sup>	4,7 ± 0,23

Примітки: \* – p<0,05 по відношенню до контрольної групи; <sup>1</sup> – p<0,05 по відношенню до групи мілдронату; n – кількість тварин в групі.

Введення С-3 приводило до збільшення відновлених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи (на 131,5%) (p<0,05) на 4-ту добу експерименту у головному мозку в порівнянні з контролем. Паралельно відзначалося підвищення на 137,8% (p<0,05) рівня GSH на тлі зниження вмісту його окисненої форми на 29,7% (p<0,05). Застосування С-3 призводило і до зниження вмісту в мозку потенційних нейротоксичних речовин, таких як гомоцистеїн на 44,5% (p<0,05). С-3 призводить до підвищення в головному мозку тварин з ВК цистеїну на 47,3% (p<0,05). Цистеїн є ендogenous сквенджером АФК, бере участь в синтезі глутатіону, здатний переривати ІЛ-1 $\beta$ -залежні механізми експресії iNOS та регулює АФК-залежні механізми експресії ядерного фактора NF- $\kappa$ B, що контролює експресію генів апоптозу і клітинного циклу [Aquilano R., 2014; Беленичев И.Ф., 2020]. Можливо припустити, що С-3 в якості сквенджера NO сприяє підвищенню його біодоступності та зменшує нейротоксичність, а також нормалізує тіол-дисульфідну рівновагу, що може регулювати SH/NO-механізми нейродеструкції/нейропротекції. При введенні С-3 щурам з ВК концентрація білка HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі гомогенату головного мозку тварин підвищувалася на 90,9%, а в мітохондріях на 94,6% у порівнянні з показниками контролю на 4-ту добу експерименту (p<0,05). Подібну дію С-3 можна розцінювати як важливий аспект його протиішемичної та нейропротективної дії і, як наслідок, його антиоксидантних властивостей. HSP<sub>70</sub> володіє шаперонною активністю, підвищення його рівня відіграє значну роль в нормалізації життєдіяльності клітин, сприяє активації і регуляції компенсаторних шунтів енергії і запобіганню розвитку апоптозу в умовах гострої судинної патології головного мозку [Belenichev I., Pavlov S., 2014]. При оцінці специфічних



показників навчання в радіальному лабіринті було виявлено, що через 29 діб після ВК у тварин сформувався стійкий когнітивний дефіцит. Введення С-3 призводило до підвищення загальної рухової активності і зниження помилок референтної на 57% ( $p < 0,05$ ) і робочої пам'яті на 58,8% ( $p < 0,05$ ), що свідчило про позитивну дію даної сполуки на когнітивно-мнестичні функції ЦНС після ВК. Протиішемічна дія С-3 при експериментальному ІМ, робочій гіпоксії і ВК визначається його властивостями скавенджера NO і направлена на переривання АФК/SH-залежних механізмів порушень енергетичного метаболізму, депривації системи ендогенної цитопротекції, зниження фізичної витривалості і когнітивного дефіциту. Таким чином, результати дослідження підтверджують об'єктивність комплексного підходу, що включає в себе комп'ютерну програму, скринінг *in vitro* та *in vivo*, до цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, присвяченій рішення актуальної задачі фармакології – цілеспрямованому пошуку скавенджерів NO, в результаті комплексного підходу виявлена сполука серед похідних ксантину – гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти з властивостями скавенджера NO і експериментально обґрунтовано перспективи її застосування в комплексній терапії інфаркту міокарда та мозкового інсульту в якості антиоксидантного і протиішемічного засобу.

1. На підставі результатів дослідження антиоксидантної активності *in vitro* серед 122 похідних ксантину і квантово-хімічних розрахунків цих молекул, формування банків і баз даних по структурам і здатності інгібувати NO розроблено комп'ютерну програму, застосування якої дозволило виявити сполуку – гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3) з властивостями скавенджера NO (267,3%) в досліджах *in vitro*.

2. Попереднє внесення С-3 ( $10^{-5}$  М) в суспензію нейронів з послідуочим моделюванням нітрозативного стресу (DNIC, 250мкМ) призводить до зниження нітротирозину на 45%, збільшення GSH на 43,8%, HSP<sub>70</sub> на 34,7% і підвищення активності ГПР на 337% і ГР на 195% ( $p < 0,05$ ).

3. Введення С-3 в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково тваринам з інфарктом міокарда призводило до зменшення відхилення ST на 78,4% на ЕКГ та МВ-КФК в сиворотці (38,5%), нормалізації нітроксидергічної системи – підвищення мРНК eNOS в 6,9 разів, зменшення мРНК iNOS (92,7%), підвищення активності NOS (42%), нітрит-аніону (79,1%), до гальмування оксидативного стресу – зниження АФГ (61%), КФГ (48,3%) і нітротирозину (40,9%) на тлі підвищення активності АО-ферментів – СОД (140%) і ГПР (118,7%), ГР (124,7%) та поліпшення енергетичного метаболізму – підвищення АТФ (52%), малату (112%), МДГ (109%) і зниження лактату (48,4%) в серці ( $p < 0,05$ ).

4. Попереднє введення С-3 (100 мг/кг) внутрішньошлунково тваринам з гострою робочою гіпоксією призводило до підвищення фізичної

виривалості (133,0%-177,9%), гальмування оксидативного стресу – зниження АФГ (31,3%-40,4%), КФГ (39,7%-45,8%), нітротирозину (39,1%-35,2%), до поліпшення енергетичного метаболізму – підвищення АТФ (31,2%-34,1%), малату (30%-53,3%) і зниження лактату (49,2%-43,4%) в серці ( $p<0,05$ ).

5. Внутрішньошлункове введення С-3 (100 мг/кг) тваринам з ВК призводило до нормалізації пов'язаних систем NO/SH – зниженню експресії РНК іNOS (99,4%), мРНК nNOS (95,3%) в СА1 гіпокампі, концентрації іNOS (50%) нітротирозину (49,3%), активності NOS (51%) в мітохондріях на тлі підвищення GSH (137,8%), активності ГР (77,3%), ГПР (82,3%), GST (79%), активації ендогенної нейропротекції – підвищенню HSP<sub>70</sub> на 90,9% в мітохондріях і на 94,6% в цитозолі головного мозку ( $p<0,05$ ) на 4-ту добу і зниженню помилок робочої пам'яті на 58,8% і референтної пам'яті на 57% на 29-у добу експерименту ( $p<0,05$ ).

6. Сполука С-3 перевершує мілдронат ( $p<0,05$ ) по зниженню нітротирозину, мРНК іNOS, підвищенню мРНК eNOS, активності NOS та активності МДГ і малата при ІМ, зниженню нітротирозину і підвищенню малата при робочій гіпоксії, а також перевершує мексидол ( $p<0,05$ ) і пірацетам ( $p<0,05$ ) по зниженню нітротирозину і мРНК іNOS, іNOS, підвищенню HSP<sub>70</sub> і поліпшенню пам'яті після ВК.

7. Важливою ланкою протиішемічної дії С-3 при експериментальному ІМ, робочій гіпоксії і ВК є модуляція NO/SH-залежних механізмів ендогенної кардіо- та нейропротекції, що реалізуються за рахунок властивостей скавенджера NO.

## СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Рыженко В.П. Антиоксидантный механизм нейропротективного действия производного 3-метилксантина (соединения С-3) в условиях внутримозгового кровоизлияния / С.Г. Носач, И.Ф. Беленичев, Е.В. Александрова, С.В. Левич, В.П. Рыженко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – №1 (47). – С. 31–38. *(Особистий внесок: набір матеріалу, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

2. Ryzhenko V.P. Analysis of influence of quantum chemical descriptors on NO-scavenger properties among xanthine derivatives / О.А. Ryzhov, V.P. Ryzhenko, S.V. Levich, I.F. Belenichev // Biological markers and guided therapy. – 2017. – Vol. 4, №1, – P. 38–48. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

3. Victor P. Ryzhenko Study of Dependence of Xanthine Derivatives NO-Scavenger Properties from Energy Descriptors / Victor P. Ryzhenko, Olexii A. Ryzhov, Igor F. Belenichev and Sergii V. Levich // Biological markers and guided

therapy. – 2018. – Vol. 5, №1, – P. 37–46. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

4. Рыженко В.П. Экспериментально-теоретические подходы к созданию компьютерной программы для виртуального скрининга скавенджеров NO в ряду азаетероциклов / В. П. Рыженко, И. Ф. Беленичев, А. А. Рыжов, С. В. Левич // Медична інформатика та інженерія. – 2018. – №3. – С. 54–57. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

5. Ryzhenko V.P. Development of software for prediction and virtual screening of antioxidant activity of new synthesized azaheterocyclic compounds / V.P. Ryzhenko, I.F. Belenichev, I.B. Samura, O.A. Ryzhov // International Journal of Basic & Clinical Pharmacology. – 2019. – Vol. 8, №6, – P. 1292–1296. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

6. Рыженко В.П. Аспекты создания нейропротективных, противовоспалительных лекарственных средств / И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев, А.О. Сырочая, Н.А. Горчакова, Н.В. Бухтиярова, В.П. Рыженко, О.Л. Левашова, Н.Н. Чаленко // Доповіді Національної академії наук України. – 2019. – №9. – С. 88-98. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

7. Ryzhenko V.P. Markers of oxidative stress and energy metabolism in the rat myocardium during physical exertion and during the introduction of an antioxidant–8-benzylaminotheophyllinyl-7-acetic acid hydrazide (C-3) / V.P. Ryzhenko, N.V. Bukhtiyarova, S.V. Levich, O.A. Ryzhov, L.V. Makyeyeva // Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific journal). – 2019. – Vol. 3, №2, – P. 19–26. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

8. Рыженко В.П. Комплексный подход к разработке и созданию компьютерной программы виртуального скрининга антиоксидантной активности / В.П. Рыженко, А.А. Рыжов, И.Ф. Беленичев, С.В. Левич // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2020. – №14 (1). – С. 43-52. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

9. Рыженко В.П. Антиоксидантная активность в ряду производных 2-метилксантина и ее взаимосвязь с параметрами молекулярной структуры / В.П. Рыженко // Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015: тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки, 14-15 трав. 2015 р. – Запоріжжя, 2015. – С. 34.

10. Рыженко В.П. Целенаправленный поиск веществ в ряду производных 3-арил(аралкил) ксантина, обладающих антирадикальной активностью в отношении супероксид-радикала / В.П. Рыженко, А.А. Рыжов, С.В. Левич, И.Ф. Беленичев, Е.В. Александрова // Медична інформатика та інженерія. – 2016. – №1. – С. 109.

11. Рыженко В. Використання програмного комплексу для цілеспрямованого пошуку скавенджерів супероксид радикалу в ряду похідних 3-аралкілксантину / В. Рыженко, О. Рыжов, І. Беленічев, К. Александрова, С. Левіч // Матеріали XX Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених. – Тернопіль. – 2016. – С. 344.

12. Рыженко В.П. Расчеты взаимосвязи структура-активность антиоксидантных свойств в отношении пероксинитрита у производных 3-арил (аралкил) ксантина с использованием квантово-химических, физико-химических и пространственных дескрипторов / В.П. Рыженко // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016». - Запоріжжя. – 2016. – С. 246-247.

13. Рыженко В.П. QSAR анализ ингибирования монооксида азота NO<sup>•</sup> для похідних ксантину / Д.В. Лукашов [та ін.] // Матеріали XXIV Української конференції з органічної хімії, (Полтава, 19-23 вересня 2016 р.) – Полтава: Полтавський національний педагогічний університет ім. В.Г. Короленка, 2016. – С. 279.

14. Рыженко В.П. Цілеспрямований пошук речовин в ряду похідних 3-арил (аралкіл) ксантину, які володіють антирадикальною активністю щодо супероксид-радикалу / О.А. Рыжов, В.П. Рыженко // Актуальні питання дистанційної освіти та телемедицини 2016: матеріали Всеукраїнської науково-методичної відеоконференції з міжнародною участю (13 жовтня 2016 року, м. Запоріжжя) – Запоріжжя, 2016. – С. 60.

15. Рыженко В.П. Використання квантово-хімічних розрахунків для пошуку інгібіторів супероксидрадикалу серед похідних 3-арилксантину / В.П. Рыженко, О.А. Рыжов, І.Ф. Беленічев, С.В. Левіч // Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології : Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, пам'яті професора В. В. Дунаєва : тези доповідей (24-25 листопада 2016 р.). – Запоріжжя, 2016. – С. 65-66.

16. Рыженко В.П. Дескрипторы молекулярной структуры производных 3-арил(аралкил)ксантина в компьютерном расчете антиоксидантных свойств: от прогноза до экспериментального подтверждения / В.П. Рыженко, С.В. Левич // Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для студентів та молодих вчених) : науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження І. Г. Герцена. Одеса, 27–28 квітня 2017 року : тези доповідей – Одеса : ОНМедУ, 2017. – С. 195.

17. Рыженко В.П. Поиск ингибиторов супероксидрадикала среди производных 3-арилксантина при помощи квантово-химических расчетов / В.П. Рыженко, А.А. Рыжов // Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017 :

тези Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки (11-12 травня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. – С. 36.

18. Ryzhenko V.P. Xanthine derivatives as NO-inhibitors. QSAR analysis / V.P. Ryzhenko, S.V. Levich // Актуальні питання сучасної медицини і фармації : тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції (до 50-річчя заснування ЗДМУ), 18-25 квітня 2018 р., 30 травня 2018 р. – Запоріжжя, 2018. – С. 188.

19. Ryzhenko V.P. Molecular design and mathematical prediction in the creation of neuroprotectors with an antioxidant mechanism of action / V.P. Ryzhenko, I.F. Belenichev, P.G. Bak, A.A. Ryzhov // 9th International conference Science and society 1st February 2019, Hamilton, Canada. – P. 566-577.

20. Риженко В.П. Алгоритми для комп'ютерної програми віртуального скринінгу антиоксидантної активності серед нових сполук ряду азаетероциклів / В.П. Риженко // Актуальні питання сучасної медицини і фармації : збірник тез доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів, 13–17 травня 2019 р. – Запоріжжя: ЗДМУ, 2019. – С. 151.

21. Риженко В.П. Програмне забезпечення скринінгу скавенджерів NO / Риженко В.П., Беленічев І.Ф., Рижов О.А., Левіч С.В. // Актуальні питання сучасної медицини і фармації : збірник тез доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції, 2020 р. – Запоріжжя: ЗДМУ, 2020. – С. 64.

## АНОТАЦІЯ

### **Риженко В.П. Оптимізація цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2020.

Вперше для оптимізації цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду знову синтезованих сполук розроблена комп'ютерна програма віртуального скринінгу за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням моделі "градієнтного бустінга", використання якої дозволило виявити серед похідних ксантину – гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3) з властивостями скавенджера NO. Встановлено, що С-3 підвищує рівень GSH і HSP<sub>70</sub> у суспензії нейронів в умовах нітрозативного стресу *in vitro*. Вперше показано, що С-3 (100 мг/кг) на моделі інфаркту міокарда нормалізує експресію eNOS/iNOS, продукцію NO і активує малат-аспартатний човниковий механізм, а на моделі ВК гальмує експресію iNOS, відновлює SH/SS рівновагу, підвищує HSP<sub>70</sub> і покращує показники пам'яті. С-3 підвищує толерантність до фізичних навантажень і покращує енергетичний метаболізм міокарда на моделі робочої гіпоксії. Встановлено перевагу С-3

перед мілдронатом, пірацетамом і мексидолом. Протиішемічна дія С-3 визначається її властивостями скавенджера NO і спрямована на переривання АФК/SH-залежних механізмів порушень енергетичного метаболізму і депривації системи ендогенної цитопротекції.

**Ключові слова:** скавенджери NO, ішемія міокарда, внутрішньомозковий крововилив, комп'ютерна програма, віртуальний скринінг, похідні ксантину.

## SUMMARY

### **Ryzhenko V.P. Optimization of purposeful search of NO scavengers in a number of xanthine derivatives. – Manuscript.**

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of biological sciences on a specialty 14.03.05 "Pharmacology". State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the actual task of modern pharmacology – the search for new effective antioxidants among xanthine derivatives for use in the treatment of myocardial and cerebral ischemia. The work is carried out for evaluation of the antioxidant activity of 122 xanthine derivatives in vitro with respect to NO inhibition. The dependence of antioxidant activity on quantum chemical parameters of xanthine derivatives was analyzed using machine learning algorithms using the following models: Linear Regression, Support Vector Machine Regression, Random Forest Regression, Gradient Boosting Regression, K-Nearest Neighbors Regression. As a result of our analysis, we tested several models for solving regression problems. The best models without the use of optimization were the models of "Reference vectors" and "K-nearest neighbors". When optimizing the studied models, the best generalizing ability was shown by the "Gradient boosting" model with an error within 16%. This model can be used for the prediction of antioxidant activity based on quantum chemical parameters. Further improvement of the quality of the model is possible by increasing the training and test samples, as well as expanding the features to deepen the model and improve the generalization ability. A program of virtual screening of substances with the properties of NO scavengers has been developed and created. In the process of testing the new synthesized xanthine derivatives, a computer program made it possible to predict the most pronounced properties of the NO scavenger in 8-benzylaminotheophilynyl-7-acetic acid hydrazide (C-3). In vitro experiments confirmed the prediction of the properties of the NO scavenger in C-3 (267,3%). When simulating nitrosating stress (DNIC, 250  $\mu$ M) in vitro, the introduction of C-3 in the incubation mixture (10-5M) leads to a decrease in nitrotyrosine by 45%, an increase in GSH by 43,8%, HSP<sub>70</sub> by 34,7% and an increase in GPR activity at 337% and GR by 195%. ( $p < 0,05$ ) in a suspension of neurons. Administration of C-3 (100 mg/kg) to animals with myocardial infarction led to a decrease in heart rate by 22,3% and a decrease in ST deviation by 78,4%

( $p < 0,05$ ), increased eNOS mRNA expression under the action of C-3 in 6,9 times ( $p < 0,05$ ) and to reduce the expression of iNOS mRNA by 92,7% ( $p < 0,05$ ) against the background of increasing the activity of total NOS by 42%, also to reduce AFH by 61%, KFH by 48,3%, nitrotyrosine by 40,9% in the myocardium ( $p < 0,05$ ). Administration of C-3 to animals with experimental myocardial infarction led to an increase in ATP by 52% due to activation of the compensatory malate-aspartate mechanism (increase in malate by 112%, malate dehydrogenase by 109%), as well as inhibition of anaerobic glycolysis (decrease in lactate by 48,4 %) in the heart ( $p < 0,05$ ). Prophylactic administration of C-3 (100 mg/kg) to animals in the simulation of acute occupational hypoxia led to increased tolerance to exercise (improved duration of treadmill running by 133,0-177,9 %) against the background of improved myocardial energy metabolism (increased ATP on 31,2%-34,1 %, malate by 30,0-53,3 % and reduction of lactate by 43,4-49,2 %) and to inhibition of oxidative stress (reduction of AFH by 31,3-40,4 % , KFH by 39,7-45,8 % and nitrotyrosine by 35,2-39,1 %) ( $p < 0,05$ ). Course administration of C-3 (100 mg/kg) to animals with intracerebral hemorrhage led to a decrease in nitrotyrosine in the mitochondrial fraction by 49,3%, RNA expression iNOS by 99,4%, iNOS by 50%, NOS activity by 51% on the background of an increase in the cytosol of GSH by 137,8%, HSP<sub>70</sub> by 90,9% in mitochondria and 94,6% in the cytosol of the brain ( $p < 0,05$ ) on the 4th day of the experiment. Course administration of C-3 to experimental animals for 18 days after intracerebral hemorrhage led to a decrease in errors of working memory by 58,8% and reference memory by 57% on the 29th day of the experiment ( $p < 0,05$ ). According to the main indicators of anti-ischemic and antioxidant action in experimental myocardial infarction, acute working hypoxia and intracerebral hemorrhage, C-3 is significantly superior to reference drugs (Mildronate, Mexidol and Piracetam). Antiischemic action of C-3 in experimental myocardial infarction, working hypoxia and intracerebral hemorrhage is determined by its properties of the NO scavenger and is aimed at interrupting the ROS/SH-dependent mechanisms of energy metabolism disorders, deprivation of the endogenous cytoprotection system, reduced physical endurance and cognitive deficit. The created computer program is a highly efficient and selective tool for virtual screening of NO scavengers in a number of newly synthesized structural-eastern azaheterocycles, which has been proven by computational testing and confirmed by experimental studies and can be used to optimize targeted search for new antioxidants and newly synthesized compounds. The experimentally established mechanism of action of the xanthine derivative – C-3 can contribute to the creation of a new generation of effective drugs with antioxidant action, interrupting NO-dependent links of ischemic damage to the myocardium and brain.

**Key words:** xanthine derivatives, NO scavengers, antioxidant action, cerebral and myocardial ischemia, virtual screening, computer program.

## АННОТАЦИЯ

### **Рыженко В.П. Оптимизация целенаправленного поиска скавенджеров NO в ряду производных ксантина. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев, 2020.

Впервые для оптимизации целенаправленного поиска скавенджеров NO в ряду вновь синтезированных соединений разработана компьютерная программа виртуального скрининга с помощью алгоритмов машинного обучения с использованием модели "градиентного бустинга", использование которой позволило выявить среди производных ксантина – гидразид 8-бензиламинотеофилинил 7-уксусной кислоты (С-3) со свойствами скавенджера NO. Установлено, что С-3 повышает уровень GSH и HSP<sub>70</sub> в суспензии нейронов в условиях нитрозативного стресса *in vitro*. Впервые показано, что С-3 (100 мг/кг) на модели инфаркта миокарда нормализует экспрессию eNOS/iNOS, продукцию NO и активирует малат-аспартатный челночный механизм, а на модели ВК тормозит экспрессию iNOS, восстанавливает SH/SS равновесие, повышает HSP<sub>70</sub> и улучшает показатели памяти. С-3 повышает толерантность к физическим нагрузкам и улучшает энергетический метаболизм миокарда на модели рабочей гипоксии. Установлено преимущество С-3 перед милдронат, пирацетамом и мексидолом. Противоишемическое действие С-3 определяется его свойствами скавенджера NO и направлено на прерывание АФК/SH-зависимых механизмов нарушений энергетического метаболизма и депривации системы эндогенной цитопротекции.

**Ключевые слова:** скавенджеры NO, ишемия миокарда, внутримозговое кровоизлияние, компьютерная программа, виртуальный скрининг, производные ксантина.



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозин-5-дифосфорна кислота  
АМФ – аденозин-5-монофосфорна кислота  
АОА – антиоксидантна активність  
АТФ – аденозин-5-трифосфорна кислота  
АФГ – альдегідфенілгідрозони  
АФК – активні форми кисню  
В/о – внутрішньоочередно  
ВК – внутрішньомозковий крововилив  
GSH – глутатіон відновлений  
Г-S-T – глутатіон-s-трансфераза  
ГПР – глутатіонпероксидаза  
ГР – глутатіонредуктаза  
КФГ – карбоксилфенілгідрозони  
КФК - мх – мітохондріальна креатінфосфокіназа  
КФК-ЦТ – цитоплазматична креатінфосфокіназа  
МВ-КФК – серцева ізоформа креатінфосфокінази  
МДГ – малатдегідрогеназа  
мРНК – матриксна рибонуклеїнова кислота  
НАД – нікотинаміддинуклеотид  
НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид  
НАДН-МДГ- НАДН – залежна малатдегідрогеназа  
НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат  
ОМБ – окисна модифікація білка  
П/ш – підшкірно  
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція  
РНК – рибонуклеїнова кислота  
СОД – супероксиддисмутаза  
ЦНС – центральна нервова система  
DNIC – динітрозольний комплекс заліза  
eNOS – ендотеліальна синтаза монооксида азота  
HSP<sub>70</sub> – білки теплового шоку (heat-shock proteins)  
iNOS – індуцибельна синтаза оксиду азоту  
nNOS – нейрональна синтаза оксиду азоту  
NOS – синтаза монооксида азота